



Politechnika Wrocławska

Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: Nauki Chemiczne

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

# **Synteza inhibitorów ureaz bakteryjnych o kowalencyjnym mechanizmie działania**

**mgr inż. Marta Grabarek**

Praca została wykonana pod opieką

**prof. dr. hab. inż. Artura Muchy**

Wrocław 2023



*Serdeczne podziękowania za wieloletnią i owocną współpracę,  
profesjonalną opiekę naukową, poświęcony czas oraz  
ogromną życzliwość składam mojemu Promotorowi.*

*Pracę dedykuję moim Najbliższym.  
Dziękuję za Waszą wiarę we mnie i ogromne wsparcie.*



# SPIS TREŚCI

<b>1. WPROWADZENIE</b>	<b>11</b>
<b>2. STUDIA LITERATUROWE</b>	<b>15</b>
2.1. Ureaza: struktura, pochodzenie i znaczenie	15
2.1.1. Ogólna charakterystyka enzymu	15
2.1.2. Czynniki wirulencji patogenów chorobotwórczych	17
2.1.3. Oporność antybiotykowa szczepów bakteryjnych	18
2.2. Inhibitory ureazy: rodzaje, synteza i aktywność biologiczna	20
2.2.1. Niekowalencyjne inhibitory ureazy bakteryjnej	22
2.2.1.1. Analogi mocznika, tiomocznika i kwasy aceto hydroksamowe	22
2.2.1.2. Związki fosforoorganiczne	25
2.2.1.3. Związki heterocykliczne	28
2.2.1.4. Chinolony	30
2.2.1.5. Inne inhibitory	31
2.2.2. Kowalencyjne inhibitory ureazy bakteryjnej	33
2.2.2.1. Związki selenoorganiczne	33
2.2.2.2. Polifenole	35
2.2.2.3. Układy $\alpha,\beta$ -nienasycone	39
2.2.2.4. Jony metali ciężkich	41
2.2.3. Podsumowanie	41
<b>3. BADANIA WŁASNE</b>	<b>43</b>
3.1. Cel badań	43
3.2. Struktury inhibitorów	45
3.3. Fosforowe pochodne katecholu	47
3.3.1. Synteza kwasu H-fosfinowego	47

3.3.2. Modyfikacje kwasu H-fosfinowego i odblokowanie grup funkcyjnych	49
3.4. Fosfonowe pochodne <i>N</i> -podstawionego 1,2-benzizoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onu	54
3.4.1. Synteza chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu	54
3.4.2. Synteza aminofosfonianów	55
3.4.2.1. Aminofenylofosfoniany	56
3.4.2.2. (Aminofenylo)alkilofosfoniany	57
3.4.2.3. (Aminometylofenylo)metylofosfoniany	57
3.4.2.4. ω-Aminoalkilofosfoniany	58
3.4.3. Synteza 1,2-benzizoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onów i hydroliza estrów fosfonowych	59
3.5. Halogenowe pochodne <i>N</i> -benzylobenzizoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onu	65
3.6. Aktywność biologiczna związków	67
3.6.1. Fosforowe pochodne katecholu	68
3.6.2. Fosfonowe pochodne <i>N</i> -podstawionego 1,2-benzizoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onu	71
3.6.3. Halogenowe pochodne <i>N</i> -benzylo-1,2-benzizoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onu	76
3.7. Podsumowanie	78
<b>4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA</b>	<b>81</b>
4.1. Specyfikacja aparatury oraz odczynników	81
4.2. Przepisy preparatywne	82
4.2.1. Kwasy fosfonowe i fosfinowe zawierające fragment katecholu	82
4.2.2. Fosfonowe pochodne <i>N</i> -podstawionego 1,2-benzizoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onu	90
4.2.2.1. Synteza aminofenylofosfonianów	90
4.2.2.2. Synteza (aminofenylo)alkilofosfonianów	91
4.2.2.3. Synteza (aminometylofenylo)metylofosfonianów	95
4.2.2.4. Synteza aminoalkilofosfonianów	98
4.2.2.5. Synteza chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu	101

4.2.2.6. Synteza 1,2-benzisoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onów	102
4.2.3. Halogenowe pochodne <i>N</i> -benzylo-1,2-benzisoselenazol-3(2 <i>H</i> )-onu	114
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>123</b>
<b>6. DOROBEK NAUKOWY</b>	<b>131</b>
<b>7. STRESZCZENIE</b>	<b>135</b>
<b>8. ABSTRACT</b>	<b>137</b>
<b>9. MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE</b>	<b>139</b>





## WYKAZ SKRÓTÓW

Ac	grupa acetylowa
ACN	acetonitryl
Arg	arginina
Boc	grupa <i>tert</i> -butyloksykarbonylowa
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimetylosililo)acetamid
Bzl	grupa benzylowa
Cbz	grupa benzyloksykarbonylowa
Cys	cysteina
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
DCC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna
DMF	dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
EDC	1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid
EDTA	kwasy (etylenodiamino)tetraoctowy
Et	grupa etylowa
EWG	grupa wyciągająca elektrony
Gly	glicyna
His	histydyna
HMDS	heksametylodisilazan
HOBt	hydroksybenzotriazol
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HRMS	wysokorozdzielcza spektrometria mas
IC <sub>50</sub>	stężenie inhibitora hamujące 50% aktywności enzymu
K <sub>i</sub>	stała dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor

Lys	lizyna
Me	grupa metylowa
MIC	minimalne stężenie hamujące
MW	ogrzewanie wspomagane mikrofalami
NMM	4-metylomorfolina
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy
Ph	grupa fenylowa
TBAB	bromek tetra- <i>n</i> -butyloamoniowy
TFA	kwask trifluorooctowy
THF	tetrahydrofuran
TMSBr	bromotrimetylosilan
TMSCl	chlorotrimetylosilan

## 1. WPROWADZENIE

Ureaza, obok nitrogenazy, odgrywa kluczową rolę w biogeochemicznym obiegu azotu w środowisku naturalnym. Pierwiastek ten wchodzi w skład wielu związków nieorganicznych i organicznych, co dowodzi, że jest on niezbędny dla wszystkich organizmów, a jego dostępność wywiera ogromny wpływ na funkcjonowanie różnych ekosystemów [1-3].

Powszechnym źródłem azotu w glebie jest mocznik, którego konwersja przez ureazę do amoniaku, a następnie proces nityfikacji do azotanów i azotynów sprawiają, że azot staje się dostępny dla roślin i innych organizmów odgrywając kluczową rolę w utrzymaniu produktywności naturalnych ekosystemów. Niektóre rośliny zdolne są do samodzielnego wytwarzania ureazy, co pozwala im wykorzystywać mocznik jako źródło azotu w środowiskach ubogich w składniki odżywcze [4,5]. W wodnym obiegu azotu, mocznik wytwarzany jest przez większość organizmów. Przekształcenie go do innych związków azotowych umożliwia rozwój fitoplanktonu, który jest pierwszym ogniwem morskiego łańcucha pokarmowego, a także odżywia rośliny produkujące tlen [6]. Azot atmosferyczny stanowi około 78% składu procentowego powietrza, natomiast jest stosunkowo obojętny chemicznie i nie może być bezpośrednio wykorzystywany przez większość organizmów. Dlatego niektóre bakterie i inne mikroorganizmy wykształciły sposoby przekształcania go w przyswajalne formy, takie jak amoniak, azotany i azotyny. W cyklu tym ureaza bierze swój udział, a produkowany przez nią amoniak może być między innymi wykorzystany przez bakterie nityfikujące, a następnie denityfikujące do odzyskania azotu cząsteczkowego [7].

Ureaza naturalnie występuje w bakteriach, grzybach, roślinach i algach. Powszechnie spotykana jest w przewodzie pokarmowym zwierząt i wytwarzana przez niektóre bakterie żyjące w glebie i wodzie.

Oprócz procesów naturalnych, ureaza znalazła szerokie właściwości aplikacyjne w wielu dziedzinach. W diagnostyce medycznej oraz w monitoringu środowiska ureaza w połączeniu ze wskaźnikami chemicznymi wykorzystywana jest jako biosensor do wykrywania obecności mocznika<sup>1</sup> w różnorodnych próbkach [8-11]. Natomiast w przemyśle stosuje się ją między innymi do zwiększenia skuteczności nawozów na bazie mocznika [12,13] oraz produkcji pasz dla zwierząt, w procesach bioremediacji mocznika ze ścieków przemysłowych (przekształcenie w amoniak umożliwia lepszy sposób usuwania np. poprzez napowietrzanie) [14], w przemyśle betoniarskim jako środek utwardzający [15], a także do modyfikowania właściwości niektórych produktów spożywczych. W produkcji wyrobów mlecznych enzym ten odpowiedzialny jest za tworzenie określonych smaków i tekstur [16,17], a w przemyśle winiarskim i piwowarskim stosowany jest do usuwania gorzkiego smaku i do kontroli pH procesu fermentacji [18-20].

Pomimo ogromnego znaczenia ureazy zbyt duża aktywność tego enzymu może mieć negatywny wpływ na środowisko i zdrowie [21]. Nadmierna konwersja mocznika do amoniaku powoduje istotne konsekwencje:

- 1) upośledzenie układu pokarmowego (którego działanie ściśle zależy od wartości pH), a także rozwój infekcji dróg moczowych oraz schorzeń neurologicznych,
- 2) gromadzenie się wysokich stężeń amoniaku w środowiskach o wysokim poziomie zanieczyszczenia mocznikiem, powodując zasadowość

---

<sup>1</sup> Na przykład, zakażenie bakterią *Helicobacter pylori* wykrywa się za pomocą bezinwazyjnego mocznikowego testu oddechowego, który polega na podaniu mocznika znakowanego radioaktywnym izotopem węgla i pomiarze znakowanego dwutlenku węgla powstającego w reakcji katalizowanej przez ureazę.

- zarówno gleb jak i wód, co może okazać się toksyczne dla roślin oraz organizmów, hamując rozwój i pogarszając stan zdrowia,
- 3) bezpośredni wpływ na proces nityfikacji, który w nadmiarze może doprowadzić do zakwaszenia gleby, powodując negatywny wpływ na wzrost roślin i żyzność gleb,
  - 4) nadmierna eutrofizacja i powstawanie szkodliwych zakwitów glonów, skutkujące niedoborem tlenu i śmiercią organizmów wodnych,
  - 5) utrata zasobów azotu w wyniku procesu ulatniania się amoniaku, co w przypadku przemysłu rolnego skutkuje zwiększeniem kosztów produkcji w wyniku konieczności stosowania większej ilości nawozów,
  - 6) duża produkcja podtlenu azotu (w warunkach niskiego poziomu tlenu podczas nityfikacji lub tlenowej inhibicji denityfikacji), który jako składnik gazu cieplarnianego przyczynia się do zmian klimatu,
  - 7) zahamowanie wzrostu drożdży wykorzystywanych w procesie fermentacji podczas przemysłowej produkcji alkoholu z roślin.

Podsumowując, ureaza odgrywa ważną rolę w różnych procesach, jednak jej nadmierna aktywność może mieć negatywny wpływ na zdrowie człowieka, środowisko naturalne oraz przemysł. Zrozumienie wpływu aktywności ureazy na otoczenie jest niezwykle ważne w minimalizacji negatywnych skutków jej działania, ochrony zdrowia społeczeństwa, odpowiedniego gospodarowania glebami rolnymi, a także produktywności naturalnych ekosystemów oraz przemysłu. W związku z powyższym kontrola aktywności tego enzymu jest niezwykle istotna, a rozwój nowych technik i synteza nowych inhibitorów wciąż pozostaje inspirującym zakresem badań prowadzonych w ramach nauk chemicznych.



## 2. STUDIA LITERATUROWE

### 2.1. Ureaza: struktura, pochodzenie i znaczenie

#### 2.1.1. Ogólna charakterystyka enzymu

Ureaza (amidohydrolaza mocznikowa, EC.3.5.1.5) jest metaloenzymem<sup>2</sup> katalizującym hydrolytyczny rozkład mocznika<sup>3</sup>, będącego końcowym produktem metabolizmu białek u zwierząt ureotelicznych (ssaki), a także biodegradacji kwasu moczowego wydalanego przez zwierzęta urykoteliczne (owady, ptaki, gady) [22]. Enzym ten jest zatem kluczowym elementem metabolizmu związków azotowych w wielu organizmach.

Badania naukowe prowadzone z wykorzystaniem ureazy przyczyniły się do wielu pionierskich osiągnięć w naukach biochemicznych. Po raz pierwszy efekt jej działania został zaobserwowany w 1876 roku przez Frédéricą Musculusą, który powiązał przyśpieszoną przemianę mocznika w węglan amonu z obecnością roztworu sfermentowanego moczu w badanej próbce [23]. Obserwacje te zostały potwierdzone w 1890 roku przez Pierre'a Miquelta, który zaproponował obecną nazwę białka. Od 1909 roku, kiedy to miało miejsce odkrycie przez Takeuchiego ureazy w soi (*Glycine max*) zapewniające obfite

---

<sup>2</sup> Enzym posiadający w centrum aktywnym jon/jony metalu, które biorą udział w procesie katalitycznym i koordynowane są przez grupy boczne reszt aminokwasowych.

<sup>3</sup> Hydroliza mocznika zachodzi dwuetapowo. Pierwsza reakcja prowadzi do otrzymania amoniaku i karbaminianu, który następnie spontanicznie rozpada się dając kolejną cząsteczkę amoniaku i dwutlenek węgla – w roztworze o niskiej pojemności buforowej powstające produkty alkalizują środowiska. Ureaza przyśpiesza pierwszą reakcję około 10<sup>14</sup>-krotnie.

źródło enzymu, zainteresowanie ureazą, jako modelowym związkiem do przeróżnych badań, znacząco wzrosło. Przełomowe osiągnięcia biochemii, w tym związane z narodzinami współczesnej enzymologii, miały miejsce w 1926 roku za sprawą Jamesa Sumnera, który po raz pierwszy wyizolował ureazę z fasoli (*Canavalia ensiformis*), oczyścił otrzymując postać krystaliczną i wykazał, że enzymy są białkami [24]. W 1946 roku za swoje prace otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Co więcej, ureaza jest też pierwszym wyizolowanym enzymem, w którym Nicholas Dixon w 1975 roku stwierdził obecność kationów niklu w miejscu aktywnym i opisał ich kluczowy wpływ na aktywność enzymatyczną [25].

Ureaza jest białkiem wielkocząsteczkowym i w zależności od pochodzenia (Tabela 1), posiada różną masę cząsteczkową, strukturę (homo- lub heteromeryczną) oraz budowę centrum aktywnego.

**Tabela 1. Niektóre przykłady naturalnych źródeł ureazy.**

Grzyby	Rośliny	Algi
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Nitellopsis obtusa</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Glycine max</i>	<b>Bezkęgowce</b>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Cajanus cajan</i>	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Otala lactea</i>
<b>Bakterie</b>		
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Brucella suis</i>	<i>Sporosarcina pasteurii</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	



Ureazy roślinne i grzybowe składają się z kilku identycznych podjednostek, w przeciwieństwie do ureaz bakteryjnych, które zbudowane są z dwóch lub trzech odrębnych części i występują w postaci trimerowych lub heksamerowych agregatów [26]. Każda podjednostka posiada jedno miejsce aktywne z dwoma kationami niklu koordynowanymi przez kilka reszt aminokwasowych (histrynę, asparaginę i lizynę mostkującą dwa atomy metalu). Budowa miejsca aktywnego różni się w zależności od pochodzenia enzymu. Ureaza jest enzymem bogatym w cysteinę, a jedna z reszt znajduje się na wejściu do centrum aktywnego enzymu i bierze udział w tworzeniu tzw. „klapki” blokującej miejsce katalityczne. Chociaż sama nie bierze udziału w reakcji enzymatycznej, zmiana konformacyjna z jej udziałem ma bezpośredni wpływ na rozmieszczenie innych kluczowych reszt aminokwasowych, a w konsekwencji na mechanizm katalizy.

### **2.1.2. Czynniki wirulencji patogenów chorobotwórczych**

Ureazy bakteryjne stanowią najliczniejszą grupę (Tabela 1), a część z nich jest przyczyną wielu poważnych chorób w organizmie ludzkim. Enzym stanowi czynnik wirulencji<sup>4</sup> niektórych patogenów, umożliwiając im kolonizację w tkankach, namnażanie i rozwój infekcji (Tabela 2) [27]. Ze względu na dużą zasadowość amoniaku będącego jednym z produktów reakcji katalizowanej przez ureazę, enzym jest bezpośrednim źródłem toksyn wobec żywych komórek, a obecność aktywności ureolitycznej jest ważnym markerem wielu infekcji bakteryjnych.

---

<sup>4</sup> Czynniki wirulencji (inaczej zjadliwość) drobnoustrojów – zdolność organizmu chorobotwórczego do wnikięcia, namnożenia oraz uszkodzenia tkanek i przeżycia w niesprzyjającym środowisku.

**Tabela 2. Przykłady najbardziej dotkliwych chorób bakteryjnych, w których ureaza stanowi czynnik zjadliwości.**

Patogen	Skutki zasiedlenia gospodarza
<i>B. suis</i>	Bruceloza – przewlekła i zakaźna choroba odzwierzęca objawiająca się poronieniami, bezpłodnością samic oraz zapaleniem narządów płciowych samców.
<i>H. pylori</i>	Choroba wrzodowa żołądka – uszkodzenia nabłonka w błonie śluzowej, na skutek zapalenia wywołanego neutralizacją kwasu solnego w soku żołądkowym. Przewlekła i nieleczona infekcja ma wpływ na rozwój nowotworów błony śluzowej żołądka.
<i>P. mirabilis</i> <i>P. vulgaris</i>	Infekcje dróg moczowych oraz powstawanie kamieni nerkowych (na skutek wytrącania się soli w zasadowym moczu), a w konsekwencji niedrożność oraz niewydolność nerek. Zapalenie opon mózgowych – ureaza ułatwia pokonanie bariery krew-mózg i inwazję ośrodkowego układu nerwowego.
<i>S. aureus</i>	Różne rodzaje infekcji narządów i tkanek odporne na działanie antybiotyków.
<i>U. urealyticum</i>	Infekcje dróg moczowych oraz narządów płciowych.

### 2.1.3. Oporność antybiotykowa szczepów bakteryjnych

Niektóre z mikroorganizmów wykształciły molekularne mechanizmy obronne umożliwiające im przetrwanie w obecności substancji terapeutycznych zdolnych do hamowania namnażania i eliminacji, tj. antybiotyków. Wyróżnia się antybiotykooporność naturalna i nabytą. Pierwsza z nich wynika

z pierwotnych właściwości komórek bakterii – jest determinowana genetycznie i może być powiązana z posiadaniem cech takich jak nieprzepuszczalna ściana komórkowa, wytwarzanie enzymów, niskie powinowactwo lub brak odpowiedniego receptora dla substancji czynnej. Natomiast antybiotykooporność nabyta jest wynikiem przeprowadzania transferu genów lub spontanicznych mutacji. W konsekwencji uniewrażliwienie się bakterii na substancję czynną lub chociażby na jej standardowo stosowane stężenie prowadzi do braku skuteczności stosowanej terapii, a to stanowi ogromny i narastający problem w medycynie. Ponadto poważnym utrudnieniem jest łatwy dostęp do antybiotyków, a także niewystarczająca świadomość pacjentów o wpływie stosowania nieodpowiedniej terapii i samodzielnego modyfikowania zaleceń lekarskich na możliwość powstania opornych szczepów. Aktualnym rozwiązaniem stosowanym w celu przeciwdziałania opornym szczepom jest stosowanie kombinacji substancji czynnych. W przypadku leczenia zakażenia bakterią *H. pylori* przeprowadza się czteroskładnikową farmakoterapię składającą się z obniżającego wydzielanie kwasu żołądkowego inhibitora pompy protonowej, bakteriobójczych soli bizmutu oraz dwóch antybiotyków przez 7-14 dni.

Jak wspomniałam powyżej, jednym z naturalnych mechanizmów obronnych bakterii jest wytwarzanie odpowiednich enzymów ułatwiających im przeżycie. Wśród wielu patogennych mikroorganizmów czynnikiem takim jest również ureaza, a hamowanie jej aktywności może znacząco wpłynąć na powodzenie terapii poprzez synergistyczne działanie z antybiotykami.

## 2.2. Inhibitory ureazy: rodzaje, synteza i aktywność biologiczna

Związkami zdolnymi do kontroli aktywności ureazy są inhibitory. W najbardziej typowym podejściu substancje te wiążą się w miejscu aktywnym lub blokują do niego dostęp zapobiegając wiązaniu mocznika, a w konsekwencji zmniejszając jego hydrolizę. Budowa centrum aktywnego i grupy funkcyjne zaangażowane w proces katalityczny ureazy warunkują, które substancje wpłyną hamująco na jej działanie (Tabela 3). Dlatego kluczowa jest znajomość mechanizmu oddziaływania inhibitora z enzymem (np. rola reszt aminokwasowych zdolnych do oddziaływań) już na etapie projektowania struktur. W związku z faktem, iż nawet niewielka zmiana w strukturze inhibitora może znacząco wpłynąć na powinowactwo, opracowywanie różnorodnych strukturalnie związków i tworzenie obszernych bibliotek, poddawanie ich badaniom przesiewowym i analiza zależności struktura-aktywność, składają się na kompleksowy proces optymalizacji siły hamowania i selektywności inhibitorów, który dodatkowo może wymagać wielu etapów iteracyjnych.

**Tabela 3. Podstawowe grupy inhibitorów ureazy.**

Strukturalne analogi mocznika	Analogi stanu przejściowego	Inne
tiomocznik	amidy, estry i kwasy fosforowe	związki selenowe
hydroksymocznik		polifenole
kwaskwas		$\alpha,\beta$ -nienasycone układy
aceto hydroksamowy		związki heterocykliczne
		związki tiolowe
		związki boru
		jony metali ciężkich

Inhibitory ureazy znalazły szerokie zastosowania, aczkolwiek dwa główne związane są z rolnictwem oraz medycyną. Hamując hydrolizę mocznika w glebie ograniczają one straty azotu w procesach ulatniania i wymywania, a tym samym zwiększają wydajność nawozów azotowych czyniąc je bardziej efektywnymi i przyjaznymi dla środowiska. Natomiast w medycynie inhibitory ureazy badano pod kątem ich potencjału ograniczania wirulencji bakterii wytwarzających ureazę. Na przykładzie kwasu acetohydroksamowego zauważono, że jego jednoczesne stosowanie z antybiotykami pomaga w leczeniu infekcji poprzez zmniejszenie zjadliwości i przeżywalności drobnoustrojów. Szczególnie w przypadku zastosowania medycznego, niezwykle istotnym aspektem jest dążenie do opracowywania związków chemicznych o bardzo dobrych właściwościach hamowania aktywności enzymu, ale także będących strukturami stabilnymi chemicznie i o jak najmniejszej cytotoksyczności.

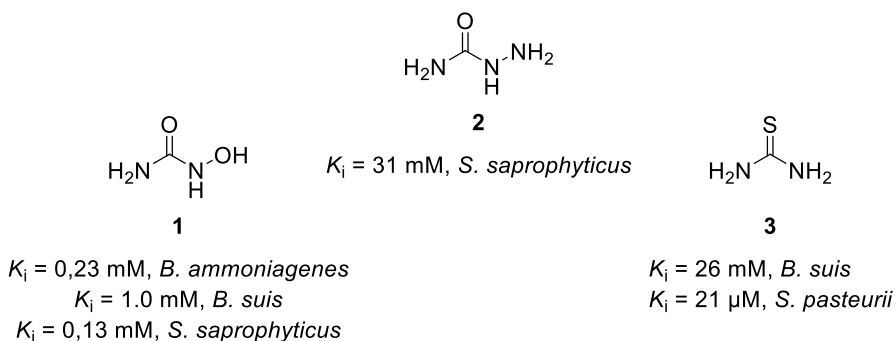
W literaturze znane są dwa główne mechanizmy inhibicji ureazy. Pierwszy z nich opiera się na tworzeniu niekowalencyjnego oddziaływania pomiędzy inhibitorem, a katalitycznymi kationami niklu, głównie w wyniku strukturalnego podobieństwa do substratu katalizowanej reakcji lub stanu przejściowego (Podrozdział 2.2.1). Drugim podejściem, jest wykorzystanie zdolności niektórych ugrupowań do tworzenia wiązania kowalencyjnego z grupą tiolową cysteiny znajdującą się przy wejściu do miejsca aktywnego ureazy. Efektem tego jest zwykle nieodwracalna inaktywacja białka poprzez zaburzenie możliwości zmian konformacyjnych związanych z wiązaniem substratu (Podrozdział 2.2.2). Oba typy inhibitorów powinny wykazywać się odpowiednią komplementarnością strukturalną do określonych regionów enzymu. Ze względu na ogromne zainteresowanie tym tematem, wielu naukowców dokonało przeglądu prac o inhibitorach ureazy i podsumowania najważniejszych osiągnięć w tym zakresie [22,28-32].

### 2.2.1. Niekowalencyjne inhibitory ureazy bakteryjnej

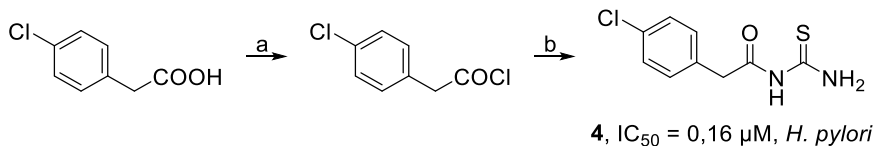
Niekowalencyjne inhibitory ureazy bakteryjnej stanowią liczną grupę związków, które wiążą się w centrum aktywnym enzymu poprzez koordynowanie centralnych jonów niklu i/lub tworzenie sieci oddziaływań z resztami aminokwasowymi tworzącymi wnękę aktywną. Większość z nich działa zgodnie z mechanizmem inhibicji kompetycyjnej, konkurując o dostęp do centrum katalitycznego.

#### 2.2.1.1. Analogi mocznika, tiomocznika i kwasy aceto hydroksamowe

Najprostszymi inhibitorami ureazy są strukturalne analogi mocznika. Stosunkowo proste związki, takie jak hydroksymocznik (**1**), semikarbazyd (**2**) oraz tiomocznik (**3**) okazały się być milimolarnymi inhibitorami ureaz bakteryjnych (Rysunek 1) [33-35]. Wprowadzanie modyfikacji strukturalnych (w celu lepszego dopasowania do centrum katalitycznego poprzez tworzenie dodatkowych oddziaływań), w wielu przypadkach korzystnie wpłynęło na hamowanie aktywności enzymu. Przykładowo, lepszym inhibitorem od tiomocznika okazała się jego *N*-acylowana pochodna (**4**), którą otrzymano z odpowiedniego kwasu karboksylowego (Schemat 1) [36].



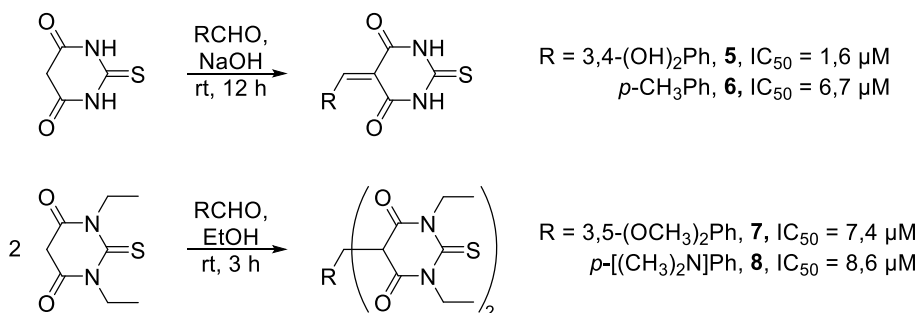
**Rysunek 1. Struktury analogów mocznika oraz ich aktywność wobec ureaz bakteryjnych.**



(a)  $SOCl_2$ ,  $90^\circ C$ , 1-2 h; (b) tiomocznik,  $PhCH_3$ ,  $100^\circ C$ , 1,5-2 h

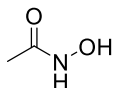
**Schemat 1. Synteza *N*-podstawionych pochodnych tiomocznika oraz ich aktywność wobec ureazy z *H. pylori*.**

Kolejnymi związkami zawierającymi w swojej strukturze fragment mocznika i wiążącymi się w centrum aktywnym w sposób analogiczny do substratu są barbiturany. Jednak ze względu na większe powinowactwo atomu siarki do jonów niklu, lepsze wyniki osiągnięto dla tiobarbituranów [37,38]. Po modyfikacji w wyniku kondensacji Knoevenagela, która umożliwiła przyłączenie różnych podstawników do struktury wiodącej, uzyskano inhibitory ureazy ze *S. pasteurii* silniejsze od tiomocznika (**5-8**) (Schemat 2).



**Schemat 2. Synteza pochodnych tiobarbituranów i bistiobarbituranów oraz ich aktywność wobec ureazy ze *S. pasteurii*.**

Jednym z najbardziej znanych inhibitorów ureazy jest kwas aceto hydroksamowy (**9**) (Rysunek 2) [35,39-41]. Swoją skuteczność zawdzięcza wysokiemu powinowactwu związanemu z właściwościami koordynowania jonów metali przez ugrupowanie hydroksamowe. Związek wiąże się w miejscu aktywnym enzymu jako dwukleszczowy ligand chelatujący centrum metaliczne.



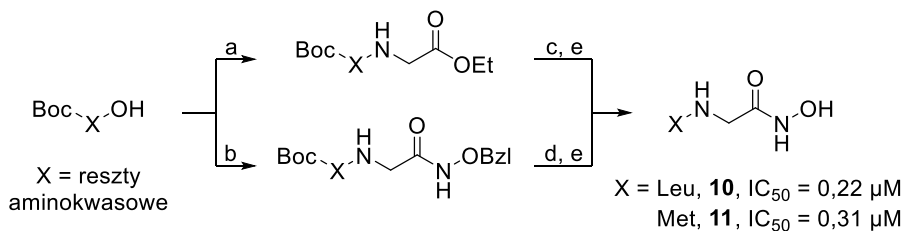
$K_i = 0,77 \text{ mM}$ , *B. suis*  
 $K_i = 2,0 \text{ }\mu\text{M}$ , *H. pylori*

9

$K_i = 2,6 \text{ }\mu\text{M}$ , *K. aerogenes*  
 $K_i = 3,3 \text{ }\mu\text{M}$ , *S. pasteurii*

### Rysunek 2. Struktura kwasu acetohydroksamowego oraz jego aktywność wobec ureaz bakteryjnych.

Niestety, zastosowany klinicznie związek ten powodował znaczące skutki uboczne takie jak teratogenność [42], odwracalne objawy neurosensoryczne i psychoneurologiczne, zaburzenia układu pokarmowego i hematologicznego [43], niemniej jednak został zatwierdzony przez Agencję Żywności i Leków (FDA) w 1983 r. do leczenia przewlekłych infekcji dróg moczowych (w Stanach Zjednoczonych pod nazwą Lithostat, a w Europie jako Uronofrex). Ze względu na prostą strukturę i względnie niską toksyczność jest jednym z najintensywniej badanych inhibitorów ureaz roślinnych, bakteryjnych oraz grzybowych, a także w terapiach medycznych stosowanych w stanach patologicznych wywołanych przez bakterie ureolityczne. Kwasy hydroksamowe są łatwe w syntezie i posiadają duże możliwości modyfikacji strukturalnych. Zsyntetyzowano różnorodne pochodne, np. z odpowiednio zabezpieczonych aminokwasów (Schemat 3). Wiele z nich wykazało bardzo dobrą aktywność biologiczną wobec ureazy bakteryjnej z *H. pylori* (**10,11**) [28,44,45].



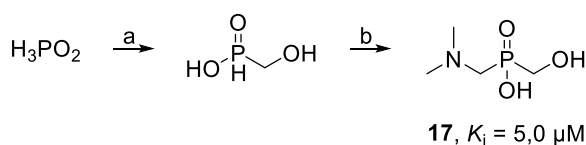
(a) Gly-OEt · HCl, HOBT, EDC, THF,  $-20 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h; (b) Gly-NHOBzl · HCl, HOBT, EDC, THF,  $-20 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h; (c) 1 M  $\text{NH}_2\text{OH}/\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 h; (d) 5% Pd/C,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , rt, 1 h; (e) 4,2 M HCl/AcOEt, rt, 1h

### Schemat 3. Synteza i aktywność pochodnych kwasu acetohydroksamowego wobec ureazy z *H. pylori*.

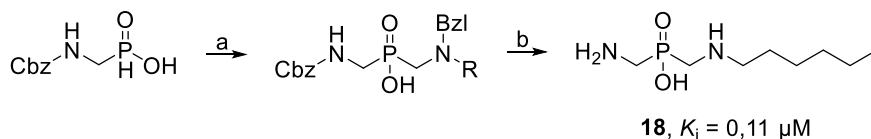




Otrzymywanie kwasów fosfinowych/fosfonowych jest przeważnie skomplikowanym i wieloetapowym procesem, często wymagającym odpowiedniej strategii protekcji/deprotekcji grup funkcyjnych w zależności od stosowanych warunków reakcji. Tworzenie wiązania C–P jest natomiast podstawowym wyzwaniem syntetycznej chemii fosforoorganicznej i może być realizowane różnymi metodami opracowanymi na przestrzeni lat. Do syntezy inhibitorów ureazy użyto przykładowo dobrze poznanej addycji P–H do ugrupowania karbonylowego (reakcja Abramowa) dającej  $\alpha$ -hydroksyfosfiniany lub  $\alpha$ -hydroksyfosfoniany. Reakcja ta jest często stosowana do syntezy podstawowego bloku budulcowego (kwasu hydroksymetylo-H-fosfinowego), ale także dalszej rozbudowy strukturalnej (Schemat 5). Niezwykle użyteczna jest także jednoetapowa, trójskładnikowa reakcja Kabaczniaka-Fieldsa, w wyniku której z aminy, związku karbonylowego oraz H-fosfonianu (fosforynu) dialkylowego (lub analogu) otrzymuje się  $\alpha$ -aminometylofosfoniany/fosfiniany. Uważa się, że jest ona jedną z najskuteczniejszych metod syntezy fosforowych analogów  $\alpha$ -aminokwasów, które zdolne są do wykazywania aktywności biologicznej wobec enzymów, w tym także ureaz (**17,18**) [48-51].



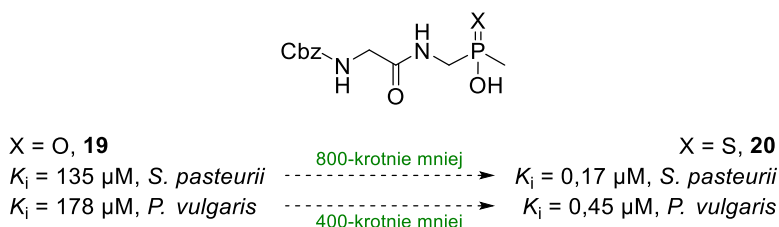
(a)  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , aq. HCl, EtOH, 100°C, 48 h; (b) aq.  $\text{Me}_2\text{NH}$ , aq. HCl,  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , 90°C, 5 h



(a)  $\text{NHR}(\text{Bzl})$ ,  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , aq. HCl, EtOH, t.w., 4 h; (b)  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , rt, 1 h

**Schemat 5. Synteza wybranych  $\alpha$ -aminofosfinianów oraz ich aktywność wobec ureazy ze *S. pasteurii*.**

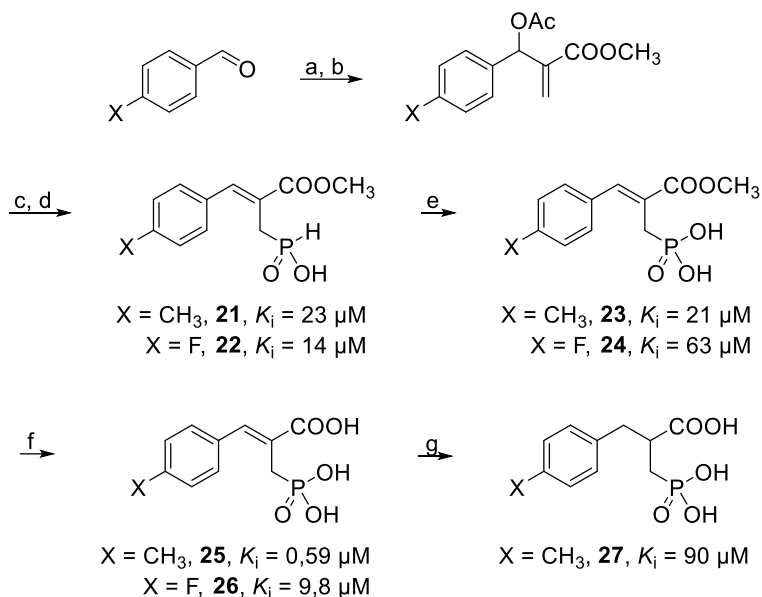
Ciekawym wątkiem badawczym dotyczącym  $\alpha$ -aminofosfinianów było porównanie ich aktywności biologicznej wobec ureaz względem analogicznych tiofosfinianów zsyntetyzowanych w reakcji tionowania z odczynnikiem Lawessonna (**19,20**) [52]. Różnica w jednym atomie spowodowała kilkaset-krotny spadek wartości stałej inhibicji dowodząc większego powinowactwa atomu siarki niż atomu tlenu do centralnych jonów niklu ureazy (Rysunek 3).



**Rysunek 3. Porównanie aktywności fosfinianów i analogicznych tiofosfinianów wobec ureaz bakteryjnych**

Innym podejściem do syntezy związków fosforoganicznych jest modyfikacja aktywowanych układów  $\alpha,\beta$ -nienasyconych w reakcji substytucji nukleofilami fosforowymi. Przykładowo, badacze podjęli się rozbudowy strukturalnej kwasu cynamonowego wykazującego aktywność inhibitorową wobec ureaz, tworząc dużą bibliotekę mikromolarnych i submikromolarnych inhibitorów ureazy ze *S. pasteurii* (Schemat 6) [54-53]. Substratami nienasyconymi były addukty Mority-Baylisa-Hillmana, otrzymane w reakcji *para*-podstawionych benzaldehydów z akrylanem metylu. Po acylowaniu grupy hydroksylowej (w celu uzyskania lepszej grupy odchodzącej) przeprowadzono reakcję z aktywowanym (siliowanym) nukleofilowym komponentem fosforowym otrzymując odpowiednie kwasy H-fosfinowe **21** i **22**. W następnych etapach przeprowadzono następcze modyfikacje strukturalne: utlenianie ugrupowania kwasu H-fosfinowego do kwasu fosfonowego (**23** i **24**), hydroliza grupy estrowej kwasów fosfonowych (**25** i **26**) oraz redukcja wiązania

podwójnego jednego ze związków (z **25** do **27**), które pozwoliły na bogatą analizę zależności struktura-aktywność. Znamienną obserwacją było pogorszenie parametrów inhibicji po redukcji wiązania podwójnego, świadczące o jego udziale w interakcji z centrum aktywnym enzymu, a zatem istnieniu dodatkowego (poza kompleksowaniem jonów niklu) mechanizmu inhibicji.



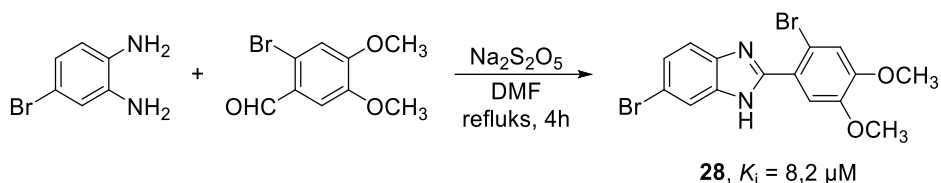
(a) akrylan metylu, DABCO, rt, 3 d; (b) AcCl, pyridyna,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h, rt, 16 h; (c)  $\text{HP}(\text{OSiMe}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ , 16 h; (d) MeOH, rt, 30 min; (e) DMSO,  $\text{I}_2$ , THF, t.w., 24 h; (f) 6 M HCl, t.w., 24 h; (g)  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C, MeOH, 1 atm, rt, 2 d

### Schemat 6. Synteza i aktywność wobec ureazy ze *S. pasteurii* fosforowych analogów kwasu cynamonowego.

#### 2.2.1.3. Związki heterocykliczne

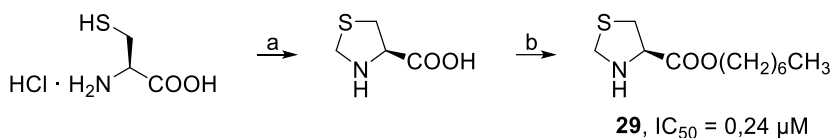
Układy heterocykliczne również hamują aktywność ureaz. Związki te są zwykle inhibitorami kompetycyjnymi, choć nie są analogami substratu czy struktury stanu przejściowego katalizowanej reakcji, niekoniecznie także koordynują jony metalu. Są jednak komplementarne do miejsca aktywnego

i tworzą korzystne oddziaływania z resztami aminokwasowymi, w tym wiązania wodorowe, interakcje typu  $\pi$  czy hydrofobowe. Przykładem takiego związku jest benzimidazol **28**, otrzymany w reakcji cyklizacji pochodnej 1,2-benzenodiaminy z aldehydem aromatycznym (Schemat 7) [56,57].



**Schemat 7. Synteza przykładowej pochodnej benzimidazolu oraz jej aktywność wobec ureazy ze *S. pasteurii*.**

Kolejną grupą związków, której zachowanie wobec aktywności ureaz zostało zbadane, były pochodne tiazolidyny otrzymane z chlorowodoru L-cysteiny (Schemat 8) [58]. Kwasy tiazolidyno-4-karboxylowe okazały się dwukleszczowymi ligandami, zdolnymi do wiązania się z atomami niklu w pseudotetraedrycznej geometrii koordynacyjnej poprzez atomy tlenu. Zsyntetyzowano również estry tego kwasu, które wykazały wzrost aktywności inhibitorowej, co wynika z lepszych właściwości elektronodonorowych grup alkilowych. Najskuteczniejszą wobec ureazy ze *S. pasteurii* okazała się być pochodna *n*-heptylowa, związek **29**.



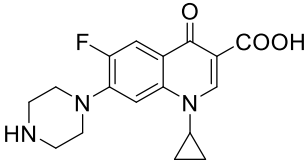
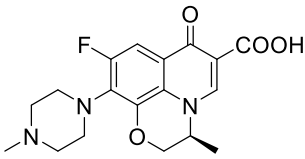
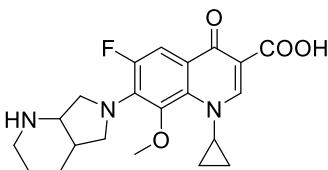
(a)  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , EtOH, pirydyna, rt, 24 h; (b)  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ ,  $\text{SOCl}_2$ , rt, 2h

**Schemat 8. Synteza pochodnej tiazolidyny oraz jej aktywność wobec ureazy ze *S. pasteurii*.**

### 2.2.1.4. Chinolony

Ważną klasę związków biologicznie aktywnych stanowią chinolony, a w szczególności fluorochinolony. Uważa się, że są jednymi z klinicznie najskuteczniejszych syntetycznych leków przeciwbakteryjnych o szerokim spektrum działania [60]. Tworzą dużą grupę związków, w której znajduje się wiele znanych antybiotyków zarówno przeciw bakteriom Gram-ujemnym, jak i Gram-dodatnim. Głównymi przedstawicielami są cyprofloksacyna, lewofloksacyna oraz moksyfloksacyna (Tabela 4). Związki te okazały się obiecującymi inhibitorami ureaz z *H. pylori*, *P. mirabilis* oraz *S. aureus* [61,62], a w połączeniu z innymi substancjami (wykorzystując efekt synergistyczny umożliwiając obniżenie stężenia stosowanego antybiotyku) zostały zastosowane w skuteczniejszej terapii.

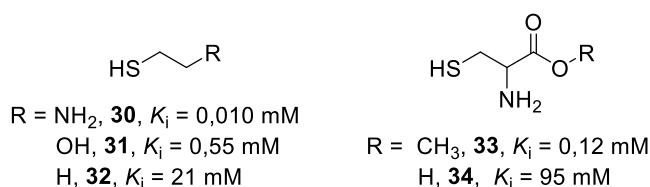
**Tabela 4. Aktywność przeciwbakteryjna antybiotyków chinolonowych.**

Substancja czynna	MIC <sub>90</sub> (µg/ml)		
	<i>H. pylori</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>
 Cyprofloksacyna	1	32	16
 Lewofloksacyna	1	16	4
 Moksyfloksacyna	1	64	1

Wyniki modelowania molekularnego sugerują, że inhibicja ureazy odbywa się przez oddziaływanie grupy karboksylowej z jonami niklu w miejscu aktywnym. Aczkolwiek niewykluczona jest także kowalencyjna modyfikacja celu biologicznego, na skutek nukleofilowej addycji tiolu do układu nienasyconego, określanej jako addycja Michaela (więcej w podrozdziale 2.2.2.3).

### 2.2.1.5. Inne inhibitory

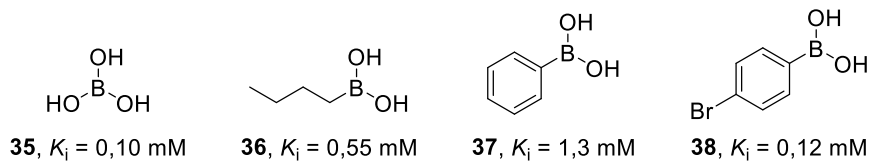
Tiole również koordynują jony niklu w centrum aktywnym ureazy, aczkolwiek są słabymi inhibitorami (**30-34**, Rysunek 4) [39]. Badania kinetyczne wykazały, że mechanizm oddziaływania jest zależny od pH, a najbardziej efektywna inhibicja występuje dla formy anionowej ( $R-S^-$ ). Jak można zauważyć na poniższym rysunku obecność dodatkowych grup funkcyjnych w strukturze związku, w szczególności aminowej, podnosi siłę inhibicji.



**Rysunek 4. Aktywność tioli wobec ureazy z *K. aerogenes*.**

Kwas borowy i jego pochodne (**35-38**) są szybkowiązącymi inhibitorami ureaz, aczkolwiek siła ich oddziaływania również okazała się być stosunkowo słaba (Rysunek 5) [63]. Struktura krystaliczna ujawniła, że kwas borowy mostkuje jony niklu za pomocą dwóch atomów tlenu, a trzeci skierowany jest w stronę wnęki [64]. Wprowadzenie hydrofobowych podstawników nieznacznie pogorszyło wartość inhibicji, niemniej jednak dodatkowe modyfikacje jak

choćby obecność halogenów, zdolnych do tworzenia halogenowych wiązań wodorowych, odtwarza wyjściowe właściwości inhibicyjne.



**Rysunek 5. Aktywność związków boru wobec ureazy z *P. mirabilis*.**



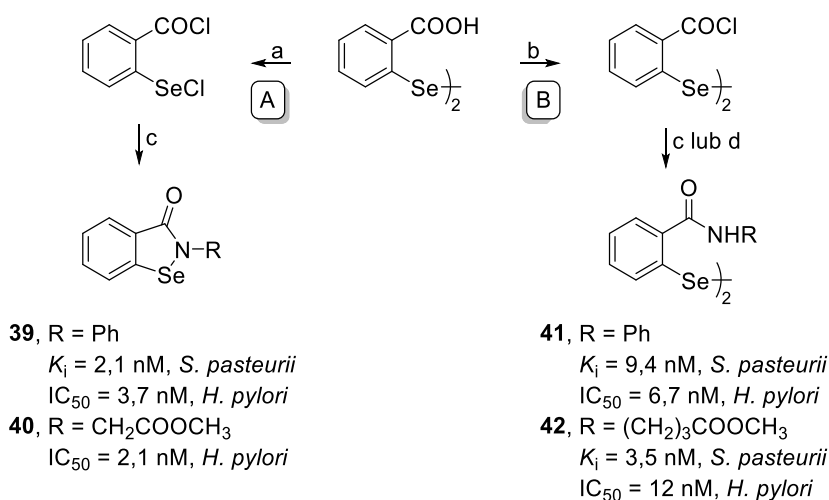
### 2.2.2. Kowalencyjne inhibitory ureazy bakteryjnej

Cechą charakterystyczną kowalencyjnych inhibitorów ureazy jest tworzenie trwałego wiązania ze specyficzną resztą aminokwasową enzymu, co nieodwracalnie hamuje jego aktywność. W grupie tej można wyróżnić kilka typów związków, aczkolwiek ich mechanizm działania głównie obejmuje reaktywność wobec grupy tiolowej cysteiny znajdującej się na wejściu do centrum aktywnego (Cys322 w przypadku enzymu ze *S. pasteurii*).

#### 2.2.2.1. Związki selenoorganiczne

W ostatnim czasie duże zainteresowanie wśród naukowców opracowujących inhibitory ureazy wzbudziły związki organiczne zawierające atom selenu. Odbywa się to za sprawą ciekawej reaktywności tych związków, polegającej na tworzeniu wiązania kowalencyjnego z grupą tiolową cysteiny i powstawaniu mostków selenowo-siarkowych. Najwszechstronnie badany przedstawicielem tej klasy związków jest ebselen (*N*-fenylo-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on), znany ze swoich właściwości przeciwutleniających, przeciwzapalnych oraz przeciwdrobnoustrojowych [65]. Jest on rozważany w leczeniu chorób onkologicznych, neurodegeneracyjnych, a także bakteryjnych oraz wirusowych. Przykładowo, udowodniono jego zdolność do specyficznej inhibicji bakteryjnej reduktazy tioredoksyny (której inaktywacja prowadzi do zaburzenia mechanizmu kontroli stresu oksydacyjnego komórek) [66] oraz proteazy cysteinowej (odgrywającej kluczową rolę w replikacji wirusa SARS-CoV) [67]. Ebselen odgrywa znaczącą rolę w hamowaniu nadmiernego wydzielania soku żołądkowego, a posiadając właściwości antyureolityczne działa terapeutycznie na chorobę wrzodową. Wykazuje synergistyczne działanie z antybiotykami, uwrażliwiając na ich działanie nawet w przypadku bardzo opornych na leki patogenów [68]. Ponadto, toksyczność ebselenu oraz jego metabolitów została szczegółowo przebadana i jest akceptowalna.

Powyższa charakterystyka czyni ebselen i jego analogi – *N*-podstawione 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-ony cennymi obiektami badań z użyciem ureazy. W pierwszym podejściu zsyntetyzowano grupę ponad 20 związków selenoorganicznych (benzizoselenazol-3(2*H*)-onów oraz diselenidów) w reakcji amin pierwszorzędowych bądź aminokwasów z chlorkiem 2-(chloroseleno)benzoilu lub 2,2'-diselenobisbenzoilu (Schemat 9) [41]. Otrzymane związki zostały poddane testom aktywności inhibitorowej i większość z nich okazała się być nanomolarnymi inhibitorami enzymu (**39-42**). Na szczególną uwagę zasłużył ebselen, który najlepiej inaktywował zarówno natywny enzym ze *S. pasteurii*, jak i hamował ureolizę w żywych komórkach *H. pylori*. W połączeniu z poznanymi uprzednio właściwościami, okazał się bardzo obiecującym kandydatem na nowy środek leczniczy choroby wrzodowej.

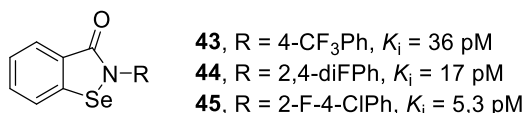


(a)  $\text{SOCl}_2$ , DMF, t.w.; (b)  $\text{SOCl}_2$ , benzen, t.w.; (c) amina lub aminokwas (nadmiar), DMAP, ACN; (d) HOBT, DCC, NMM, chlorowodorek estru metylowego aminokwasu, THF

**Schemat 9. Synteza pochodnych benzizoselenazol-3(2*H*)-onu (A) i diselenidu (B) oraz ich aktywność wobec ureazy ze *S. pasteurii* i ureolizy w komórkach *H. pylori*.**

Obiecującą aktywność ebselenu zainspirowała szerokie badania optymalizacyjne struktury, a najciekawsze wyniki przyniosło wprowadzenie

atomów halogenu do cząsteczki wyjściowej. Zsyntetyzowano 25 nowych struktur wykorzystując chlorek 2-(chloroseleno)benzoilu oraz pochodne aniliny. Halogenowane pochodne (**43-45**, Rysunek 6) wykazały wyjątkowe pikomolarne wartości stałej inhibicji ureazy ze *S. pasteurii* [69]. Tak wysokie powinowactwo wyjaśniono zdolnością do tworzenia specyficznych halogenowych wiązań wodorowych. Co więcej, halogenowanie zapewnia odpowiednią lipofilowość, przepuszczalność i stabilność metaboliczną związków, co stanowi cenną charakterystyką farmakologiczną w kontekście opracowania przyszłych leków.

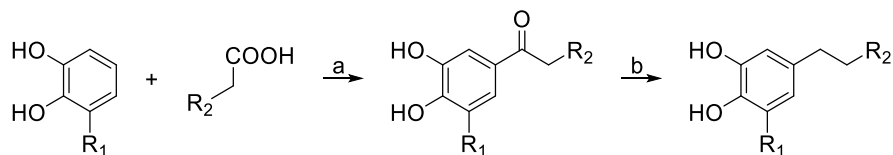


**Rysunek 6. Aktywność halogenowych pochodnych ebselenu wobec ureazy ze *S. pasteurii*.**

#### 2.2.2.2. Polifenole

Bardzo obszerną klasę inhibitorów ureaz stanowią polifenole, których najprostszym przykładem jest katechol. Otrzymanie struktury krystalicznej nieaktywnej ureazy ze *S. pasteurii* zawierającej *ortho*-dihydroksybenzen związany z cysteiną (Cys322) dało podstawy do rozważań nad mechanizmem wiązania tego typu inhibitorów. Początkowo aktywność katecholi powiązano ze znanymi właściwościami inhibitorowymi benzochinonu, które są wynikiem addycji grupy tiolowej do układu nienasyconego w reakcji Michaela [70]. W tym przypadku mechanizm działania katecholi miałyby opierać się na ich uprzednim utlenieniu. Inną z kolei propozycją był rodnikowy mechanizm addycji grupy tiolowej do pierścienia polifenolu [71]. Zaproponowano złożony wielokierunkowy przebieg procesu, a jego szczegóły wciąż pozostają aktualnym zagadnieniem.

Badania nad hamowaniem aktywności ureaz przez pochodne katecholu opierają się głównie na analizie wpływu obecności łańcuchów bocznych lub podstawników w pierścieniu głównym. Przetestowanie dużej serii polifenoli wobec ureazy z *H. pylori* umożliwiło otrzymanie bogatej analizy zależności struktura-aktywność [72]. Do badań użyto pochodnych katecholu oraz pirogalolu w celu oceny wpływu zarówno wpływu podstawników, jak i dodatkowej grupy hydroksylowej w pierścieniu głównym. Testowane związki zostały otrzymane na drodze selektywnego acylowania i redukcji produktów pośrednich (Schemat 10). Z przeprowadzonych testów aktywności biologicznej zaobserwowano, że najskuteczniejszym wśród przebadanych jest 4-(4-hydroksyfenetylo)benzeno-1,2-diol (**47**), a wprowadzenie trzeciej grupy hydroksylowej w pierścieniu głównym we wszystkich przypadkach powodowało pogorszenie siły inhibicji, co prawdopodobnie spowodowane jest obniżeniem reaktywności pierścienia w addycji grupy tiolowej.



(a)  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ; (b)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaOH}$

$\text{R}_1 = \text{H}$   $\text{R}_2 = \text{H}$ , **46**,  $\text{IC}_{50} = 4,9 \mu\text{M}$

$\text{R}_2 = 4\text{-OHPh}$ , **47**,  $\text{IC}_{50} = 1,5 \mu\text{M}$

$\text{R}_2 = 4\text{-FPPh}$ , **48**,  $\text{IC}_{50} = 6,2 \mu\text{M}$

$\text{R}_1 = \text{OH}$   $\text{R}_2 = \text{H}$ , **49**,  $\text{IC}_{50} = 34 \mu\text{M}$

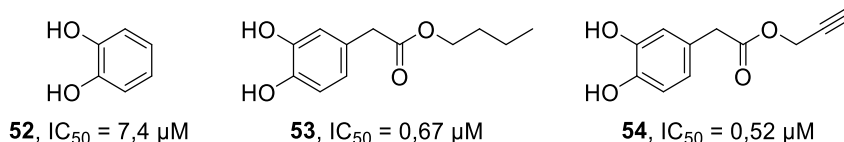
$\text{R}_2 = 4\text{-OHPh}$ , **50**,  $\text{IC}_{50} = 32 \mu\text{M}$

$\text{R}_2 = 4\text{-FPPh}$ , **51**,  $\text{IC}_{50} = 43 \mu\text{M}$

**Schemat 10. Synteza przykładowych pochodnych polifenoli z łańcuchami bocznymi oraz ich aktywność wobec ureazy z *H. pylori*.**

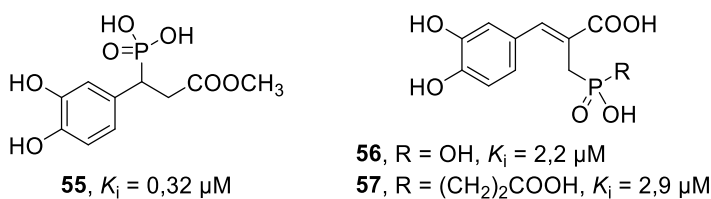
Kolejnym przykładem obszernej serii związków katecholowych przetestowanych wobec ureazy ze *S. pasteurii* są pochodne kwasów 3,4-dihydroksyfenylooctowego oraz 3,4-dihydroksycynamonowego [73]. Zbadano około 40 kwasów, estrów oraz amidów. Zaskakująco żaden z analogów kwasu kawowego nie wykazał aktywności hamującej. Niewielkie różnice

w strukturze związków (dodatkowy atom węgla i wiązanie podwójne) diametralnie wpływały na poziom inhibicji. Ester butylowy oraz propargilowy kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego okazały się być o rząd wielkości bardziej aktywne niż niepodstawiony katechol (Rysunek 7).



**Rysunek 7. Aktywność katecholu oraz jego pochodnych wobec ureazy ze *S. pasteurii*.**

Dobre właściwości inhibitorowe pochodnych katecholu oraz ich niska cytotoksyczność były motywacją badań macierzystego zespołu (bezpośrednio poprzedzających wyniki niniejszej rozprawy) do stworzenia pochodnych fosforowych w celu wprowadzenia ugrupowania zdolnego do dodatkowych oddziaływań z centralnymi jonami metalu ureazy [74]. Zsyntetyzowano związki zawierające jeden bądź trzy atomy węgla pomiędzy grupą fosforową a ugrupowaniem katecholu. Trzy serie związków uzyskano na drodze wieloetapowej syntezy z handlowo dostępnych substratów takich jak: kwas 3,4-dihydroksycynamonowy, alkohol 3,4-dimetoksybenzylowy oraz aldehyd 3,4-dimetoksybenzoowy. Kilka docelowych struktur cechowało się mikromolarną a nawet submikromolarną wartością stałej inhibicji wobec ureazy ze *S. pasteurii* (Rysunek 8).



**Rysunek 8. Aktywność fosforowych pochodnych katecholu wobec ureazy ze *S. pasteurii*.**

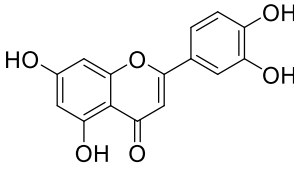
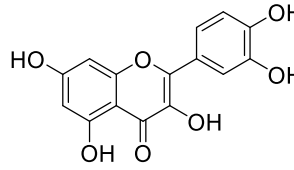
Bardziej rozbudowanymi strukturalnie polifenolami są flawonoidy – związki pochodzenia głównie roślinnego, będące powszechnym składnikiem pokarmowym w zbilansowanej diecie człowieka [75,76]. Ich budowa chemiczna w większości przypadków opiera się na szkielecie flawonu lub izoflawonu i różni się od siebie rodzajem i położeniem podstawnika. Flawonoidy są znane ze swojej kompleksowej aktywności biologicznej, obejmującej właściwości zarówno antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, jak i przeciwdrobnoustrojowe. Zaletą ich stosowania w leczeniu jest bardzo niska toksyczność, a także synergistyczne działanie z antybiotykami.

Mechanizm oddziaływania flawonoidów z ureazą zależy od struktury szkieletu głównego oraz rodzaju podstawników. Dla flawonoidów zawierających ugrupowanie katecholowe zaobserwowano kowalencyjny mechanizm inhibicji opierający się na tworzeniu wiązania z resztą cysteiny [77].

W związku z powszechnością występowania flawonoidów w środowisku naturalnym stały się one składnikami medycyny niekonwencjonalnej. Powszechnie znane są cenne właściwości lecznicze takich roślin jak: mącznica lekarska, mniszek lekarski, pokrzywa, skrzyp polny, zielona herbata, pietruszka, kurkuma, żurawina, borówka brusznica oraz wiele innych. Zawierają one substancje aktywne, w tym także z grupy flawonoidów. Ziołolecznictwo znalazło duże zastosowanie, w tym we wspomaganie leczenia infekcji dróg moczowych. Substancje aktywne zawarte w składzie roślin mają działanie moczopędne zwiększając diurezę oraz obniżając wartość pH moczu powodując niekorzystne środowisko rozwoju dla patogenów.

W naukowej literaturze można znaleźć wiele przykładów dotyczących zastosowania ziołolecznictwa dla obniżenia aktywności ureaz. Przykładowo, dla potwierdzenia skuteczności leczenia wrzodów żołądka ekstraktem z kwiatów rośliny *Lonicera japonica* (znanej jako wiciokrzew japoński – ozdobny krzew popularny w tradycyjnej medycynie azjatyckiej) przeprowadzono testy

aktywności biologicznej *in vitro* surowych preparatów wobec *H. pylori* [77]. Wykazano, że pąki kwiatowe rośliny mogą zawierać nawet 15 różnych flawonoidów, a do najefektywniejszych należą luteolina i kwercetyna, będące głównymi substancjami aktywnymi (Rysunek 9). Zbadano ekstrakt roślinny, wyizolowane z niego w procesie ekstrakcji alkoholowej surowe flawonoidy oraz dla porównania czyste substancje aktywne. Zaobserwowano umiarkowaną aktywność przygotowanych preparatów wobec ureazy z *H. pylori*, potwierdzającą ich wpływ na proces leczenia, co stanowi ciekawe uzupełnienie medycyny konwencjonalnej.

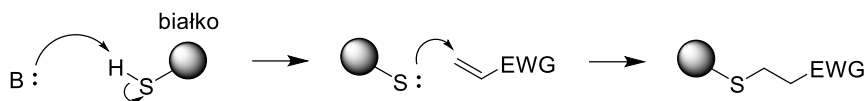
ekstrakt z kwiatów rośliny <i>L. japonica</i>	IC <sub>50</sub> = 2195 μM
wyzolowane w procesie ekstrakcji surowe flawonoidy z kwiatów rośliny <i>L. japonica</i> (57% zawartości flawonoidów)	IC <sub>50</sub> = 946 μM
 <p><b>58</b>, Luteolina, IC<sub>50</sub> = 35 μM</p>	 <p><b>59</b>, Kwercetyna, IC<sub>50</sub> = 11 μM</p>

**Rysunek 9. Aktywność surowych preparatów roślinnych oraz czystych flawonoidów wobec ureazy z *H. pylori*.**

### 2.2.2.3. Układy $\alpha,\beta$ -nienasycone

Kolejną grupą związków o interesującej reaktywności względem grupy tiolowej cysteiny są  $\alpha,\beta$ -nienasycone układy karbonylowe/karboksyłowe: w wyniku ataku nukleofilowego w produkcie ich reakcji powstaje nowe wiązanie węgiel-siarka w pozycji  $\beta$  (Schemat 11). Jest to wariant znanej reakcji,

nosi nazwę addycji tia-Michaela i wymaga obecności katalizatora (najczęściej zasadowego, np. wodorowęglany, aminy, aminokwasy).

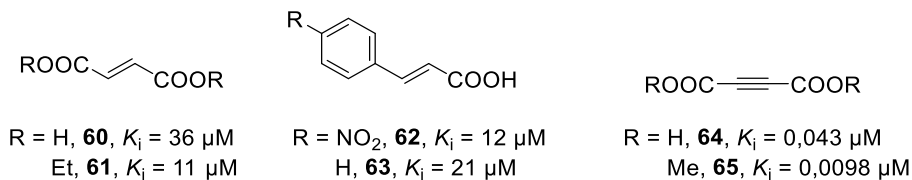


**Schemat 11. Ogólny mechanizm reakcji tia-Michaela.**

Reaktywność obu substratów przekłada się na zdolność inhibicji enzymu. Szybkość reakcji jest zależna od zasadowości tiolu, mocy zasady, polarności rozpuszczalnika, a także struktury przestrzennej reagentów – obecność sterycznie rozbudowanych podstawników w pozycjach  $\alpha$  i  $\beta$  akceptora Michaela oraz wokół centrum nukleofilowego może utrudniać reakcję. Ostatni parametr należy szczególnie rozważyć podczas planowania i projektowania struktur inhibitorów o takim mechanizmie działania.

Przykładem układów  $\alpha,\beta$ -nienasyconych testowanych wobec ureaz są pochodne kwasu akrylowego i propargilowego (**60-65**) (Rysunek 10) [53]. Zsyntetyzowano kilkadziesiąt stosunkowo prostych cząsteczek zawierających grupy funkcyjne przy wiązaniu podwójnym (o różnej stereoizomerii, *E* lub *Z*) lub potrójnym. Związki zbadano pod kątem ich aktywności hamującej aktywność ureazy ze *S. pasteurii* wykazując w kilku przypadkach nanomolarną wartość stałej inhibicji. Na szczególną uwagę zasłużył kwas acetylenodikarboksylowy (**64**), który oprócz bardzo niskiej stałej inhibicji cechował się także brakiem cytotoksyczności wobec komórek ssaczych. Co więcej, przeprowadzone modelowanie molekularne wykazało, że jego efektywny sposób wiązania może opierać się na jednoczesnym wiązaniu z resztą cysteiny i koordynowaniu kationów niklu w centrum aktywnym.





**Rysunek 10. Aktywność układów  $\alpha,\beta$ -nienasyconych wobec ureazy ze *S. pasteurii*.**

#### 2.2.2.4. Jony metali ciężkich

Jony metali ciężkich również skutecznie hamują aktywność ureaz bakteryjnych, w szczególności jony rtęci(II), srebra(I) oraz miedzi(II) są uznawane za najsilniejsze inhibitory w tej grupie związków [34,78]. Ich mechanizm wiązania w centrum aktywnym nie jest jednoznacznie poznany [79]. Najczęściej uważa się, że jest on wolnowiążący niekompetycyjny i obejmuje głównie oddziaływanie jonów metali z grupami tiolowymi enzymu. W wyniku tego tworzone są toksyczne nierozpuszczalne siarczki, co stanowi przeciwwskazanie dla ich stosowania. Oprócz reaktywności wobec grup tiolowych zaobserwowano, że jony  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ag}^+$  posiadają także zdolność do interakcji z innymi resztami aminokwasowymi poprzez koordynowanie atomu azotu w histydynie oraz atomu tlenu w kwasie asparaginowym i glutationowym [80]. Niemniej jednak pomimo dobrej aktywności wobec ureaz tylko związki bizmutu (kompleks  $\text{Bi}(\text{EDTA})$   $K_i = 2,5 \text{ mM}$  wobec ureazy z *K. aerogenes* [81]) zostały uznane za bezpieczne w stosowaniu.

#### 2.2.3. Podsumowanie

Opracowano wiele rodzajów inhibitorów ureaz, aczkolwiek pomimo mnogości dotychczasowych rozwiązań, niekorzystne zjawisko oporności antybiotykowej szczepów bakteryjnych ciągle inspiruje rozwój tej tematyki.

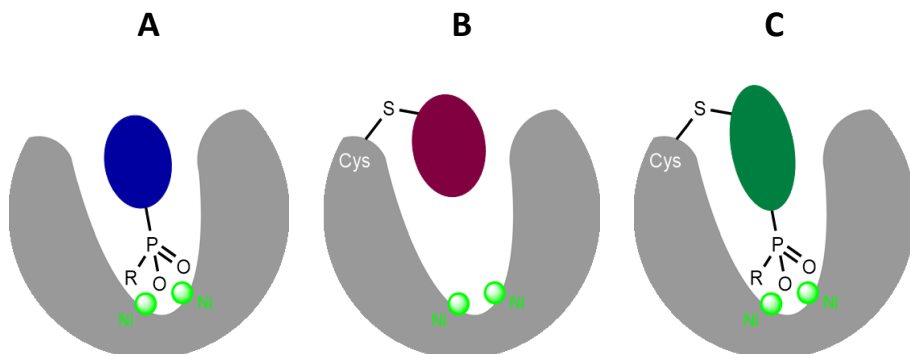
Zdolność do różnorodnych oddziaływań w centrum aktywnym ureazy stwarza ogromne możliwości modyfikacji istniejących rozwiązań i poszukiwania efektywniejszych, które będą stanowić alternatywne narzędzie regulowania aktywności ureazy. Istotą powodzenia badań jest odpowiednio zaprojektowana struktura inhibitora, która najbardziej dopasuje się do centrum aktywnego enzymu tworząc silną sieć oddziaływań oraz ewentualnie wiązań chemicznych. Jak wynika z przykładów literaturowych nawet niewielka zmiana w strukturze inhibitora może spowodować diametralną różnicę w efektywności inhibicji. Przyczyną jest wymagająca sterycznie budowa przestrzenna centrum aktywnego enzymu, zdolna akceptować jedynie stosunkowo mało rozbudowane cząsteczki. Dlatego tak ważne jest prowadzenie kompleksowych badań w oparciu o racjonalne projektowanie oraz tworzenie dużych bibliotek związków. Szczególnie istotne jest także przeprowadzanie testów aktywności biologicznej na enzymach różnego pochodzenia – nawet subtelna różnica w budowie miejsca aktywnego ma znaczący wpływ na siłę inhibicji, a w konsekwencji na selektywność działania związku. Oprócz powyższych aspektów należy pamiętać o aspektach aplikacyjnych, których podstawą jest bezpieczeństwo stosowania. Ważną kwestią są badania cytotoksyczności określające wpływ nowych struktur na funkcjonowanie organizmów oraz środowiska.

Podsumowując, poszukiwanie skutecznych inhibitorów ureazy jest podejściem wieloaspektowym. Wymaga od naukowców znajomości podstawowej biochemii enzymu, racjonalnego projektowania nowych struktur (coraz częściej w oparciu o modelowanie molekularne), znajomości możliwości syntetycznych i projektowania indywidualnych szlaków syntezy oraz prowadzenia szeroko zakrojonych testów biologicznych. Ciągły rozwój tej dziedziny prowadzi do doskonalenia rozwiązań oraz lepszego zrozumienia mechanizmów inhibicji ureazy.

### 3. BADANIA WŁASNE

#### 3.1. Cel badań

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie nowej klasy inhibitorów ureaz o unikalnym sposobie działania. W szerokim kontekście projekt ten motywowany był ograniczeniami uniwersalnych środków przeciwdrobnoustrojowych, które prowadzą do rozwoju oporności bakterii na dostępne antybiotyki. Pomimo wieloletnich badań, nadal brakuje inhibitorów ureazy, które łączą wysoką skuteczność, stabilność i bezpieczeństwo stosowania. Opracowywanie nowych inhibitorów ureazy pozostaje ogromnym wyzwaniem, które pomoże usprawnić profilaktykę i terapię wielu chorób wywołanych przez patogeny wykorzystujące ureazę jako czynnik wirulencji.

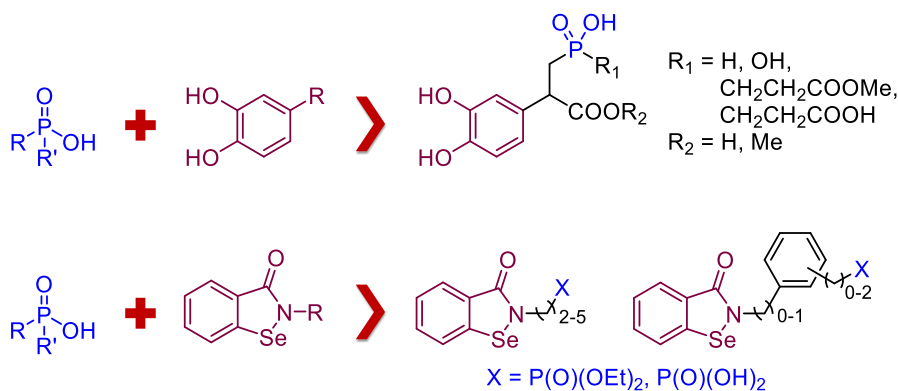


**Rysunek 11. Modele mechanizmów hamowania ureazy w miejscu aktywnym opartych na (A) oddziaływaniu grupy fosfonowej/fosfinowej z jonami niklu lub (B) tworzeniu wiązania kowalencyjnego z resztą cysteiny tworzącą strukturę „klapki” zamykającej miejsce aktywne po związaniu substratu (Cys322 w przypadku enzymu ze *S. pasteurii*) oraz (C) proponowany mechanizm jednoczesnej interakcji z oboma miejscami kluczowymi dla aktywności ureazy.**

Zwiększenie selektywności inhibitorów zmniejsza ich cytotoksyczność, a tym samym minimalizuje ryzyko powstawania skutków ubocznych. Obecność specyficznych oddziaływań wpływa na skuteczność działania inhibitora i jest podstawą projektowania nowych związków biologicznie czynnych. Opierając się na określonych elementach strukturalnych/funkcjonalnych w swoich badaniach zaproponowałam połączenie ich mechanizmów wiązania w centrum katalitycznym ureazy w celu otrzymania nowych zaawansowanych ligandów enzymu (Rysunek 11). Planowano sprawdzić aktywność związków względem modelowego oczyszczonego enzymu bakteryjnego, wydzielonego z bakterii *S. pasteurii*, a także działanie antyureolityczne względem całych komórek używając linii *H. pylori*.

### 3.2. Struktury inhibitorów

Podstawowym wyzwaniem postawionym przede mną było zaprojektowanie struktur, które miałyby zdolność do tworzenia zarówno kowalencyjnych, jak i niekowalencyjnych interakcji w centrum aktywnym enzymu. Opierając się częściowo na danych literaturowych [41,73,74] zaproponowałam połączenie konkretnych ugrupowań, tj. grupy fosfonowej/fosfinowej dedykowanej koordynowaniu jonów niklu z fragmentem katecholu lub 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu, które są reaktywne względem tioli (Schemat 12).

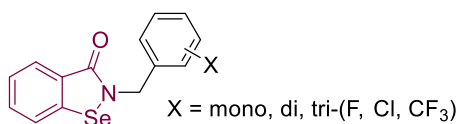


**Schemat 12. Ogólna idea konstrukcji fosforoorganicznych pochodnych katecholu lub 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu jako nowych inhibitorów ureazy.**

W strukturze fosforowych pochodnych katecholu zastosowałam łącznik zawierający dwa atomy węgla między kluczowymi fragmentami struktury. Dodatkowo inhibitory były funkcjonalizowane grupą lub grupami karboksylowymi zdolnymi do tworzenia wiązań wodorowych z innymi, głównie zasadowymi resztami aminokwasowymi w centrum aktywnym enzymu [74]. Natomiast w przypadku fosforowych pochodnych 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu zastosowałam szeroki wybór łączników alifatycznych, alifatyczno-aromatycznych oraz aromatycznych. Badania te uzyskały finansowanie w ramach projektu OPUS 16 pt. „Inhibitory ureazy o podwójnym mechanizmie

działania i ich aktywność przeciwwirulentna względem *Helicobacter pylori* i *Cryptococcus neoformans*” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, kierowanego przez promotora rozprawy.

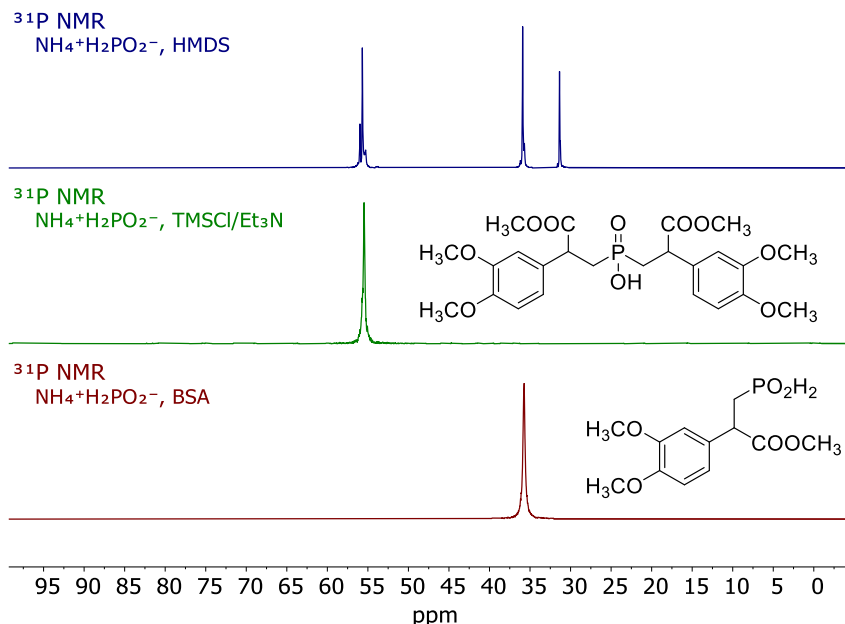
Dodatkowo, nawiązując do wysokiej aktywności chlorowanych pochodnych ebselenu, co przypisano tworzeniu specyficznych wiązań wodorowych oraz oddziaływań typu  $\pi$  [69], zaproponowałam syntezę halogenowych pochodnych *N*-benzylo-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu, zawierających różną liczbę oraz położenie atomów chloru, fluoru lub grupy trifluorometylowej (Rysunek 12). Projekt ten miał na celu zbadanie, jakie pozycje podstawników będą najefektywniejsze w oddziaływaniu z centrum aktywnym enzymu. Głównym celem było jednak otrzymanie związków bardzo dobrze działających przeciw patogennym liniom komórkowym bakterii wykazujących aktywność ureolityczną. Wspomniane pochodne ebselenu, mimo że o wyjątkowo wysokim powinowactwie względem natywnego enzymu ze *S. pasteurii* [69], nie odzwierciedliły tego potencjału w testach względem całych komórek *H. pylori*. Pochodne benzyloowe oraz alkilowe 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu okazały się ciekawsze pod tym względem (dane nieopublikowane). Dlatego postanowiłam połączyć pozytywne cechy różnych grup związków selenoorganicznych w zmodyfikowanej strukturze.



**Rysunek 12. Struktura halogenowych pochodnych *N*-benzylo-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu.**



aktywacja soli amonowej kwasu podfosforowego prowadząca do otrzymania podfosforynu bis(trimetylosililowego) (Rysunek 13).



**Rysunek 13. Zestawienie widm  $^{31}\text{P}$  NMR surowych mieszanin poreakcyjnych otrzymanych w reakcjach tworzenia produktu P1.3 z różnymi odczynnikami sililującymi sól amonową kwasu podfosforowego.**

Zastosowanie heksametylodisilazanu (HMDS) w wysokiej temperaturze doprowadziło do powstania złożonej mieszaniny, która zawierała pożądany produkt P1.3, ale również między innymi jego utlenioną formę (kwas fosfonowy P1.6, Schemat 14) oraz produkt podwójnej addycji P1.4 (Schemat 14). Aktywacja podfosforynu amonu chlorotrimetylosilanem (TMSCl) w środowisku zasadowym dawała głównie produkt podwójnej addycji. Zastosowanie *N,O*-bis(trimetylosililo)acetamidu (BSA) okazało się najdogodniejsze i po metanolizacji estru sililowego, będącego produktem pośrednim addycji  $\text{HP}(\text{OSiMe}_3)_2$  do akrylanu, otrzymano głównie kwas H-fosfinowy P1.3 z zadowalającą wydajnością. Jak wspomniano, przy zastosowaniu tej metody



produkt uboczny P1.4 powstał w ilości mniejszej niż 10%, aczkolwiek struktura ta również wydała mi się interesująca w kontekście zastosowania. Dlatego postanowiłam ją wyizolować, scharakteryzować, a także użyć do dalszych przekształceń.

### 3.3.2. Modyfikacje kwasu H-fosfinowego i odblokowanie grup funkcyjnych

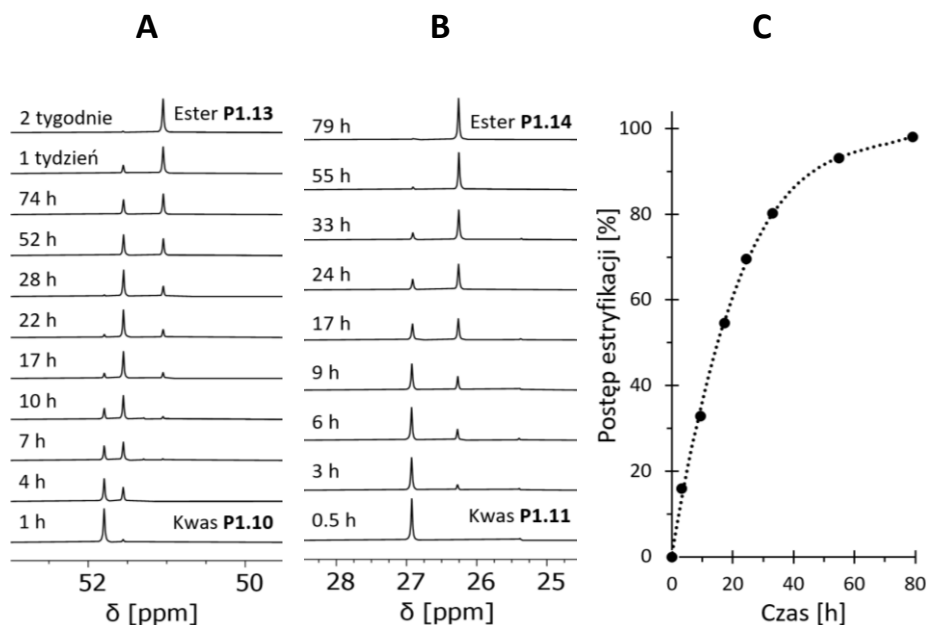
W kolejnym etapie przeprowadziłam modyfikacje wiązania P-H kwasu H-fosfinowego (Schemat 14). Wydłużony kwas fosfinowy P1.5 zsyntetyzowałam w reakcji addycji fosfa-Michaela aktywowanego (za pomocą  $\text{TMSCl}$ ) związku P1.3 do akrylanu metylu [82]. Natomiast kwas fosfonowy P1.6 otrzymałam w wyniku utlenienia P1.3 za pomocą  $\text{DMSO}$  z dodatkiem  $\text{I}_2$  [83].

Kończącym etapem procedury było usunięcie grup ochronnych: rozszczepienie lub hydroliza eterów katecholowych i estrów karboksylowych. Całkowite demetylowanie związków P1.4-6 przeprowadziłam przy użyciu tribromku boru w wyniku czego otrzymałam kwasy P1.7, P1.10 oraz P1.11. Podczas oczyszczania chromatograficznego mieszanin poreakcyjnych wyizolowałam związki P1.8 oraz P1.12. Związek P1.8 zidentyfikowałam jako produkt chemoselektywnego usunięcia grup metylowych z eterów katecholowych substratu P1.4 (z zachowaniem estrów), natomiast P1.12 – jako produkt elektrofilowego podstawienia pierścienia aromatycznego atomem bromu. Demetylowanie grup w związku P1.3 przeprowadziłam stosując zoptymalizowane przeze mnie ogrzewanie wspomagane mikrofalami w mieszaninie stężonego kwasu solnego i lodowatego octowego otrzymując produkt P1.9. Warunki te zastosowałam również referencyjnie w hydrolizie związku P1.6, co spowodowało wzrost wydajności produktu P1.11 (z 32% z użyciem  $\text{BBR}_3$  do 46%) i zmniejszenie ilości zanieczyszczeń. Ze względu na łatwość przeprowadzenia, krótki czas reakcji i zmniejszenie



W próbach demetylowania substratów P1.5 i P1.6 przy użyciu trichlorku boru nie udało mi się wydzielić produktów selektywnej reakcji, tj. estrów karboksylowych zawierających wolne ugrupowanie katecholu. Zgodnie z założeniami związki te, obok kwasów, powinny by ciekawymi strukturami w kontekście aktywności biologicznej. Dlatego związki P1.13 i P1.14 zdecydowałam się zsyntetyzować z otrzymanych już wcześniej kwasów P1.10 i P1.11. Zaskakująco, zastosowanie standardowej estryfikacji w metanolu z chlorkiem tionylu dawało mieszaniny substratu i produktu w zmieniających się proporcjach. Zauważyłam, że podczas chromatograficznego oczyszczania czy wykonywania pomiarów widm NMR estry okazywały się bardzo wrażliwe na hydrolizę, nawet w obecności śladowych ilości wody zawartej w rozpuszczalnikach w temperaturze pokojowej. Przepuszczalnie reakcja ta była procesem autokatalitycznym, w którym rolę odgrywają grupy kwasowe zawarte w cząsteczce substratu. Potwierdzenie uzyskałam rozpuszczając próbki estrów w wodzie i obserwując szybką hydrolizę składnika estrowego, co powodowało zmianę sygnału na widmie  $^{31}\text{P}$  NMR.

Obserwacja ta nasunęła mi pomysł estryfikacji w oparciu o podobny mechanizm, tj. spontaniczną reakcję w czystym rozpuszczalniku. Idea okazała się słuszna, co udowodniłam rozpuszczając kwasy w metanolu i przeprowadzając serię pomiarów widm NMR w czasie, mierząc tym samym postęp reakcji (Rysunek 14). W przypadku kwasu P1.10 reakcja przebiegała etapami. Estryfikacja jednej grupy karboksylowej nastąpiła w ciągu około 24 godzin, podczas gdy estryfikacja mniej reaktywnej grupy trwała około 2 tygodnie (Rysunek 14A). Natomiast całkowitą estryfikację kwasu P1.11 osiągnięto po około 80 godzinach (Rysunek 14B).

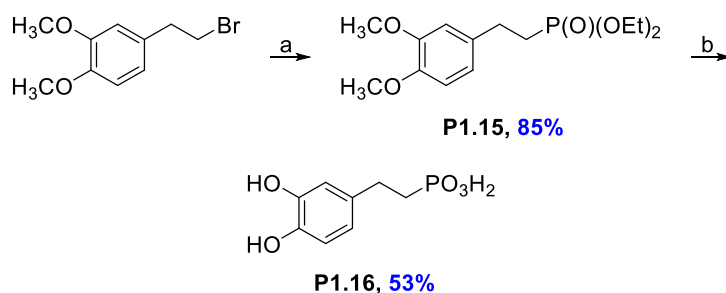


**Rysunek 14. Przebieg estryfikacji kwasu P1.10 prowadzącej do P1.13 (A) oraz P1.11 do P1.14 (B, C), na podstawie widm  $^{31}\text{P}$  NMR.**

Z podanych powyżej powodów związków tych nie byłam w stanie wyizolować i scharakteryzować. Wykonałam jedynie widma masowe potwierdzające poprawność struktur. W kontekście pomiarów aktywności biologicznej należało zapobiec hydrolizie estrów w wodzie. Dlatego dodatkowo przeanalizowałam wpływ buforu pomiarowego (3 mM bufor fosforanowy, pH 7) na szybkość hydrolizy. Na podstawie analizy widm NMR stwierdziłam, że stabilność związków jest zachowana (poniżej 5% hydrolizy w ciągu 3 dni). Zatem po estryfikacji, metanolewe roztwory estrów rozcieńczano bezpośrednio w buforze pomiarowym do odpowiedniego stężenia i natychmiast poddano testom aktywności biologicznej. Potwierdziło to pośrednio autokatalityczny wpływ grup kwasowych – ich buforowanie hamowało proces hydrolizy.

Wobec napotkanych problemów z reaktywnością grup karboksylowych postanowiłam sprawdzić, czy ich obecność jest niezbędna dla spodziewanej

aktywności antyureolitycznej. Wymagało to syntezy analogu wybranej pochodnej katecholowej, np. kwasu fosfonowego, o uproszczonej strukturze. W tym celu przeprowadziłam reakcję Arbuzowa 4-(2-bromoetylo)-1,2-dimetoksybenzenu z fosforem trietylowym (Schemat 15). Następnie otrzymany ester P1.15 poddałam hydrolizie w warunkach kwasowych otrzymując produkt końcowy P1.16.



(a)  $\text{P}(\text{OEt})_3$ ,  $140^\circ\text{C}$ , 2 h, MW, (b)  $\text{HCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $140^\circ\text{C}$ , 20 min, MW

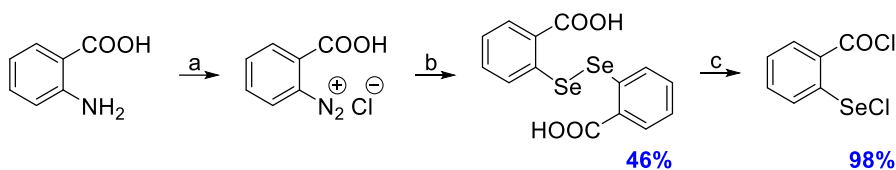
**Schemat 15. Synteza fosfonowej pochodnej zawierającej fragment katecholu, pozbawionej grupy karboksylowej.**

### 3.4. Fosfonowe pochodne *N*-podstawionego 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu

W kolejnym projekcie podjęłam się syntezy fosfonowych pochodnych *N*-podstawionego 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu. Jedną z podstawowych metod ich otrzymywania jest zamykanie pięcioczłonowego pierścienia heterocyklicznego w reakcji chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu z aminami pierwszorzędowymi [84]. W celu uzyskania struktur zaplanowanych w niniejszej pracy (Schemat 12) przeprowadziłam syntezy zarówno kluczowego substratu selenoorganicznego (Podrozdział 3.4.1), jak i zestawu różnych aminofosfonianianów (Podrozdział 3.4.2).

#### 3.4.1. Synteza chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu

Reagent selenoorganiczny otrzymałam w wyniku czteroetapowej syntezy, którą rozpocząłam od otrzymania diselenku disodu w reakcji sproszkowanego selenu z metanolanem sodu w obecności hydrazyny. Następnie przeprowadziłam diazowanie grupy aminowej kwasu antranilowego a otrzymaną sól diazoniową poddałam reakcji z wcześniej otrzymanym komponentem selenowym (Schemat 16) [85]. Otrzymany kwas 2,2'-diselenobisbenzoesowy oczyściłam poprzez rekrytalizację w 1,4-dioksanie, a następnie przekształciłam w chlorek 2-(chloroseleno)benzoilu w reakcji z chlorkiem tionylu. Produkt oczyściłam przez rekrytalizację w heksanie.

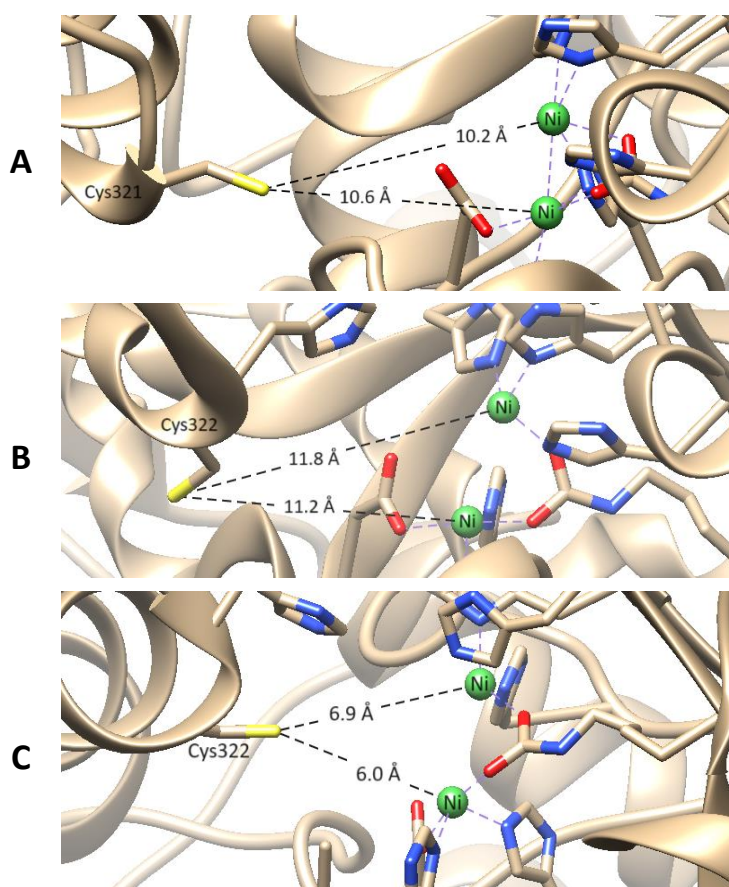


(a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , (b) 1.  $\text{Na}_2\text{Se}_2$ ,  $-5^\circ\text{C}$ , 2.  $\text{HCl}$ , (c)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{DMF}$ , t.w.

**Schemat 16. Synteza chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu.**

### 3.4.2. Synteza aminofosfonianów

Zaplanowałam kilka typów łączników pomiędzy grupą aminową a fosfonową. Każdy z nich charakteryzował się różną długości i/lub różną izomerią konstytucyjną. Zakres optymalnej długości linkera oszacowałam poprzez wyznaczenie odległości pomiędzy atomem siarki grupy tiolowej w cysteinie (znajdującej się na wejściu do centrum aktywnego ureazy, Cys321 w ureazie z *H. pylori*, Cys322 w ureazie ze *S. pasteurii*) a kationami niklu, w oparciu o struktury krystaliczne odpowiednich enzymów (Rysunek 15).

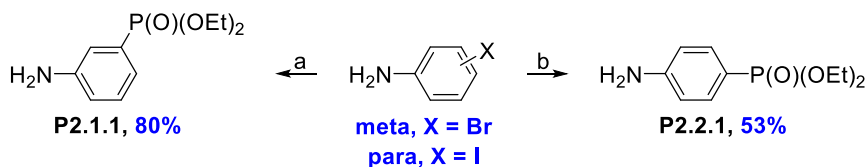


**Rysunek 15.** Odległość atomu siarki grupy tiolowej w cysteinie kluczowej dla zmian konformacyjnych białka od kationów niklu w ureazie z *H. pylori* (A: struktura PDB 1E9Y) oraz ze *S. pasteurii* (B: struktura PDB 2UBP, konformacja otwarta, C: struktura PDB 3UBP, konformacja zamknięta).

Długość ta zależała od konformacji miejsca aktywnego enzymu (otwarta bądź zamknięta), a także od źródła pochodzenia białka, dlatego docelowe związki zostały wybrane w szerokim zakresie długości linkera. Ponieważ proponowane aminofosfoniany zawierały różne kombinacje alifatycznej bądź aromatycznej grupy fosfonowej oraz aminowej, dla poszczególnych wariantów zaplanowałam indywidualne warunki syntezy estrów dietylowych tych związków w zależności od dostępnych substratów.

### 3.4.2.1. Aminofenylofosfoniany

Aminofenylofosfoniany P2.1.1 i P2.2.1 otrzymałam w wyniku katalizowanych związkami palladu reakcji sprzęgania krzyżowego halogenopochodnych z komponentami fosforowymi. Pierwszą wykonałam reakcję fosforylowania 4-jodoaniliny z użyciem fosforynu trietylu w obecności chlorku palladu(II) w wodzie. Pomimo dokładnego zastosowania literaturowych warunków reakcji, nie udało mi się odtworzyć bardzo dobrej wydajności reakcji [86]. W związku z tym dla pochodnej *meta* zaproponowałam inną reakcję sprzęgania z zastosowaniem 3-bromoaniliny, fosforynu dietylowego i octanu palladu(II), która w rezultacie spowodowała lepszą konwersję (Schemat 17).



(a)  $\text{HP}(\text{O})(\text{OEt})_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{EtOH}$ , t.w.

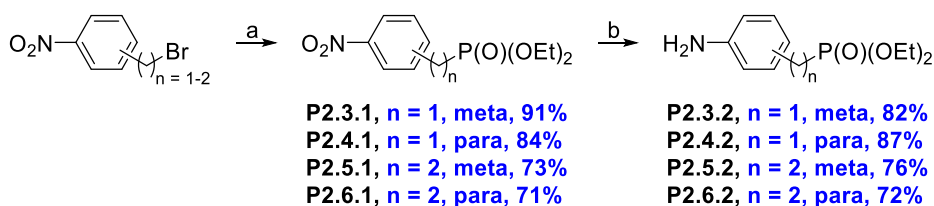
(b)  $\text{P}(\text{OEt})_3$ ,  $\text{PdCl}_2$ , TBAB,  $n\text{-Pr}_3\text{N}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , t.w.

**Schemat 17. Synteza aminofenylofosfonianów dietylowych.**



### 3.4.2.2. (Aminofenylo)alkilofosfoniany

W przypadku aminofosfonianów z łącznikiem benzylovym lub fenetylovym syntezę rozpoczęłam od handlowo dostępnych bromków benzylu lub fenetylu z ugrupowaniem nitrowym w pozycji *meta* lub *para* (Schemat 18). Pierwszym etapem była reakcja Arbuzowa. Przeprowadziłam ogrzewanie bromków z fosforynem trietylu wspomagane mikrofalami, co doprowadziło do uzyskania fosfonianów P2.3.1-P2.6.1 z bardzo dobrymi wydajnościami. Analizując stopień konwersji każdego z nich zauważyłam, że pochodne benzylove były nieco bardziej reaktywne od fenetylowych, a także pochodne *meta* od *para*. W kolejnym etapie wykonałam redukcję grupy nitrowej przy użyciu chlorku cyny(II) otrzymując aminofosfoniany P2.3.2-P2.6.2 z bardzo dobrymi wydajnościami, również wyższymi dla pochodnych benzylovych.



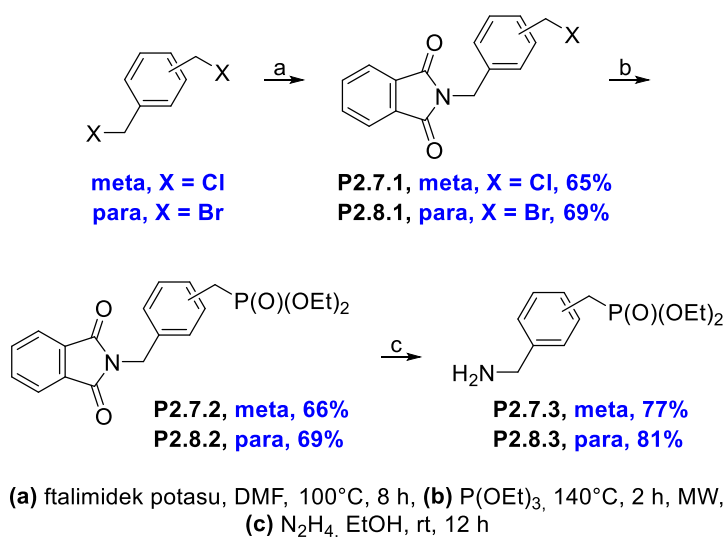
(a) P(OEt)<sub>3</sub>, 140°C, 2 h, MW, (b) SnCl<sub>2</sub>, HCl, EtOH, 60°C, 2 h

### Schemat 18. Synteza (aminofenylo)alkilofosfonianów dietylowych.

### 3.4.2.3. (Aminometylofenylo)metylofosfoniany

Kolejne aminofosfoniany otrzymałam w wyniku syntezy Gabriela, polegającej na otrzymywaniu amin z pierwszorzędowych halogenków alkilowych, z zastosowaniem ftalimidku potasu (Schemat 19). Aby uzyskać zaplanowany układ strukturalny użyłam dichloropochodnej *m*-ksylenu oraz dibromopochodnej *p*-ksylenu. W pierwszej kolejności przeprowadziłam reakcję substytucji nukleofilowej nadmiaru halogenopochodnej z ftalimidkiem potasu,

otrzymując ftalimidy P2.7.1 oraz P2.8.1. Następnie obecność drugiego atomu halogenu umożliwiła mi otrzymanie fosfonianów P2.7.2 oraz P2.8.2 w reakcji Arbuzowa z fosforynem trietylu. Ostatnim etapem była hydrazynoliza układu ftalimidowego. Ze względu na konieczność zachowania zestryfikowanej grupy fosfonianowej nie brałam pod uwagę możliwości przeprowadzenia hydrolizy w warunkach kwasowych lub zasadowych.

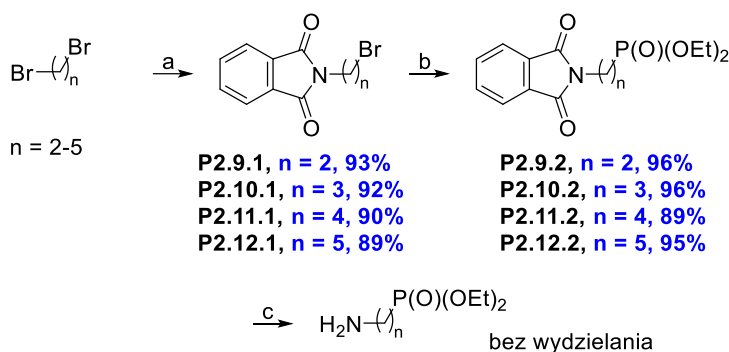


**Schemat 19. Synteza (aminometylofenylo)metylofosfonianów dietylowych.**

#### 3.4.2.4. ω-Aminoalkilofosfoniany

ω-Aminoalkilofosfoniany dietylowe otrzymałam w analogicznej sekwencji reakcji jak (aminometylofenylo)metylofosfoniany (Schemat 20). Zarówno produkty alkilowania – bromki alkilowe z ugrupowaniem ftalimidowym P2.9.1-P2.12.1, jak i odpowiadające im alkilofosfoniany P2.9.2-P2.12.2 wydzieliłam z bardzo wysokimi wydajnościami, które w większości przypadków przekroczyły 90%. Po hydrazynolizie napotkałam jednak problemy z doczyszczaniem surowych mieszanin aminoalkilofosfonianów. Trudnością

w chromatografii był brak ugrupowań absorbujących promieniowanie z zakresu pracy detektora, a w ekstrakcji – zaskakująco duża rozpuszczalność tych związków w wodzie. Spróbowałam także wydzielać je w postaci chlorowodorków amoniowych, jednakże podejście to także nie przyniosło zadowalających wyników ze względu na wysoką higroskopijność soli. We wszystkich metodach oczyszczania pojawiały się dodatkowe zanieczyszczenia, z których udało mi się zidentyfikować produkt częściowej hydrolizy estru fosfonowego. W związku z powyższymi problemami, a także ze względu na zadowalającą homogeniczność surowych mieszanin po hydrazynolizie, zdecydowałam się użyć surowe aminoalkilofosfoniany w dalszym etapie.



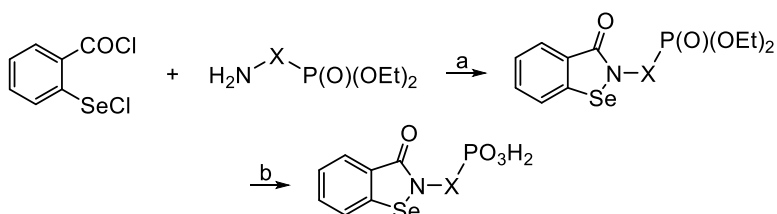
(a) ftalimidek potasu, DMF, 100°C, 8 h, (b)  $\text{P}(\text{OEt})_3$ , 140°C, 2 h, MW, (c)  $\text{N}_2\text{H}_4$ , EtOH, rt, 12 h

### Schemat 20. Synteza ω-aminoalkilofosfonianów dietylowych.

#### 3.4.3. Synteza 1,2-benzisoselenazol-3(2H)-onów i hydroliza estrów fosfonowych

W kolejnym etapie przeprowadzałam reakcję otrzymanych aminofosfonianów z chlorkiem 2-(chloroseleno)benzoilu (Schemat 21). Reakcja ta przebiegała w temperaturze pokojowej, a jej wydajność zależna była

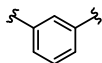
od charakteru aminy (aromatyczna/alifatyczna) i czasu prowadzenia reakcji, dlatego zdecydowałam się go znormalizować do 48 godzin. Niezwykle ważnym elementem było zastosowanie bezwodnego rozpuszczalnika oraz ściśle zachowanie zasadowych warunków, które zapewniał nadmiar aminy III-rzędowej. Amina wiązała wydzielający się chlorowódor, w przeciwnym razie powstający pierścień ulegał otwarciu.



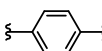
(a) Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 48 h, (b) CH<sub>3</sub>COOH, HCl, 140°C, 20 min, MW

X =

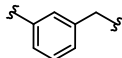
P2.1.2, 53%  
P2.1.3, 60%



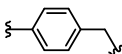
P2.2.2, 74%  
P2.2.3, 65%



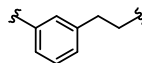
P2.3.3, 70%  
P2.3.4, 48%



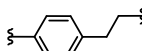
P2.4.3, 66%  
P2.4.4, 53%



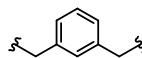
P2.5.3, 56%



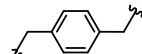
P2.6.3, 61%



P2.7.4, 52%



P2.8.4, 56%

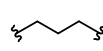


tylko estry

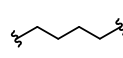
P2.9.3, 63%  
P2.9.4, 59%



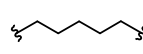
P2.10.3, 68%  
P2.10.4, 63%



P2.11.3, 73%  
P2.11.4, 66%



P2.12.3, 81%  
P2.12.4, 70%

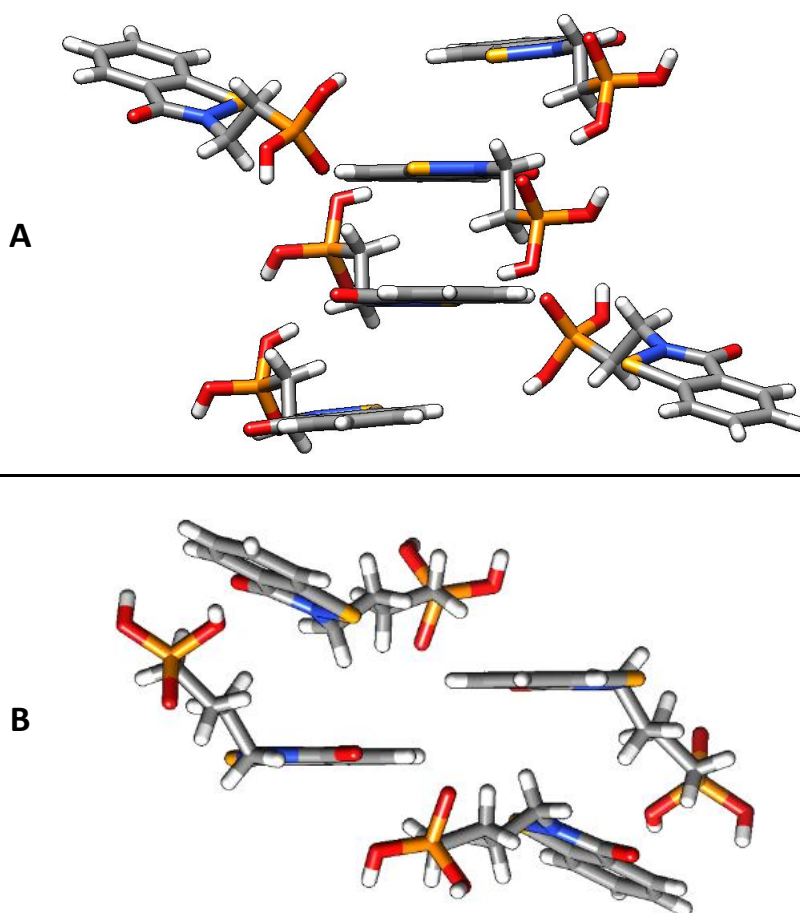


**Schemat 21. Synteza fosfonowych pochodnych *N*-podstawionego 1,2-benzoselenazol-3(2*H*)-onu.**

Ostatnim etapem procedury była hydroliza grup estrowych. W pierwszej kolejności spróbowałam transestryfikacji bromotrimetylosilanem (TMSBr) i następnie metanolizy, jednak metoda ta przyniosła złożone mieszaniny poreakcyjne. Oczekiwany produkt powstawał w niewielkim stopniu,

co prawdopodobnie było skutkiem nietrwałości pierścienia selenazolonu wobec bromowodoru. W celu złagodzenia warunków spróbowałam użyć TMSBr z dodatkiem trietyloaminy, co jednak prowadziło jedynie do monoestrów fosfonowych. Spróbowałam także odwrócenia sekwencji reakcji: hydroliza aminofosfonianów dietylowych do kwasów fosfonowych a następnie ich użycie w reakcji z chlorkiem 2-(chloroseleno)benzoilu. W tym przypadku trudno było jednak dobrać dobry rozpuszczalnik dla aminokwasu, a wydajność aminolizy chlorku była niska. Skutecznym podejściem okazało się zastosowanie zoptymalizowanego ogrzewania estrów wspomaganego mikrofalami w mieszaninie stężonego kwasu solnego i lodowatego octowego. Krótki czas reakcji wpłynął korzystnie na zmniejszenie ilości powstających produktów ubocznych, co umożliwiło bezproblemowe oczyszczenie otrzymanych kwasów z zastosowaniem chromatografii HPLC na odwróconej fazie.

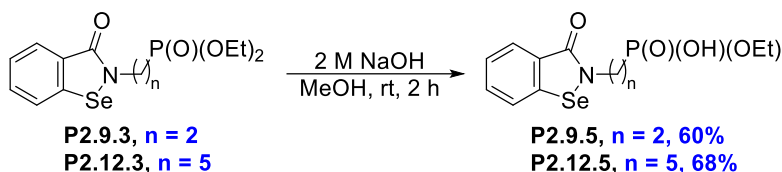
Większość związków miała postać krystaliczną, w tym dla dwóch kwasów fosfonowych (P2.9.4 oraz P2.11.4) otrzymałam monokryształy w formie charakterystycznych igieł, co pozwoliło wyznaczyć ich struktury krystaliczne przez Panią dr inż. Julię Bąkiewicz z Instytutu Materiałów Zaawansowanych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Dokonane pomiary umożliwiły zobrazowanie struktur przestrzennych, które różniły się od siebie upakowaniem i wzajemnym rozmieszczeniem cząsteczek (Rysunek 16). Związek P2.9.4 tworzył bardziej zwartą sieć krystaliczną, a płaskie aromatyczne fragmenty 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu układały się równolegle względem siebie, co wskazało na dominujące oddziaływania typu *face to face*. W przypadku związku P2.11.4 pierścień aromatyczny jest ułożony naprzeciw grupy fosfonowej.



**Rysunek 16. Struktura przestrzenna otrzymanych kryształów związków P2.9.4 (A) oraz P2.11.4 (B).**

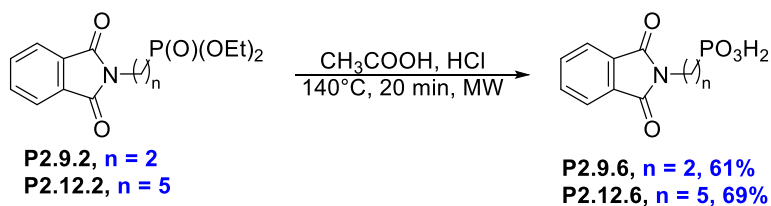
W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymałam 12 estrów oraz 8 kwasów fosfonowych. Ponieważ estry wykazały się znacząco wyższą aktywnością antyureolityczną niż odpowiadające im kwasy (patrz rozdział 3.7), dla kilku końcowo zsyntetyzowanych pochodnych zrezygnowałam z etapu hydrolizy. Dla wybranych przypadków zdecydowałam się jednak otrzymać dodatkowo monoestry kwasów fosfonowych, związki o pośredniej hydrofobowości i właściwościach kwasowo-zasadowych między kwasami a estrami. W tym celu

przeprowadziłam hydrolizę estrów dietylowych w warunkach zasadowych (Schemat 22), a otrzymane związki zostały poddane testom kinetycznym, co wzbogaciło dyskusję zależności struktura-aktywność.



**Schemat 22. Hydroliza diestrów do monoestrów etylowych kwasu 2-(3-oksobenzazo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)alkilofosfonowego w warunkach zasadowych.**

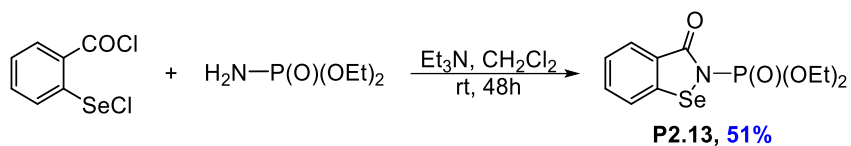
Ponadto, w celu potwierdzenia znaczenia reaktywności pierścienia selenazolonu względem tioli dla efektywnej inhibicji, testom poddano także wybrane związki ftalimidowe jako analogi strukturalne selenazolonowego układu heteroaromatycznego. Wybrano otrzymane uprzednio estry P2.9.2 i P2.12.2, a także odpowiadające im kwasy P2.9.6 i P2.12.6, te ostatnie otrzymane w wyniku hydrolizy w zoptymalizowanych, opisanych powyżej warunkach (Schemat 23).



**Schemat 23. Otrzymanie ftalimidowych pochodnych kwasu alkilofosfonowego.**

Co ciekawe, chlorek 2-(chloroseleno)benzoilu okazał się reaktywny także względem fosforamidowego atomu azotu. Zamknięcie pierścienia z użyciem fosforamidu dietylowego pozwoliło otrzymać strukturę P2.13 nieposiadającą

łącznika pomiędzy atomem azotu a grupą fosfonianową, co poszerzyło bibliotekę potencjalnych inhibitorów ureazy (Schemat 24).

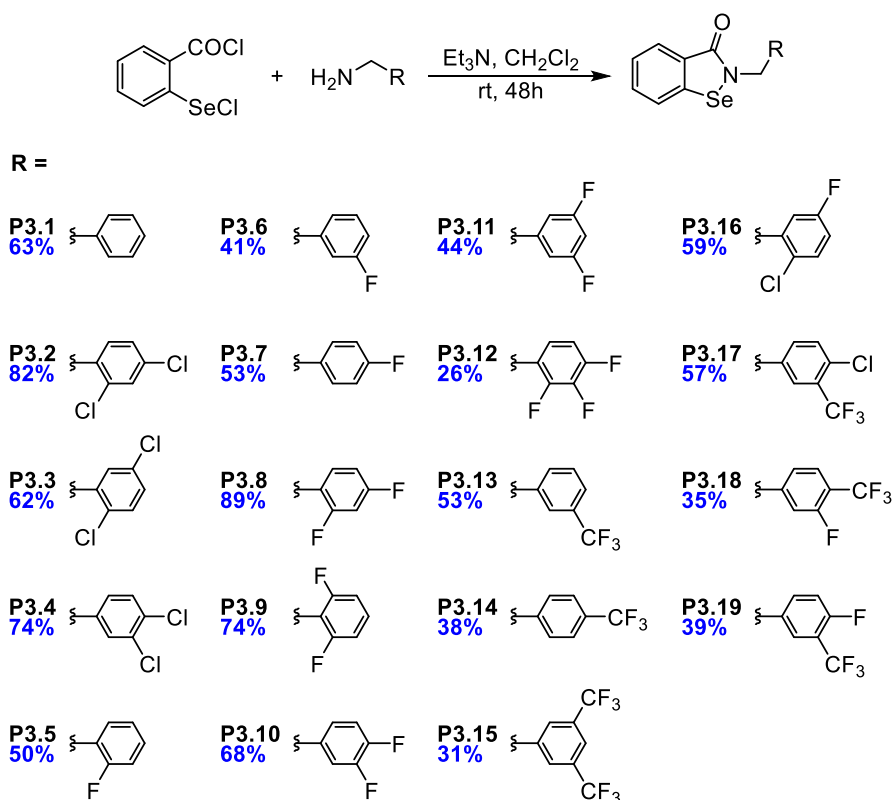


**Schemat 24. Synteza (3-oksobenzod[1,2]selenazol-2(3H)-ilo)fosforamidu dietylowego.**



### 3.5. Halogenowe pochodne *N*-benzylobenzoselenazol-3(2*H*)-onu

W ostatnim projekcie podjęłam się syntezy około dwudziestoskładnikowej biblioteki halogenowanych *N*-benzyloowych pochodnych 1,2-benzoselenazol-3(2*H*)-onu (Schemat 25). W tym celu przeprowadziłam reakcję wcześniej otrzymanego chloroku 2-(chloroseleno)benzoilu z handlowo dostępnymi halogenowanymi benzyloaminami w standardowych warunkach.



**Schemat 25. Synteza halogenowych pochodnych *N*-benzylo-1,2-benzoselenazol-3(2*H*)-onu.**

Analizując wydajności otrzymanych produktów, zauważyłam, że rodzaj podstawnika i jego położenie mają duży wpływ na reaktywność grupy aminowej. Najniższe wydajności zaobserwowałam w reakcji z 2,3,4-trifluoro-

benzyloaminą, a także w większości przypadków amin zawierających co najmniej jedną grupę trifluorometylową. Zatem obecność podstawników silnie elektronoakceptorowych zdecydowanie obniżała nukleofilowość grupy aminowej i utrudniała jej reakcję z chlorkiem 2-(chloroseleno)benzoilu. Pozostałe produkty otrzymałam z zadowalającą lub dobrą wydajnością. Warto podkreślić łatwość wydzielania związków, które były krystaliczne. Oczyszczanie chromatograficzne nie było zatem konieczne a zastosowanie ekstrakcji (zasadowej w celu usunięcia pozostałości substratu selenowego oraz kwasowej usuwającej pozostałość aminy) oraz przemywania osadów eterem dietylowym było wystarczające dla pozbycia się drobnych zanieczyszczeń.

### 3.6. Aktywność biologiczna związków

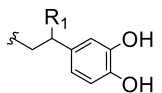
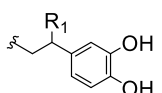
We współpracy z dr. inż. Wojciechem Taborem oraz dr Agnieszką Grabowiecką [87,88] wszystkie zsyntetyzowane związki zostały poddane testom aktywności inhibitorowej wobec oczyszczonej natywnej ureazy z bakterii *Sporosacina pasteurii* CCM 2056 (ze względu na dostępność, znaną strukturę krystaliczną oraz wielość danych dotyczących inhibicji), a także hamowania ureolizy *in vitro* w żywych komórkach bakterii *Helicobacter pylori* Tx30a (ATCC 51932 – szczep ten został wybrany ze względu na jego niską wrażliwość na stresogenne warunki środowiskowe np. ekspozycję na tlen podczas testów ureolizy [89]). Linia komórek została uzyskana we współpracy z dr. Pawłem Krzyżkiem z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Resztkową aktywność enzymu oznaczano metodą kolorymetryczną. Działanie inhibitorów śledzono w buforze fosforanowym zawierającym mocznik oraz 0,01% czerwieni krezolowej. Użyty wskaźnik odpowiadał za zmianę absorbancji roztworu wraz ze wzrostem pH roztworu pomiarowego (wzrostem stężenia powstającego amoniaku). Reakcję inicjowano poprzez dodanie enzymu, a absorbancję mierzono przez 1,5 h przy długości fali równej 570 nm. W przypadku wolnowiązujących związków katecholowych, testy aktywności zostały przeprowadzone bez i z etapem preinkubacji enzymu z inhibitorami przez 1 h przed dodaniem inicjującego reakcję mocznika i rozpoczęciem pomiarów. W trakcie testów przygotowywano i uwzględniano także ślepą próbę (kontrolę aktywności enzymu niehamowanego) oraz analizowano wpływ rozpuszczalnika użytego do rozpuszczenia badanych związków chemicznych. Stałą dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor ( $K_i$ ) dla pomiarów wobec natywnej ureazy z bakterii *S. pasteurii* oraz parametr  $IC_{50}$  dla pomiarów wobec żywych komórek *H. pylori* wyznaczano z otrzymanych krzywych pomiarowych zależności absorbancji od czasu.

### 3.6.1. Fosforowe pochodne katecholu

Dziewięć otrzymanych fosforowych związków katecholowych poddano działaniu względem oczyszczonej ureazy ze *S. pasteurii*. Z krzywych postępu reakcji zaobserwowano, że niektóre z inhibitorów początkowo wykazywały słaby wpływ na hamowanie, po którym następował hiperboliczny spadek aktywności enzymu. Pozostałe zaś charakteryzowały się nieco wyraźniejszym początkowym hamowaniem, po którym następował wolniejszy i mniej znaczący spadek aktywności enzymu. Charakterystyka ta znalazła odzwierciedlenie w polepszonych parametrach kinetycznych po wstępnej inkubacji enzymu z inhibitorem przed dodaniem substratu (Tabela 5). W przypadku większości katecholi wzrost inhibicji po etapie preinkubacji był umiarkowany. Natomiast w przypadku związków P1.8, P1.10 oraz P1.11 zaobserwowano znaczny spadek (nawet o dwa rzędy wielkości) wartości stałej  $K_i$ , co dowodzi silnego wolnowiążącego mechanizmu ich oddziaływania z centrum aktywnym enzymu.

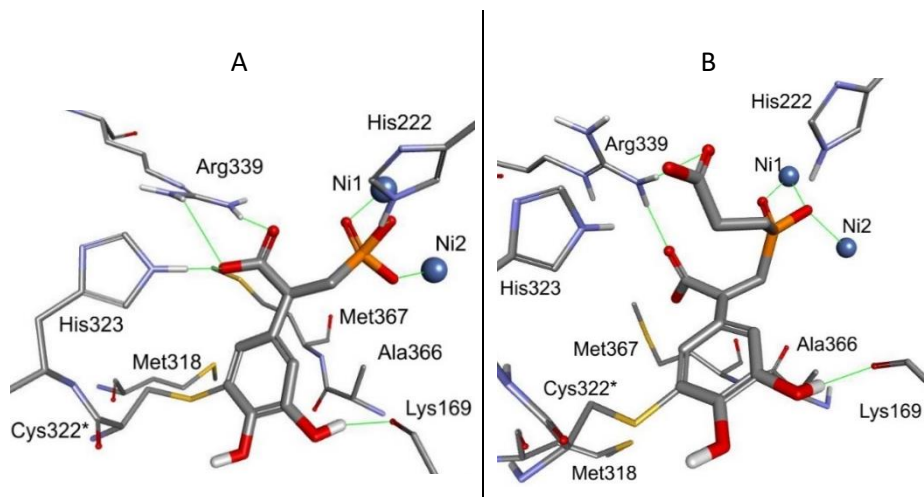
**Tabela 5. Aktywność inhibitorowa fosforowych pochodnych katecholu wobec ureazy ze *S. pasteurii* oraz ureolizy komórek *H. pylori* [87].**

	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Natywny enzym bakterii <i>S. pasteurii</i> $K_i$ [μM]		Ureoliza komórek bakterii <i>H. pylori</i> $IC_{50}$ [μM]
				bez preinkubacji	z preinkubacją	
P1.9	H	COOH	H	79,3 ± 4,9	58,8 ± 5,2	10,5 ± 0,54
P1.10			(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	298 ± 26	6,13 ± 0,33	9,28 ± 0,97
P1.11			OH	400 ± 38	<b>2,36 ± 0,20</b>	<b>0,75 ± 0,020</b>
P1.7				16,0 ± 0,50	6,80 ± 0,86	13,1 ± 0,53
P1.13		COOCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOCH <sub>3</sub>	295 ± 13	228 ± 24	412 ± 65
P1.14			OH	107 ± 11	78,0 ± 5,5	31,4 ± 1,8
P1.8				223 ± 26	7,55 ± 0,67	106 ± 6,5
P1.16	Br	COOH	OH	17,7 ± 2,8	9,10 ± 1,8	26,6 ± 0,60
P1.12			OH	41,9 ± 4,5	34,8 ± 3,6	50,3 ± 1,1

Wszystkie zsyntetyzowane fosforowe pochodne katecholi były mikromolarnymi inhibitorami ureazy ze *S. pasteurii*, a najlepszym z nich okazał się kwas P1.11, dla którego wartość  $K_i$  wynosi 2,36  $\mu\text{M}$ . Obecność ugrupowania H-fosfinowego w związku P1.9 obniżyła zdolność do hamowania enzymu o jeden rząd wielkości, natomiast w przypadku rozbudowanego ugrupowania fosfinowego w związku P1.10 różnica w wartości  $K_i$  w stosunku do kwasu fosfonowego P1.11 była nieznaczna. Świadczy to o tworzeniu przez grupę karboksylową podstawnika P-karboksyetylowego dodatkowych oddziaływań w centrum aktywnym enzymu, które rekompensują brak interakcji związanych z nieobecnością jednej grupy P-OH (Rysunek 17). Co ciekawe, związki symetrycznie podstawionego kwasu fosfinowego (kwas P1.7 oraz ester P1.8) również wykazywały dobrą siłę hamowania. Natomiast związki zawierające estryfikowaną grupę karboksylową P1.8, P1.13 oraz P1.14 okazały się ogólnie gorszymi inhibitorami niż odpowiadające im kwasy (związki P1.7, P1.10 oraz P1.11). Związek P1.13 uzyskał najwyższą wartość  $K_i$ , co może być związane z jego największą hydrofobowością i rozbudową strukturalną (miejsce aktywne ureazy jest ograniczone sterycznie). W przypadku produktu ubocznego z atomem bromu (związek P1.12), otrzymana wartość początkowej stałej inhibicji była jedną z lepszych, aczkolwiek jedynie nieznacznie zmieniła się pod wpływem inkubacji. Na podstawie tej obserwacji można stwierdzić, że obecność atomu bromu znacząco wpływa na reaktywność katecholu w tworzeniu wiązania z cysteiną czyniąc inhibitor mniej efektywnym.

Zakładając wiązanie kowalencyjne tworzone między atomem siarki Cys322 a pozycją 5 układu katecholowego przeprowadzono modelowanie sposobu wiązania wybranych inhibitorów o najwyższym powinowactwie z ureazą ze *S. pasteurii* (wykonane przez prof. dr. hab. inż. Łukasza Berlickiego z Katedry Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej). Najbardziej aktywny związek P1.11 wiązał się w bardzo korzystnej konformacji tworząc wiele optymalnych oddziaływań z resztami aminokwasowymi miejsca aktywnego

enzymu (Rysunek 17A). Dwa z atomów tlenu ugrupowania kwasu fosfonowego były skoordynowane z katalitycznymi jonami niklu, natomiast trzeci tworzył wiązanie wodorowe z NH imidazolu His222. Grupa karboksylowa liganda tworzyła mostek solny z grupą guanidynową Arg339, a także wiązanie wodorowe z NH imidazolu His323. Jedna z grup hydroksylowych katecholu tworzyła wiązanie wodorowe z grupą aminową Lys169. Ten korzystny układ oddziaływań był nieznacznie zaburzony w związku fosfinowym P1.10. Nieobecność jednego fosforylowego atomu tlenu spowodowała brak wiązań wodorowych z His222, lekkie przesunięcie cząsteczki w kierunku Arg339 i utratę kontaktu z His323 (Rysunek 17B). Te straty w energii wiązania były rekompensowane silnymi wiązaniami wodorowymi obu grup karboksylowych z grupą guanidynową Arg339. Na podstawie wyników modelowania molekularnego można stwierdzić, że związki fosforowe zawierające układ katecholu o zaplanowanej strukturze mają możliwość oddziaływania z enzymem zgodnie z założeniami, tj. wykazując podwójny mechanizm inhibicji. Wiązaniu kowalencyjnemu z grupą tiolową cysteiny towarzyszyła rozbudowana sieć oddziaływań, w tym z katalitycznymi jonami niklu.



**Rysunek 17. Modele kompleksów związków P1.11 (A) oraz P1.10 (B) z ureazą ze *S. pasteurii* (na podstawie struktury krystalicznej PDB 5G4H [71]) [87].**

Opisane powyżej właściwości hamujące aktywność oczyszczonej ureazy ze *S. pasteurii* znalazły odzwierciedlenie w zdolności fosfonianów i fosfinianów do kontrolowania rozkładu mocznika w żywych komórkach *H. pylori*. Ponownie kwas P1.11 okazał się być najskuteczniejszym inhibitorem, a otrzymana dla niego wartość  $IC_{50}$  wyniosła  $0,75 \mu\text{M}$ . Związki zawierające funkcję wolnego kwasu karboksylowego wykazywały większą aktywność niż odpowiadające im estry oraz związek P1.16, który nie zawierał grupy karboksylowej. W szczególności strukturalnie wydłużone estry P1.13 oraz P1.8, które są bardziej hydrofobowe niż odpowiednie kwasy, były najmniej skutecznymi inhibitorami ureolizy w całych komórkach – tylko w tych przypadkach wartości  $IC_{50}$  przekraczały  $100 \mu\text{M}$ .

Trzy najskuteczniejsze inhibitory (P.10, P1.11 oraz P1.16) oceniono pod kątem ich działania cytotoksycznego względem komórek eukariotycznych (testy wykonane komercyjnie w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu). W teście antyproliferacyjnym *in vitro* z sulforodaminą B (stosując *cis*-platynę jako kontrolę pozytywną) nie zaobserwowano istotnego wpływu inhibitorów na proces wzrostu mysich fibroblastów zarodkowych (3T3-L1) oraz ludzkich komórek nabłonka nerki (HEK-293) poddanych rosnącym stężeniom inhibitora. Nawet przy najwyższym testowanym stężeniu ( $100 \mu\text{M}$ ) obserwowane hamowanie wzrostu nie przekroczyło 50%. Zatem badane związki zostały zaklasyfikowane jako nisko toksyczne wobec komórek eukariotycznych *in vitro*.

### 3.6.2. Fosfonowe pochodne *N*-podstawionego 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu

Mechanizm oddziaływania związków selenowych w centrum aktywnym był szybkowiązący, dlatego nie stosowano protokołu z preinkubacją. Wszystkie zsyntetyzowane 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-ony z fosforylowanym aromatycznym lub zawierającym pierścień aromatyczny *N*-podstawnikiem

okazały się być nanomolarnymi inhibitorami (zakres  $K_i$  od 5,06 nM do 542 nM) (Tabela 6). Najbardziej aktywnymi związkami w tej grupie były fosfoniany dietylowe P2.3.3 oraz P2.7.4, dla których wartość  $K_i$  wynosiła poniżej 10 nM. Zaskakująco zaobserwowano, że estry fosfonowe wiążą się z enzymem silniej niż odpowiadające im kwasy. Jedynym wyjątkiem była para związków P2.2.2 i P2.2.3, aczkolwiek różnica pomiędzy otrzymanymi dla nich wartościami  $K_i$  jest minimalna. Przy założeniu kowalencyjnego mechanizmu wiązania z Cys322, wyniki te świadczą raczej o wysokiej komplementarności struktur do białka, niż o wiązaniu jonów niklu przez grupę fosfonową (w takim przypadku aktywność kwasów powinna być dominująca). Potwierdziła to także obserwacja, zgodnie z którą wydłużenie *N*-podstawnika wiązało się polepszeniem właściwości hamujących, a przyczyną tego mógł być wzrost hydrofobowej powierzchni kontaktu z białkiem. Dla inhibitorów typowo oddziałujących z ograniczonym przestrzennie miejscem katalitycznym ureazy rozbudowa strukturalna nie była korzystna, co stwierdzono dla związków katecholowych.

**Tabela 6. Aktywność inhibitorowa fosfonowych pochodnych *N*-podstawionego 1,2-benzisosenazol-3(2*H*)-onu wobec ureazy ze *S. pasteurii* oraz ureolizy komórek *H. pylori* [88].**

	n	m		X	Natywny enzym bakterii <i>S. pasteurii</i> $K_i$ [nM]	Ureoliza komórek bakterii <i>H. pylori</i> $IC_{50}$ [nM]
P2.1.2	0	0	<i>meta</i>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	286 ± 34	40,4 ± 0,62
P2.1.3				PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	413 ± 30	314 ± 17
P2.2.2	0	0	<i>para</i>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	453 ± 15	<b>29,5 ± 0,34</b>
P2.2.3				PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	424 ± 8,4	358 ± 21
P2.3.3	0	1	<i>meta</i>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	<b>7,77 ± 2,8</b>	58,9 ± 0,34
P2.3.4				PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	436 ± 41	187 ± 12
P2.4.3	0	1	<i>para</i>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	105 ± 8,5	54,3 ± 0,14
P2.4.4				PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	415 ± 3,9	542 ± 12
P2.5.3	0	2	<i>meta</i>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	26,4 ± 4,6	126 ± 2,7
P2.6.3	0	2	<i>para</i>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	68,0 ± 2,1	<b>33,5 ± 1,5</b>
P2.7.4	1	1	<i>meta</i>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	<b>5,06 ± 0,42</b>	<b>33,0 ± 1,5</b>
P2.8.4	1	1	<i>para</i>	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	18,6 ± 0,41	<b>32,2 ± 3,0</b>





Porównując dane dla regioizomerów zauważono, iż dla pochodnych *meta* powinowactwo do enzymu było istotnie lepsze niż dla izomerów *para*. Największą różnicę pomiędzy wartościami stałych inhibicji zaobserwowano dla estrów P2.3.3 i P2.4.3 – zmiana podstawienia dietylofosfonianu z pozycji *para* w *meta* spowodowała 13,5-krotny spadek stałej inhibicji. Analizując wartości  $K_i$  dla par związków P2.5.3 i P2.7.4 oraz P2.6.3 i P2.8.4 (będących względem siebie izomerami konstytucyjnymi), stwierdzono natomiast, że wprowadzenie grupy metylenowej pomiędzy atom azotu a pierścień aromatycznym korzystnie wpłynęło na inhibicję. Wyjaśnieniem (oprócz uprzywilejowanego ułożenia przestrzennego) może być wpływ zmiany strukturalnej na reaktywność samego inhibitora w tworzeniu wiązania Se-S, warunkowanej innym charakterem *N*-podstawnika: fenyłowy/benzylowy.

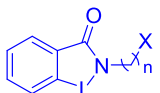
W przypadku zdolności do kontrolowania rozkładu mocznika w żywych komórkach *H. pylori* analizowane związki wykazały znakomite właściwości hamujące, choć zależność struktura-aktywność nieco różniła się od wyników dla ureazy oczyszczonej ze *S. pasteurii*. Najskuteczniejszym inhibitorem okazał się być związek P2.2.2, dla którego wartość  $IC_{50}$  wynosi 29,5 nM – był to najbardziej znaczący wynik uzyskany w badaniach objętych zakresem mojej pracy. Związki P2.6.3, P2.7.4 oraz P2.8.4 posiadały porównywalną siłę hamowania ureolizy *H. pylori*. Estry fosfonowe potwierdziły zdecydowanie silniejsze hamowanie enzymu niż odpowiadające im kwasy. Różnice w aktywności regioizomerów są mniej widoczne: największe 3,8-krotne pogorszenie  $IC_{50}$  zaobserwowano przy zmianie podstawienia ugrupowania dietylofosfonianu z pozycji *meta* w *para* dla estrów P2.5.3 i P2.6.3.

Estry i kwasy fosfonowe podstawione terminalnie w *N*-alifatycznej reszcie 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu okazały się również bardzo dobrymi, nanomolarnymi inhibitorami ureazy ze *S. pasteurii* (Tabela 7). Ponownie ugrupowanie estrowe przyczyniło się do zdecydowanie silniejszego hamowania aktywności enzymu, a najlepszy wynik uzyskano dla fosfonianu dietylowego

P2.12.3, dla którego wartość  $K_i$  wyniosła 12,8 nM. Nie zaobserwowano ścisłej zależności aktywności inhibitora od długości fragmentu alifatycznego. Nieco zaskakująco związkiem o największym powinowactwie do białka okazał się fosforamid P2.13 ( $K_i = 7,92$  nM).

Inne zastosowane modyfikacje strukturalne nie przyniosły polepszenia siły hamowania enzymu. Aktywność biologiczna monoestrów okazała się być zdecydowanie słabsza, nawet w porównaniu do analogicznych kwasów. Natomiast pochodne ftalimidu były nieaktywne w badanym zakresie stężeń, co dowodzi, iż obecność reaktywnego układu selenazolonu jest kluczowa i warunkuje mechanizm inhibicji.

**Tabela 7. Aktywność inhibitorowa fosfonowych pochodnych 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu oraz ftalimidu *N*-podstawionych fragmentem fosfonoalkilowym wobec ureazy ze *S. pasteurii* oraz ureolizy komórek *H. pylori* [88].**

				Natywny enzym bakterii <i>S. pasteurii</i> $K_i$ [nM]	Ureoliza komórek bakterii <i>H. pylori</i> $IC_{50}$ [nM]	
	L	n	X			
P2.9.3	Se	2	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	25,7 ± 0,20	<b>130 ± 3,9</b>	
P2.9.4			PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	415 ± 6,2	1603 ± 18	
P2.9.5		3	P(O)(OH)(OEt)	2410 ± 40	4330 ± 190	
P2.10.3			P(O)(OEt) <sub>2</sub>	71,6 ± 4,0	189 ± 3,8	
P2.10.4			PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	288 ± 7,0	874 ± 9,6	
P2.11.3			P(O)(OEt) <sub>2</sub>	35,8 ± 0,40	265 ± 7,1	
P2.11.4			PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	426 ± 7,9	2106 ± 11	
P2.12.3			5	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	12,8 ± 0,10	299 ± 8,8
P2.12.4				PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	108 ± 2,2	867 ± 12
P2.12.5			0	P(O)(OH)(OEt)	670 ± 10	4030 ± 150
P2.13	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	<b>7,92 ± 0,21</b>		263 ± 16		
P2.9.2	C=O	2	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	> 500 · 10 <sup>3</sup>	> 50 · 10 <sup>3</sup>	
P2.9.6			PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	> 500 · 10 <sup>3</sup>	> 50 · 10 <sup>3</sup>	
P2.12.2		5	P(O)(OEt) <sub>2</sub>	> 50 · 10 <sup>3</sup>	> 50 · 10 <sup>3</sup>	
P2.12.6			PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	> 50 · 10 <sup>3</sup>	> 50 · 10 <sup>3</sup>	

W przypadku hamowania aktywności żywych komórek *H. pylori* najskuteczniejszym inhibitorem w tej grupie związków okazał się być ester

P2.9.3, dla którego wartość  $IC_{50}$  wyniosła 130 nM. Zaobserwowano, że stałe inhibicji estrów fosfonowych rosły wraz ze wzrostem długości łącznika. Kwasy fosfonowe, monoestry fosfonowe oraz pochodne ftalimidu wykazały zdecydowanie słabszą siłę hamowania ureolizy.

Po porównaniu wartości aktywności biologicznej uzyskanych dla wszystkich fosfonowych pochodnych *N*-podstawionego 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu zaobserwowano, że określone związki posiadały interesującą selektywność. Niektóre były bardzo dobrymi inhibitorami ureazy ze *S. pasteurii*, a słabszymi wobec ureolizy *H. pylori* (np. P2.12.3 czy P2.13), a niektóre przeciwnie (np. P2.2.2). Oczywiście, trudno porównywać układ pomiarowy zawierający czyste białko z testami na liniach komórkowych, ale perspektywicznie interesujące byłoby określenie, czy różnice dotyczą sposobu wiązania w centrach aktywnych obu enzymów, czy innych kwestii np. transportu związków przez ściany komórkowe.

Wybrane inhibitory o wysokiej aktywności (P2.1.2, P2.2.2, P2.3.2, P2.4.2, P2.4.3, P2.9.3 oraz P2.12.3) oceniono pod kątem ich wpływu cytotoksycznego na komórki eukariotyczne (podobnie jak opisano powyżej, Tabela 8).

**Tabela 8. Aktywność antyproliferacyjna wybranych fosfonowych pochodnych *N*-podstawionego 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu wobec eukariotycznych linii komórkowych.**

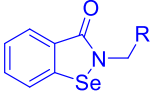
	Linia komórkowa 3T3-L1 $IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Linia komórkowa HEK293 $IC_{50}$ [ $\mu$ M]
<b>cis-platyna</b>	3,30	0,142
<b>P2.1.2</b>	76,0	-
<b>P2.2.2</b>	43,7	62,5
<b>P2.3.2</b>	44,8	63,0
<b>P2.4.2</b>	64,6	42,4
<b>P2.4.3</b>	48,4	61,8
<b>P2.9.3</b>	65,6	72,5
<b>P2.12.3</b>	-	39,8

Wszystkie związki wykazały umiarkowaną lub niską aktywność antyproliferacyjną ( $IC_{50}$  powyżej 40  $\mu M$ ). Są mniej toksyczne od *cis*-platyny, posiadają jednak odmienny mechanizm działania – zaburzają status redoks komórki. Związek P2.12.3 nie wpływa na proces wzrostu mysich fibroblastów zarodkowych, natomiast związek P2.1.2 na linię ludzkich embrionalnych komórek nerkowych.

### 3.6.3. Halogenowe pochodne *N*-benzylo-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu

Halogenowe pochodne *N*-benzylo-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu również okazały się nanomolarnymi, a nawet subnanomolarnymi inhibitorami ureazy ze *S. pasteurii* (Tabela 9). Najlepszy wynik w niniejszej pracy uzyskano dla selenazolonu P3.2, dla którego wartość  $K_i$  wyniosła 0,594 nM. Pochodne posiadające jeden lub dwa atomy halogenowca w swojej strukturze wykazały najwyższą aktywność ( $K_i$  poniżej 54,3 nM), natomiast wprowadzenie kolejnego atomu lub obecność grupy trifluorometylowej znacznie osłabiało właściwości inhibitora ( $K_i$  powyżej 210 nM). Wyniki hamowania ureolizy wykazywanej przez żywe komórki *H. pylori* były znacznie mniej zróżnicowane. Wszystkie wartości  $IC_{50}$  zawierały się w stosunkowo wąskim zakresie 93,5-345 nM. Co zaskakujące, najlepszy inhibitor ureazy ze *S. pasteurii* (P3.2) okazał się najslabszym biorąc pod uwagę hamowanie ureolizy *H. pylori*, natomiast związek P3.18 wykazał przeciwną zależność. To kolejne potwierdzenie faktu, że subtelne różnice w strukturze liganda oraz enzymu (mimo znacznych podobieństw w budowie centrum aktywnego ureaz bakteryjnych [90]) mogą skutkować specyficznością wiązania. Ponadto dane uzyskane na modelowych białkach niekoniecznie korespondują z badaniami bardziej złożonych układów.

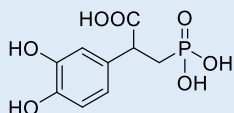
**Tabela 9. Aktywność inhibitorowa halogenowych pochodnych *N*-podstawionego 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu wobec ureazy ze *S. pasteurii* oraz ureolizy komórek *H. pylori* [88].**

		Natywny enzym bakterii <i>S. pasteurii</i> $K_i$ [nM]	Ureoliza komórek bakterii <i>H. pylori</i> $IC_{50}$ [nM]
	R		
<b>P3.1</b>	<b>Ph</b>	2,58 ± 0,18	151 ± 5,7
<b>P3.2</b>	2,4-diClPh	0,594 ± 0,032	345 ± 16
<b>P3.3</b>	2,5-diClPh	9,04 ± 0,22	341 ± 23
<b>P3.4</b>	3,4-diClPh	15,9 ± 0,65	315 ± 4,7
<b>P3.5</b>	2-FPh	3,61 ± 0,28	171 ± 5,4
<b>P3.6</b>	3-FPh	12,2 ± 0,40	154 ± 8,4
<b>P3.7</b>	4-FPh	25,4 ± 2,8	193 ± 8,1
<b>P3.8</b>	2,4-diFPh	2,52 ± 0,19	287 ± 18
<b>P3.9</b>	2,6-diFPh	1,16 ± 0,14	218 ± 14
<b>P3.10</b>	3,4-diFPh	3,35 ± 0,65	110 ± 4,5
<b>P3.11</b>	3,5-diFPh	1,30 ± 0,027	122 ± 4,1
<b>P3.12</b>	2,3,4-triFPh	294 ± 26	179 ± 3,3
<b>P3.13</b>	3-CF <sub>3</sub> Ph	250 ± 24	112 ± 2,4
<b>P3.14</b>	4-CF <sub>3</sub> Ph	210 ± 19	170 ± 1,6
<b>P3.15</b>	3,5-diCF <sub>3</sub> Ph	332 ± 29	208 ± 4,5
<b>P3.16</b>	2-Cl-5-FPh	54,3 ± 1,5	96,4 ± 1,8
<b>P3.17</b>	4-Cl-3-CF <sub>3</sub> Ph	1856 ± 37	153 ± 5,4
<b>P3.18</b>	3-F-4-CF <sub>3</sub> Ph	1590 ± 190	93,5 ± 5,3
<b>P3.19</b>	4-F-3-CF <sub>3</sub> Ph	299 ± 8,8	107 ± 1,9

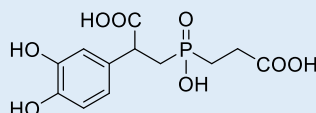
### 3.7. Podsumowanie

W swojej pracy doktorskiej zaplanowałam i zsyntetyzowałam 55 docelowych związków fosforoorganicznych i/lub selenoorganicznych, a poprawność ich struktury oraz homogeniczność potwierdziłam technikami spektroskopowymi. Wszystkie związki zostały poddane testom aktywności biologicznej wobec oczyszczonej natywnej ureazy z bakterii *S. pasteurii* oraz ureolizy wykazywanej przez komórki patogennej bakterii *H. pylori*. Pochodne katecholu okazały się być mikromolarnymi, natomiast pochodne 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu nanomolarnymi inhibitorami modelowej ureazy. Co istotne, w każdej grupie związków zidentyfikowano związki niezwykle aktywne antyureolityczne w badaniach *in vitro* względem patogennej bakterii (Rysunek 18). Takie związki, ograniczające działanie czynników etiologicznych mikroorganizmów chorobotwórczych i osłabiające wirulencję, to niezwykle cenne substancje, które mogą zostać skojarzone z klasycznymi antybiotykami w terapiach kombinowanych.

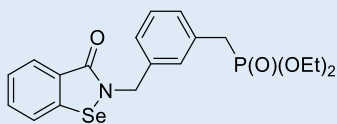
Fosforowe związki katecholowe otrzymane w niniejszej pracy okazały się mniej aktywnymi inhibitorami ureazy niż związki selenoorganiczne, pomimo tego że z dużym prawdopodobieństwem w bardziej ścisły sposób wypełniły początkowe założenia, tj. oddziaływały w zaplanowany hybrydowy sposób z enzymem łącząc dwa odrębne mechanizmy wiązania. Oczywistym powodem zaobserwowanych różnic może być mniejsza reaktywność chemiczna katecholu względem tioli w porównaniu do pierścienia izoselenazonu, czy też mniejsza komplementarność oddziaływań po związaniu z enzymem. Nieoczekiwanie wysoki potencjał hamowania ureolizy *H. pylori* przez 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu pokazał atrakcyjność i przewrotność prowadzenia badań naukowych, które przyniosły bardzo dobre wyniki pomimo niespełnienia racjonalnych przesłanek planowania. Wyniki takie można próbować racjonalizować w celu uzyskania wskazówek do ewentualnych dalszych etapów optymalizacji struktur aktywnych.

**Fosforowe pochodne katecholu**

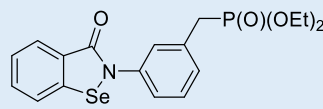
$K_i = 2,36 \pm 0,20 \mu\text{M}$ , *S. pasteurii*  
 $\text{IC}_{50} = 0,75 \pm 0,020 \mu\text{M}$ , *H. pylori*



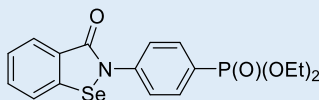
$K_i = 6,13 \pm 0,33 \mu\text{M}$ , *S. pasteurii*

**Fosfonowe pochodne N-podstawionego 1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onu**

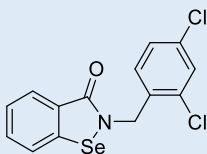
$K_i = 5,06 \pm 0,42 \text{ nM}$ , *S. pasteurii*



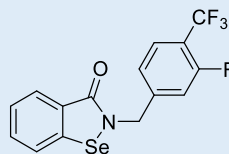
$K_i = 7,77 \pm 2,8 \text{ nM}$ , *S. pasteurii*



$\text{IC}_{50} = 29,5 \pm 0,34 \text{ nM}$ , *H. pylori*

**Halogenowe pochodne N-benzyl-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onu**

$K_i = 0,594 \pm 0,032 \text{ nM}$ , *S. pasteurii*



$\text{IC}_{50} = 93,5 \pm 5,3 \text{ nM}$ , *H. pylori*

**Rysunek 18. Wybrane struktury o najwyższej aktywności wobec ureazy ze *S. pasteurii* oraz ureolizy komórek *H. pylori*.**

Porównując otrzymane wyniki dla *N*-podstawionych pochodnych 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu z aktywnością najbardziej poznanej analogicznej struktury (ebselen, *N*-fenylo-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-on) zaobserwowałam, że niektóre z opracowanych modyfikacji spowodowały znaczący wzrost parametrów kinetycznych charakteryzujących oddziaływanie inhibitora z enzymem. Przykładowo, halogenopochodne P3.2, P3.9 oraz P3.11

wykazały niższe wartości stałej inhibicji enzymu ze *S. pasteurii* niż ebselen. Zysk był niewielki (2-4-krotny), ale należy pamiętać, że wynik uzyskany dla ebselenu jest wyjątkowo niski ( $K_i = 2,11 \text{ nM}$ ) [41], pomimo tego udało się go polepszyć. Natomiast cały szereg benzisoselenazonów znacznie efektywniej hamował ureolizę w komórkach *H. pylori* niż ebselen ( $IC_{50} = 769 \text{ nM}$ ) [41]. Były to halogenopochodne, z których najciekawsze wyniki uzyskały pochodne P3.16 oraz P3.18 (około 8-krotnie wyższa aktywność). Przede wszystkim jednak modyfikowane związki fosforoorganiczne przyniosły największy wzrost właściwości antyureolitycznych. Fosfoniany dietylowe P2.2.2, P2.6.3, P2.7.4 czy P2.8.4 wykazały około 25-krotnie niższe stężenie hamujące 50% rozkładu ureazy przez badaną linię bakterii patogennej niż ebselen.

Obserwowane polepszenie parametrów inhibicji świadczy o korzystnym wpływie zastosowanych atomów/grup funkcyjnych, które mogą tworzyć dodatkowe oddziaływanie inhibitora z centrum aktywnym enzymu. Uzyskanie informacji na temat ewentualnego mechanizmu tego wiązania metodami modelowania molekularnego czy rentgenografii strukturalnej jest oczywistą kontynuacją badań, planowaną poza ramami niniejszej pracy. Obecnie we współpracy z prof. Stefano Ciurlim z Uniwersytetu Bolońskiego, ekspertem w badaniach strukturalnych ureazy, trwają prace nad uzyskaniem kompleksów ligand-białko, które naświetliłyby poruszoną kwestię.



## 4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 4.1. Specyfikacja aparatury oraz odczynników

Wszystkie stosowane odczynniki i rozpuszczalniki zakupiono w jakości analitycznej od komercyjnych dostawców (Merck – Sigma-Aldrich, Avantor Performance Materials Poland, Chemland i Stanlab). Bezwodny dichlorometan przygotowywano destylując z nad  $P_2O_5$  bezpośrednio przed użyciem, natomiast bezwodną trietyloaminę destylowano i przechowywano nad wyprażonymi sitami molekularnymi o porowatości 3 Å.

Reakcje monitorowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, na płytках z żelazem krzemionkowym o porowatości 60 Å 0,25 mm z markerem fluorescencyjnym  $F_{254}$  firmy Merck.

Oczyszczanie związków prowadzono metodą rekrytalizacji lub chromatografii kolumnowej stosując żel krzemionkowy o porowatości 60 Å firmy Sigma-Aldrich. Chromatografię *flash* przeprowadzono z użyciem aparatu Teledyne ISCO CombiFlash® Rf+ Lumen™ z zastosowaniem kolumn chromatograficznych High Performance GOLD Silica oraz C18 firmy Teledyne ISCO. Wysokosprawną chromatografię cieczową przeprowadzono z użyciem aparatu Shimadzu stosując kolumnę ReproSil-Pur Basic-C18 firmy Dr. Maisch.

Widma  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{19}F$ ,  $^{31}P$  i  $^{77}Se$  NMR rejestrowano w rozpuszczalnikach deuterowanych przy częstotliwościach odpowiednio: 400 lub 600 MHz, 100 lub 151 MHz, 376 MHz, 162 MHz i 76 MHz na spektrometrach firmy JEOL. Przesunięcia chemiczne sygnałów na widmach  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR odniesiono

do wartości danych literaturowych dla rozpuszczalnika, natomiast widma  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR wykonano stosując zewnętrzny standard.

Widma masowe o wysokiej rozdzielczości (HRMS) zarejestrowano na spektrometrze Waters LCT Premier XE, stosując jonizację typu elektrosprej (ESI).

Reakcje indukowane mikrofalami przeprowadzono z użyciem aparatu Initiator+ SP Wave Biotage. Temperatury topnienia zmierzono na aparacie DigiMelt firmy SRS stosując przyrost temperatury  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Wszystkie zsyntetyzowane związki końcowe dały poprawne widma NMR i HRMS, a ich czystość wynosiła powyżej 95%.

## 4.2. Przepisy preparatywne

### 4.2.1. Kwasy fosfonowe i fosfinowe zawierające fragment katecholu

**2-(3,4-Dimetoksyfenylo)octan metylu (P1.1).** Do ochłodzonego w łaźni lodowej roztworu kwasu 3,4-dimetoksyfenylooctowego (0,15 mol, 30,0 g) w metanolu (40 ml) wkroplono chlorek tionylu (0,23 mol, 27,3 g) w temperaturze  $0^\circ\text{C}$ . Po 30 minutach mieszania, roztwór pozostawiono do ogrzania do temperatury pokojowej, a następnie odparowano lotne substancje pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w octanie etylu (250 ml), przemyto 5% wodnym roztworem  $\text{NaHCO}_3$  (100 ml) i solanką (100 ml) oraz wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymano 31,7 g (99%) oleistego produktu o lekko żółtej barwie.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,81 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 3,69 (s, 3H), 3,56 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172,42, 149,04, 148,28, 126,54, 121,51, 112,48, 111,31, 56,00, 55,96, 52,16, 40,83. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4+\text{H}^+$  211,0970, znaleziono 211,0972.

**2-(3,4-Dimetoksyfenylo)akrylan metylu (P1.2).** Związek P1.1 (0,071 mol, 15,0 g) rozpuszczony w DMF (20 ml), paraformaldehyd (0,10 mol, 3,0 g), bromek tetra-*n*-butyloamoniowy (0,90 g) i bezwodny węglan potasu (0,071 mol, 9,9 g) ogrzewano w synteźatorze mikrofalowym w temperaturze 55°C przez 2 h. Następnie roztwór ochłodzono do temperatury pokojowej, dodano wodę destylowaną (50 ml) i ekstrahowano produkt porcjami octanu etylu (3 × 100 ml). Fazę organiczną przemyto solanką (10 ml) oraz wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem żółtą oleistą pozostałość oczyszczono metodą chromatografii *flash*, stosując gradient heksan/octan etylu, 50/50 → 0/100 *v/v*. Otrzymano 9,0 g (57%) oleistego produktu o słomkowej barwie. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,03 – 6,95 (m, 2H), 6,85 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 6,28 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 5,86 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 3,89 (s, 6H), 3,83 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167,63, 149,32, 148,56, 140,89, 129,55, 125,82, 121,03, 111,69, 110,86, 56,04, 52,35. HRMS (ESI) *m/z* obliczono dla C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>+H<sup>+</sup> 223,0970, znaleziono 223,0974.

**Kwas 2-(3,4-dimetoksyfenylo)-3-metoksy-3-oksopropylu-*H*-fosfinowy (P1.3).** Do ochłodzonej w łaźni lodowej zawiesiny soli amonowej kwasu podfosforawego (0,024 mol, 2,0 g) w bezwodnym dichlorometanie (10 ml), wkroplono *N,O*-bis(trimetylosililo)acetamid (0,061 mol, 12,4 g). Po jednej godzinie mieszania dodano związek P1.2 (0,020 mol, 4,5 g) rozpuszczony w bezwodnym dichlorometanie (5 ml). Zanik akrylanu śledzono metodą chromatografii cienkowarstwowej. Gdy reakcja dobiegła końca, dodano metanol (10 ml) i mieszaninę reakcyjną mieszano przez noc. Po odparowaniu lotnych składników pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w octanie etylu (50 ml), przemyto 5% wodnym roztworem NaHSO<sub>4</sub> (20 ml) i solanką (20 ml) oraz wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem oleistą brązową

mieszaninę oczyszczono metodą chromatografii *flash*, stosując gradient octanu etylu/metanol, 100/0 → 10/90 v/v. Otrzymano 2,9 g (50%) białych kryształów. Temperatura topnienia 106-110°C.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6,93 – 6,84 (m, 3H), 6,85 (d,  $J = 506,6$  Hz, 1H), 3,93 (ddd,  $J = 9,0, 8,9, 6,3$  Hz, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,64 (s, 3H), 2,30 (dddd,  $J = 15,1, 15,0, 9,0, 2,4$ , 1H), 1,88 (dddd,  $J = 15,0, 14,8, 6,3, 1,8$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  175,74 (d,  $J = 7,8$  Hz), 150,53, 149,84, 133,50 (d,  $J = 10,6$  Hz), 121,23, 113,05, 112,67, 56,46, 56,41, 52,61, 46,77, 37,38 (d,  $J = 89,6$  Hz).  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  23,06. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{P-H}^+$  287,0684, znaleziono 287,0672.

**Kwas bis[2-(3,4-dimetoksyfenylo)-3-metoksy-3-oksopropyl]fosfinowy (P1.4)** został wyizolowany podczas chromatograficznego oczyszczania związku P1.3. Otrzymano 0,45 g (9%) oleistego produktu ubocznego o słomkowej barwie.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,85 – 6,72 (m, 6H), 3,98 – 3,90 (m, 2H), 3,85 (s, 6H), 3,82 (s, 6H), 3,64 (s, 6H), 2,61 – 2,47 (m, 2H), 2,05 – 1,89 (m, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,95 (d,  $J = 8,6$  Hz), 149,27, 148,77, 131,18 (d,  $J = 9,6$  Hz), 120,12, 111,65, 111,07, 55,09, 51,56, 44,78, 33,23 (d,  $J = 91,1$  Hz).  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  55,49 (br). HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_{10}\text{P+H}^+$  511,1733, znaleziono 511,1722.

**Kwas 2-(3,4-dimetoksyfenylo)-3-metoksy-3-oksopropyl-*P*-(3-metoksy-3-oksopropyl)fosfinowy (P1.5)**. Do ochłodzonego w łaźni lodowej roztworu związku P1.3 (4,2 mmol, 1,2 g) w bezwodnym dichlorometanie (10 ml) dodano w atmosferze argonu kolejno bezwodną trietyloaminę (0,015 mol, 1,5 g) oraz  $\text{TMSCl}$  (0,012 mol, 1,3 g). Roztwór mieszało w temperaturze 0°C przez 1 h, a następnie dodano akrylan metylu (4,2 mmol, 0,36 g) rozpuszczony w bezwodnym dichlorometanie (1 ml). Mieszanie kontynuowano przez noc w temperaturze pokojowej, a następnego dnia dodano metanol (10 ml)

i mieszano kolejną dobę. Po odparowaniu lotnych składników pod zmniejszonym ciśnieniem pozostałość rozpuszczono w octan etylu (50 ml) i przemyto 1,0 M roztworem kwasu solnego ( $3 \times 20$  ml) i solanką, wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem oleistą brązową oleistą mieszaninę oczyszczono metodą chromatografii *flash*, stosując gradient octan etylu/metanol, 100/0  $\rightarrow$  10/90 v/v. Otrzymano 1,0 g (64%) oleistego produktu o lekko brązowej barwie.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  6,89 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 6,88 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 6,81 (dd,  $J = 8,2, 2,2$  Hz, 1H), 3,85 (ddd,  $J = 10,6, 9,4, 5,4$  Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 3,56 (s, 3H), 2,48 – 2,27 (m, 3H), 2,00 (ddd,  $J = 15,3, 12,5, 5,4$  Hz, 1H), 1,76 – 1,60 (m, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  173,34 (d,  $J = 7,2$  Hz), 172,66 (d,  $J = 16,3$  Hz), 148,82, 148,26, 131,39 (d,  $J = 10,4$  Hz), 119,82, 111,95, 111,38, 55,58, 52,08, 51,66, 44,44, 32,73 (d,  $J = 89,6$  Hz), 26,40 (d,  $J = 2,7$  Hz), 24,77 (d,  $J = 92,1$  Hz).  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  45,54. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_8\text{P}+\text{H}^+$  375,1209, znaleziono 375,1216.

**Kwas 2-(3,4-dimetoksyfenylo)-3-metoksy-3-oksopropylfosfonowy (P1.6).**

Związek P1.3 (4,2 mmol, 1,2 g), DMSO (8,3 mmol, 0,65 ml) i  $\text{I}_2$  (30 mg) ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia w THF (10 ml) przez 5 h. Następnie roztwór ochłodzono do temperatury pokojowej i odparowano lotne substancje pod zmniejszonym ciśnieniem. Brązową oleistą mieszaninę oczyszczono metodą chromatografii *flash*, stosując gradient octan etylu/metanol, 100/0  $\rightarrow$  10/90 v/v. Otrzymano 0,9 g (71%) oleistego produktu o lekko brązowej barwie.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6,92 – 6,85 (m, 3H), 3,92 (ddd,  $J = 12,2, 10,2, 4,2$  Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,66 (s, 3H), 2,68 (ddd,  $J = 17,3, 15,0, 10,2$  Hz, 1H), 2,00 (ddd,  $J = 18,6, 15,0, 4,2$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  176,47 (d,  $J = 3,6$  Hz), 150,35, 149,59, 134,89 (d,  $J = 14,2$  Hz), 120,99, 112,99, 112,53, 56,48, 56,39, 52,55, 48,04

(d,  $J = 2,0$  Hz), 34,31 (d,  $J = 132,5$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  25,73. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{P}+\text{H}^+$  305,0790, znaleziono 305,0799.

#### Demetylowanie eterów i estrów z zastosowaniem $\text{BBr}_3$ (procedura A).

Do lodowatego roztworu kwasu fosfonowego lub fosfinowego (1 eq.) w  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) wkroplono 1,0 M roztwór  $\text{BBr}_3$  w  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (12 eq.) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 48 h w atmosferze argonu. Następnie dodano wodę destylowaną (50 ml) i kontynuowano mieszanie przez 2 h. Po odparowaniu lotnych substancji pod zmniejszonym ciśnieniem, oleistą pozostałość oczyszczono metodą chromatografii HPLC na odwróconej fazie, stosując gradient acetonitryl/woda, 10/90  $\rightarrow$  90/10  $v/v$  + 0,05% TFA, 45 min.

Demetylowanie eterów i estrów z zastosowaniem mieszaniny kwasów, stężonego solnego i lodowatego octowego (1:1  $v/v$ ) (procedura B). Ester (1,0 mmol) rozpuszczony w kwasie octowym (1 ml) i stężony kwas solny (1 ml) ogrzewano w syntezaorze mikrofalowym w  $140^\circ\text{C}$  przez 20 min. Po ochłodzeniu roztworu do temperatury pokojowej odparowano lotne substancje pod zmniejszonym ciśnieniem, a oleistą pozostałość oczyszczono metodą chromatografii HPLC na odwróconej fazie, stosując gradient acetonitryl/woda, 10/90  $\rightarrow$  90/10  $v/v$  + 0,05% TFA, 45 min.

#### Kwas bis[2-karboksy-2-(3,4-dihydroksyfenylo)etylo]fosfinowy (P1.7) został

otrzymany z substratu P1.4 (0,20 mmol, 0,10 g) zgodnie z procedurą A. Otrzymano 0,035 g (42%) oleistego produktu o słomkowej barwie.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  6,80 i 6,74 (d każdy,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 6,75 i 6,70 (d każdy,  $J = 2,2$  Hz, 2H), 6,65 i 6,60 (dd każdy,  $J = 8,2, 2,2$  Hz, 1H), 3,68 – 3,56 (m, 2H), 2,33 – 2,12 (m, 2H), 2,00 – 1,79 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  176,81 i 176,74 (d każdy,  $J_1 = 11,7$  Hz,  $J_2 = 13,3$  Hz), 144,38 i 144,30, 143,93 i 143,83, 130,20 i 130,10 (d każdy,  $J_1 = 6,5$  Hz,  $J_2 = 8,1$  Hz), 120,35

i 120,21, 116,50 i 116,43, 115,44 i 115,29, 44,43 i 44,38, 32,39 i 31,62 (d każdy,  $J_1 = 91,2$  Hz,  $J_2 = 91,4$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  52,66, 52,55. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_{10}\text{P}+\text{H}^+$  427,0794, znaleziono 427,0793.

**Kwas bis[2-(3,4-dihydroksyfenylo)-3-metoksy-3-oksopropyl]fosfinowy (P1.8)** został wyizolowany podczas chromatograficznego oczyszczania związku P1.7. Otrzymano 0,040 g (46%) oleistego produktu ubocznego o lekko brązowej barwie.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  6,79 i 6,73 (d każdy,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 6,74 i 6,70 (d każdy,  $J = 2,2$  Hz, 2H), 6,61 i 6,56 (dd każdy,  $J = 8,2, 2,2$  Hz, 2H), 3,69 – 3,59 (m, 2H), 3,57 (s, 6H), 2,32 – 2,15 (m, 2H), 2,02 – 1,80 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  175,48 i 175,43 (d każdy,  $J_1 = 11,6$  Hz,  $J_2 = 13,1$  Hz), 144,37 i 144,29, 143,96 i 143,86, 129,84 i 129,76 (d każdy,  $J_1 = 7,0$  Hz,  $J_2 = 8,1$  Hz), 120,25 i 120,12, 116,42 i 116,38, 115,38 i 115,28, 52,94 i 52,92, 44,32 i 44,28, 32,27 i 31,65 (d każdy,  $J_1 = 91,3$  Hz,  $J_2 = 91,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  52,08, 51,97. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_{10}\text{P}+\text{H}^+$  441,0951, znaleziono 441,0996.

**Kwas 2-karboksy-2-(3,4-dihydroksyfenylo)etylo-*H*-fosfinowy (P1.9)** został otrzymany z substratu P1.3 (1,4 mmol, 0,40 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,15 g (44%) oleistego produktu o lekko brązowej barwie.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  6,87 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 6,87 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 6,84 (ddd,  $J = 551,5, 2,8, 1,5$  Hz, 1H), 6,78 (dd,  $J = 8,2, 2,2$  Hz, 1H), 3,87 (ddd,  $J = 10,1, 7,8, 7,7$  Hz, 1H), 2,42 (dddd,  $J = 16,5, 15,4, 7,6, 2,8$  Hz, 1H), 2,18 (dddd,  $J = 15,4, 14,4, 7,8, 1,5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  176,95 (d,  $J = 10,8$  Hz), 144,31, 143,73, 130,37 (d,  $J = 9,5$  Hz), 120,31, 116,48, 115,48, 44,34, 32,87 (d,  $J = 91,8$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  31,84. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_6\text{P}+\text{Na}^+$  269,0191, znaleziono 269,0160.

**Kwas 2-karboksy-2-(3,4-dihydroksyfenylo)etylo-*P*-(2-karboksyetylo)-fosfinowy (P1.10)** został otrzymany z substratu P1.5 (1,1 mmol, 0,40 g) zgodnie

z procedurą A. Otrzymano 0,19 g (56%) oleistego produktu o lekko brązowej barwie. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 6,85 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 6,83 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,76 (dd, *J* = 8,2, 2,2 Hz, 1H), 3,82 (ddd, *J* = 9,3, 9,2, 6,2 Hz, 1H), 2,57 – 2,24 (m, 4H), 1,77 – 1,62 (m, 1H), 1,62 – 1,45 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 176,81 (d, *J* = 13,5 Hz), 176,21 (d, *J* = 16,7 Hz), 144,47, 144,00, 130,18 (d, *J* = 6,6 Hz), 120,47, 116,57, 115,44, 44,56, 31,40 (d, *J* = 91,6 Hz), 26,21 (d, *J* = 2,6 Hz), 23,88 (d, *J* = 92,5 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 53,87. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>O<sub>8</sub>P+Na<sup>+</sup> 341,0402, znaleziono 341,0393.

**Kwas 2-karboksy-2-(3,4-dihydroksyfenylo)etylofosfonowy (P1.11)** został otrzymany z substratu P1.6 (2,1 mmol, 0,65 g) zgodnie z procedurą A. Otrzymano 0,18 g (32%) oleistego produktu o lekko brązowej barwie. Natomiast z 0,050 g (0,16 mmol) substratu zgodnie z procedurą B otrzymano 0,020 g (46%). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 6,84 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 6,82 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,75 (dd, *J* = 8,2, 2,2 Hz, 1H), 3,80 (ddd, *J* = 11,6, 8,3, 6,2 Hz, 1H), 2,53 (ddd, *J* = 17,5, 15,4, 8,3 Hz, 1H), 2,09 (ddd, *J* = 17,7, 15,4, 6,2 Hz, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 177,16 (d, *J* = 10,2 Hz), 144,19, 143,60, 131,07 (d, *J* = 11,1 Hz), 120,10, 116,41, 115,32, 45,43 (d, *J* = 2,3 Hz), 30,36 (d, *J* = 135,6 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 26,31. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>P+Na<sup>+</sup> 285,0140, znaleziono 285,0160.

**Kwas 2-(2-bromo-4,5-dihydroksyfenylo)-2-karboksyetylofosfinowy (P1.12)** został wyizolowany podczas chromatograficznego oczyszczania związku P1.11 (otrzymanego według procedury A). Otrzymano 0,020 g (3%) oleistego produktu ubocznego o brązowej barwie. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 7,04 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,25 (ddd, *J* = 12,4, 7,3, 7,2 Hz, 1H), 2,53 (ddd, *J* = 17,9, 15,6, 7,2 Hz, 1H), 2,18 (ddd, *J* = 17,9, 15,6, 7,3 Hz, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 176,18 (d, *J* = 12,2 Hz), 144,59, 144,04, 129,25 (d, *J* = 9,2 Hz), 120,02, 116,17, 113,02, 44,64, 29,24 (d, *J* = 137,0 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O)**



$\delta$  26,93. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_9H_{10}BrO_7P+H^+$  340,9426, znaleziono 340,9426.

**2-(3,4-Dimetoksyfenylo)etylofosfonian dietylu (P1.15).** 4-(2-Bromoetylo)-1,2-dimetoksybenzen (4,7 mmol, 1,2 g) i fosforyn trietylu (9,4 mmol, 1,6 g) ogrzewano w syntezaorze mikrofalowym w temperaturze 140°C przez 2 h. Następnie roztwór ochłodzono do temperatury pokojowej i odparowano nadmiar fosforynu trietylu pod zmniejszonym ciśnieniem. Brązową oleistą mieszaninę oczyszczono metodą chromatografii *flash*, stosując gradient octan etylu/metanol, 100/0  $\rightarrow$  10/90 v/v. Otrzymano 1,2 g (85%) oleistego produktu o słomkowej barwie.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  6,88 – 6,85 (m, 2H), 6,78 (dd,  $J = 8,1, 2,1$  Hz, 1H), 4,07 (m, 4H), 3,82 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 2,88 – 2,77 (m, 2H), 2,16 – 2,03 (m, 2H), 1,30 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  150,53, 149,13, 135,02 (d,  $J = 16,4$  Hz), 121,41, 113,23, 113,20, 63,19 (d,  $J = 6,6$  Hz), 56,53, 56,42, 29,04 (d,  $J = 4,6$  Hz), 28,01 (d,  $J = 138,2$  Hz), 16,69 (d,  $J = 6,3$  Hz).  **$^{31}P$  NMR (162 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  32,73. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{14}H_{23}O_5P+H^+$  303,1361, znaleziono 303,1398.

**Kwas 2-(3,4-dihydroksyfenylo)etylofosfonowy (P1.16)** został otrzymany z substratu P1.15 (1,7 mmol, 0,50 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,19 g (53%) kremowych kryształów.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  6,77 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 6,75 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 6,65 (dd,  $J = 8,1, 2,0$  Hz, 1H), 2,74 – 2,63 (m, 2H), 2,02 – 1,89 (m, 2H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  143,90, 142,16, 134,36 (d,  $J = 17,4$  Hz), 120,28, 116,29, 115,90, 28,56 (d,  $J = 132,5$  Hz), 27,54 (d,  $J = 4,0$  Hz).  **$^{31}P$  NMR (162 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  30,44. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_8H_{11}O_5P+H^+$  219,0422, znaleziono 219,0421.

#### 4.2.2. Fosfonowe pochodne *N*-podstawionego 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu

##### 4.2.2.1. Synteza aminofenylofosfonianów

**(3-Aminofenylo)fosfonianu dietylu (P2.1.1).** 3-Bromoanilinę (35 mmol, 6,0 g), fosforyn dietylu (44 mmol, 6,0 g), trifenylofosfinę (5,9 mmol, 1,6 g), octan palladu(II) (2,4 mmol, 0,55 g) oraz trietyloaminę (87 mmol, 8,8 g) ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia w etanolu (25 ml) w atmosferze argonu przez 24 h. Po ochłodzeniu mieszaniny poreakcyjnej odsączono osad i odparowano lotne składniki przesączu. Uzyskaną oleistą mieszaninę poddano oczyszczaniu z zastosowaniem chromatografii *flash*, stosując gradient heksan/octan etylu, 20/80 → 0/100 v/v. Otrzymano 6,4 g (80%) pomarańczowego oleju.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,23 (ddd,  $J = 8,1, 7,3, 5,3$  Hz, 1H), 7,08 (ddd,  $J = 14,45, 1,7, 1,6$  Hz, 1H), 7,02 (dddd,  $J = 13,2, 7,4, 1,2, 1,2$  Hz, 1H), 6,91 (dddd,  $J = 8,1, 2,3, 1,1, 1,1$  Hz, 1H), 4,07 (m, 4H), 1,31 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  149,67 (d,  $J = 18,1$  Hz), 130,55 (d,  $J = 17,5$  Hz), 128,84 (d,  $J = 187,3$  Hz), 121,27 (d,  $J = 9,8$  Hz), 120,31 (d,  $J = 3,4$  Hz), 118,38 (d,  $J = 11,5$  Hz), 63,59 (d,  $J = 5,7$  Hz), 16,57 (d,  $J = 6,3$  Hz).  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  21,26. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{P}+\text{H}^+$  230,0946, znaleziono 230,0862.

**(4-Aminofenylo)fosfonianu dietylu (P2.2.1).** 4-Iodoanilinę (40 mmol, 8,7 g), fosforyn trietylu (80 mmol, 13,3 g), tri-*n*-propyloaminę (80 mmol, 11,5 g), bromek tetra-*n*-butyloamoniowy (6,0 mmol, 1,9 g) oraz chlorek palladu(II) (2,0 mmol, 0,35 g) ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia w wodzie (100 ml) przez 3 h. Po ochłodzeniu mieszaniny poreakcyjnej wyekstrahowano produkt do warstwy organicznej kilkoma porcjami octanu etylu (3 × 50 ml). Warstwę organiczną przemyto solanką (20 ml) i wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu osadu rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizowano z octanu etylu.

Otrzymano 4,9 g (53%) kremowych kryształów. Temperatura topnienia: 117-118°C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 7,44 (dd, *J* = 12,8, 8,6 Hz, 2H), 6,71 (dd, *J* = 8,6, 3,9 Hz, 2H), 4,02 (m, 4H), 1,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 154,39 (d, *J* = 2,9 Hz), 134,40 (d, *J* = 11,8 Hz), 114,77 (d, *J* = 16,1 Hz), 112,96 (d, *J* = 200,8 Hz), 63,18 (d, *J* = 5,5 Hz), 16,58 (d, *J* = 6,6 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 23,49. **HRMS (ESI) *m/z*** obliczono dla C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>P+H<sup>+</sup> 230,0946, znaleziono 230,0918.

#### 4.2.2.2. Synteza (aminofenylo)alkilofosfonianów

**Synteza fosfonianów w reakcji Arbuzowa (procedura C).** Bromek alkilowy (1 eq.) oraz fosforyn trietylu (2 eq.) ogrzewano w synteźatorze mikrofalowym w 140°C przez 2 h. Po ochłodzeniu mieszaniny poreakcyjnej odparowano lotne składniki pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość oczyszczono z zastosowaniem chromatografii *flash*, stosując gradient heksan/octan etylu, 20/80 → 0/100 v/v.

**(3-Nitrobenzylo)fosfonian dietylu (P2.3.1)** został zsyntetyzowany z bromku 3-nitrobenzyłu (9,3 mmol, 2,0 g) oraz fosforynu trietylu (19 mmol, 3,1 g) zgodnie z procedurą C. Otrzymano 2,3 g (91%) pomarańczowego oleju. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 8,20 (dd, *J* = 2,3, 2,3 Hz, 1H), 8,12 (dddd, *J* = 8,3, 2,3, 2,3, 1,1 Hz, 1H), 7,70 (dddd, *J* = 7,6, 2,6, 1,8, 1,1 Hz, 1H), 7,55 (td, *J* = 8,3, 1,2 Hz, 1H), 4,06 (m, 4H), 3,40 (d, *J* = 21,9 Hz, 2H), 1,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 149,63, 137,36 (d, *J* = 6,3 Hz), 135,56 (d, *J* = 9,5 Hz), 130,72 (d, *J* = 2,9 Hz), 125,68 (d, *J* = 6,6 Hz), 122,94 (d, *J* = 3,4 Hz), 63,92 (d, *J* = 6,9 Hz), 33,18 (d, *J* = 137,9 Hz), 16,63 (d, *J* = 6,0 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 26,73. **HRMS (ESI) *m/z*** obliczono dla C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>P+H<sup>+</sup> 274,0844, znaleziono 274,0818.

**(4-Nitrobenzylo)fosfonian dietylu (P2.4.1)** został zsyntetyzowany z bromku 4-nitrobenzyłu (17 mmol, 3,8 g) oraz fosforynu trietylu (35 mmol, 5,8 g) zgodnie z procedurą C. Otrzymano 4,0 g (84%) pomarańczowego oleju.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8,20 (dd,  $J = 8,9, 1,1$  Hz, 2H), 7,56 (dd,  $J = 8,9, 2,6$  Hz, 2H), 4,08 (m, 4H), 3,43 (d,  $J = 22,5$  Hz, 2H), 1,27 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  148,45 (d,  $J = 4,0$  Hz), 141,16 (d,  $J = 9,5$  Hz), 132,12 (d,  $J = 6,3$  Hz), 124,51 (d,  $J = 3,2$  Hz), 63,95 (d,  $J = 6,9$  Hz), 33,65 (d,  $J = 137,0$  Hz), 16,63 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  26,34. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_5\text{P}+\text{H}^+$  274,0844, znaleziono 274,0846.

**(3-Nitrofenetylo)fosfonian dietylu (P2.5.1)** został zsyntetyzowany z bromku 3-nitrofenetylu (6,5 mmol, 1,5 g) oraz fosforynu trietylu (13 mmol, 2,2 g) zgodnie z procedurą C. Otrzymano 1,4 g (73%) pomarańczowego oleju.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8,16 (dd,  $J = 2,1, 2,1$  Hz, 1H), 8,09 (ddd,  $J = 8,1, 2,3, 1,1$  Hz, 1H), 7,69 (m, 1H), 7,55 (t,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 4,08 (m, 4H), 3,03 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 1,29 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  149,78, 144,35 (d,  $J = 14,9$  Hz), 135,92, 130,77, 124,18, 122,46, 63,32 (d,  $J = 6,6$  Hz), 29,15 (d,  $J = 4,9$  Hz), 27,19 (d,  $J = 140,5$  Hz), 16,66 (d,  $J = 6,3$  Hz).  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  31,77. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_5\text{P}+\text{H}^+$  288,1001, znaleziono 288,1004.

**(4-Nitrofenetylo)fosfonian dietylu (P2.6.1)** został zsyntetyzowany z bromku 4-nitrofenetylu (43 mmol, 10,0 g) oraz fosforynu trietylu (87 mmol, 14,4 g) zgodnie z procedurą C. Otrzymano 8,9 g (71%) pomarańczowego oleju.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8,15 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H), 7,55 – 7,48 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 3,00 (m, 2H), 2,16 (m, 2H), 1,30 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  150,03 (d,  $J = 15,5$  Hz), 148,14, 130,52, 124,65, 63,36 (d,  $J = 6,3$  Hz), 29,36 (d,  $J = 4,3$  Hz), 27,06 (d,  $J = 140,5$  Hz), 16,67 (d,

$J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  31,67. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{P}+\text{H}^+$  288,1001, znaleziono 288,1009.

**Redukcja związków nitrowych (procedura D).** Nitropochodna (1 eq.), chlorek cyny(II) (5 eq.) oraz stężony kwas solny (1 ml) były ogrzewane pod chłodnicą zwrotną w 96% etanolu (50 ml) w temperaturze wrzenia w atmosferze argonu przez 2 h. Po ochłodzeniu mieszaniny poreakcyjnej odparowano lotne substancje a pozostałość potraktowano octanem etylu (100 ml). Warstwę organiczną przemyto 1,0 M roztworem NaOH (40 ml) oraz solanką (20 ml), a następnie suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość oczyszczono z zastosowaniem chromatografii *flash* stosując gradient octan etylu/metanol, 100/0  $\rightarrow$  90/10 v/v.

**(3-Aminobenzyl)fosfonian dietylu (P2.3.2)** został otrzymany z substratu P2.4.1 (6,2 mmol, 1,7 g) i chlorku cyny(II) (31 mmol, 5,9 g) zgodnie z procedurą D. Otrzymano 1,2 g (82%) pomarańczowego oleju.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,04 (dt,  $J = 7,7, 1,1$  Hz, 1H), 6,70 – 6,58 (m, 3H), 4,02 (m, 4H), 3,10 (d,  $J = 21,7$  Hz, 2H), 1,25 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  147,66 (d,  $J = 2,9$  Hz), 131,81 (d,  $J = 9,2$  Hz), 128,88 (d,  $J = 3,2$  Hz), 119,37 (d,  $J = 6,6$  Hz), 116,63 (d,  $J = 6,6$  Hz), 113,92 (d,  $J = 3,7$  Hz), 62,36 (d,  $J = 6,9$  Hz), 32,47 (d,  $J = 137,6$  Hz), 15,32 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  28,65. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{P}+\text{H}^+$  244,1103, znaleziono 244,1073.

**(4-Aminobenzyl)fosfonian dietylu (P2.4.2)** został otrzymany z substratu P2.3.1 (13 mmol, 3,5 g) i chlorku cyny(II) (64 mmol, 12,1 g) zgodnie z procedurą D. Otrzymano 2,7 g (87%) kremowych kryształów. Temperatura topnienia: 92-95°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,04 (dd,  $J = 8,5, 2,6$  Hz, 2H), 6,68 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 3,99 (m, 4H), 3,08 (d,  $J = 20,9$  Hz, 2H), 1,24 (t,

$J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  147,83 (d,  $J = 3,4$  Hz), 131,60 (d,  $J = 6,6$  Hz), 121,22 (d,  $J = 9,8$  Hz), 116,67 (d,  $J = 3,2$  Hz), 63,58 (d,  $J = 7,2$  Hz), 32,77 (d,  $J = 138,7$  Hz), 16,66 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$ NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  29,12. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{P}+\text{H}^+$  244,1103, znaleziono 244,1073.

(3-Aminofenetylo)fosfonian dietylu (P2.5.2) został otrzymany z substratu P2.6.1 (4,2 mmol, 1,2 g) i chlorku cyny(II) (21 mmol, 4,0 g) zgodnie z procedurą D. Otrzymano 0,82 g (76%) pomarańczowego oleju.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,02 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1H), 6,63 – 6,53 (m, 3H) 4,07 (m, 4H), 2,76 (m, 2H), 2,06 (m, 2H), 1,31 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  147,63, 141,60 (d,  $J = 16,4$  Hz), 128,99, 117,61, 114,91, 113,44, 61,87 (d,  $J = 6,6$  Hz), 28,14 (d,  $J = 4,9$  Hz), 26,56 (d,  $J = 138,5$  Hz), 15,37 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  32,80. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{P}+\text{H}^+$  258,1259, znaleziono 258,1269.

(4-Aminofenetylo)fosfonian dietylu (P2.6.2) został otrzymany z substratu P2.5.1 (11 mmol, 3,1 g) i chlorku cyny(II) (54 mmol, 10,2 g) zgodnie z procedurą D. Otrzymano 2,0 g (72%) pomarańczowego oleju.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6,97 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 6,68 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 4,05 (m, 4H), 2,75 (m, 2H), 2,02 (m, 2H), 1,29 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  146,88, 131,64 (d,  $J = 16,4$  Hz), 129,76, 116,92, 63,12 (d,  $J = 6,6$  Hz), 28,62 (d,  $J = 4,6$  Hz), 28,22 (d,  $J = 137,6$  Hz), 16,70 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  32,96. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{P}+\text{H}^+$  258,1259, znaleziono 258,1265.

#### 4.2.2.3. Synteza (aminometylofenylo)metylofosfonianów

**Synteza halogenowych pochodnych *N*-podstawionego ftalimidu – I etap syntezy Gabriela (procedura E).** Dihalogenopochodną (2 eq.) oraz ftalimidek potasu (1 eq.) ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w DMF (50 ml) w 100°C przez 8 h. Następnie ochłodzono mieszaninę poreakcyjną, odsączono wydzielony osad i odparowano lotne składniki przesączu. Pozostałość rozpuszczono w CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml) i warstwę organiczną przemyto wodą destylowaną (2 × 50 ml) oraz solanką (50 ml), a następnie roztwór suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Odsączono środek suszący, odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość oczyszczano z zastosowaniem chromatografii *flash*, stosując gradient heksan/octan etylu, 90/10 → 0/100 v/v.

***N*-(3-(Chlorometylo)benzylo)ftalimid (P2.7.1)** został zsyntetyzowany z 1,3-*bis*(chlorometylo)benzenu (80 mmol, 14,0 g) oraz ftalimidku potasu (40 mmol, 7,4 g) zgodnie z procedurą E. Otrzymano 7,4 g (65%) bezbarwnych kryształów. Temperatura topnienia: 128-130°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,85 (dd, *J* = 5,4, 3,1 Hz, 2H), 7,71 (dd, *J* = 5,4, 3,1 Hz, 2H), 7,44 (s, 1H), 7,41 – 7,37 (m, 1H), 7,33 – 7,30 (m, 2H), 4,84 (s, 2H), 4,55 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168,13, 138,09, 137,02, 134,20, 132,18, 129,31, 128,92, 128,86, 128,29, 123,55, 46,06, 41,46. HRMS (ESI) *m/z* obliczono dla C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>2</sub>+H<sup>+</sup> 330,0130, znaleziono 330,0115.

***N*-(4-(Bromometylo)benzylo)ftalimid (P2.8.1)** został zsyntetyzowany z 1,4-*bis*(bromometylo)benzenu (52 mmol, 14,0 g) oraz ftalimidku potasu (26 mmol, 4,9 g) zgodnie z procedurą E. Otrzymano 5,7 g (65%) bezbarwnych kryształów. Temperatura topnienia: 143-144°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,84 (dd, *J* = 5,3, 3,1 Hz, 2H), 7,71 (dd, *J* = 5,5, 3,1 Hz, 2H), 7,41 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 4,83 (s, 2H), 4,45 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168,11, 137,52, 136,73, 134,20, 132,18, 129,52, 129,23,

123,52, 41,31, 33,15. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{16}H_{12}BrNO_2+H^+$  330,0130, znaleziono 330,0159.

**3-(Ftalimidometylo)benzylofosfonian dietylu (P2.7.2)** został zsyntetyzowany z substratu P2.7.1 (17 mmol, 5,0 g) oraz fosforynu trietylu (35 mmol, 5,8 g) zgodnie z procedurą C. Otrzymano 4,6 g (66%) bezbarwnych kryształów. Temperatura topnienia: 97-98°C.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  7,83 (dd,  $J = 5,4, 3,0$  Hz, 2H), 7,70 (dd,  $J = 5,4, 3,0$  Hz, 2H), 7,35 – 7,18 (m, 4H), 4,82 (s, 2H), 3,98 (m, 4H), 3,12 (d,  $J = 21,5$  Hz, 2H), 1,20 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  168,11, 136,75 (d,  $J = 3,2$  Hz), 134,16, 132,22 (d,  $J = 9,2$  Hz), 132,20, 129,99 (d,  $J = 6,9$  Hz), 129,43 (d,  $J = 6,3$  Hz), 129,06 (d,  $J = 2,9$  Hz), 127,25 (d,  $J = 3,4$  Hz), 123,48, 62,37 (d,  $J = 6,9$  Hz), 41,55, 33,74 (d,  $J = 137,9$  Hz), 16,44 (d,  $J = 6,0$  Hz).  **$^{31}P$  NMR (162 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  26,71. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{20}H_{22}NO_5P+H^+$  388,1314, znaleziono 388,1317.

**4-(Ftalimidometylo)benzylofosfonian dietylu (P2.8.2)** został zsyntetyzowany z substratu P2.8.1 (12 mmol, 4,0 g) oraz fosforynu trietylu (24 mmol, 4,0 g) zgodnie z procedurą C. Otrzymano 3,3 g (69%) bezbarwnych kryształów. Temperatura topnienia: 107-109°C.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  7,83 (dd,  $J = 5,5, 3,1$  Hz, 2H), 7,70 (dd,  $J = 5,5, 3,1$  Hz, 2H), 7,36 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 7,23 (dd,  $J = 8,3, 2,4$  Hz, 2H), 4,81 (s, 2H), 3,99 (m, 4H), 3,10 (d,  $J = 21,7$  Hz, 2H), 1,22 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  168,15, 135,13 (d,  $J = 4,0$  Hz), 134,14, 132,22, 131,32 (d,  $J = 9,5$  Hz), 130,16 (d,  $J = 6,6$  Hz), 128,96 (d,  $J = 3,2$  Hz), 123,47, 62,33 (d,  $J = 6,9$  Hz), 41,35, 33,50 (d,  $J = 138,2$  Hz), 16,47 (d,  $J = 6,0$  Hz).  **$^{31}P$  NMR (162 MHz,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  26,85. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{20}H_{22}NO_5P+H^+$  388,1314, znaleziono 388,1315.



**Synteza aminofosfonianów – hydrazynoliza ftalimidów – II etap syntezy Gabriela (procedura F).** Monohydrat hydrazyny (3 eq.) wkroplono do roztworu pochodnej ftalimidu (1 eq.) w etanolu (100 ml) w temperaturze pokojowej. Mieszano 12 h, a następnie odsączono powstały osad hydrazyny kwasu ftalowego i odparowano lotne składniki przesączu pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt rozpuszczono w octanie etylu, odsączono pozostałości hydrazyny i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczano z zastosowaniem chromatografii *flash*, stosując gradient octan etylu/metanol, 100/0 → 90/10 v/v.

**3-(Aminometylo)benzylofosfonian dietylu (P2.7.3)** został otrzymany z substratu P2.7.2 (4,6 mmol, 1,8 g) oraz monohydratu hydrazyny (14 mmol, 0,69 g) zgodnie z procedurą F. Otrzymano 0,92 g (77%) słomkowego oleju.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,37 – 7,21 (m, 4H), 4,03 (m, 4H), 3,86 (s, 2H), 3,25 (d,  $J = 21,7$  Hz, 2H), 1,26 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  141,66 (d,  $J = 3,3$  Hz), 133,17 (d,  $J = 9,4$  Hz), 130,48 (d,  $J = 6,6$  Hz), 130,11 (d,  $J = 6,6$  Hz), 129,93 (d,  $J = 3,2$  Hz), 127,51 (d,  $J = 3,7$  Hz), 63,73 (d,  $J = 6,9$  Hz), 45,93, 33,56 (d,  $J = 137,8$  Hz), 16,66 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  28,23. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{P}+\text{H}^+$  258,1259, znaleziono 258,1249.

**4-(Aminometylo)benzylofosfonian dietylu (P2.8.3)** został otrzymany z substratu P2.7.2 (3,4 mmol, 1,3 g) oraz monohydratu hydrazyny (10 mmol, 0,50 g) zgodnie z procedurą F. Otrzymano 0,70 g (81%) słomkowego oleju.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,40 – 7,30 (m, 4H), 4,03 (m, 4H), 3,92 (d,  $J = 1,8$  Hz, 2H), 3,25 (d,  $J = 21,7$  Hz, 2H), 1,26 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  138,23 (d,  $J = 4,0$  Hz), 132,57 (d,  $J = 9,4$  Hz), 131,43 (d,  $J = 6,6$  Hz), 129,35 (d,  $J = 3,2$  Hz), 63,70 (d,  $J = 6,9$  Hz), 45,23, 33,30 (d,  $J = 137,8$  Hz), 16,65 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  28,02.

**HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{12}H_{20}NO_3P+H^+$  258,1259, znaleziono 258,1265.

#### 4.2.2.4. Synteza aminoalkilofosfonianów

**2-(2-Bromoetylo)ftalimid (P2.9.1)** został zsyntetyzowany z 1,2-dibromoetanu (160 mmol, 30,0 g) oraz ftalimidku potasu (80 mmol, 14,8 g) zgodnie z procedurą E. Otrzymano 18,8 g (93%) bezbarwnych kryształów. Temperatura topnienia: 83-85°C.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  7,91 – 7,86 (m, 2H), 7,85 – 7,80 (m, 2H), 4,07 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 3,68 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  169,30, 135,56, 133,20, 124,30, 40,44, 29,26. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{10}H_8BrNO_2+H^+$  253,9817, znaleziono 253,9825.

**2-(3-Bromopropilo)ftalimid (P2.10.1)** został zsyntetyzowany z 1,3-dibromopropanu (148 mmol, 30,0 g) oraz ftalimidku potasu (74 mmol, 13,8 g) zgodnie z procedurą E. Otrzymano 18,4 g (92%) bezbarwnych kryształów. Temperatura topnienia: 70-72°C.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  7,88 – 7,83 (m, 2H), 7,83 – 7,77 (m, 2H), 3,82 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 3,47 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 2,22 (p,  $J = 6,6$  Hz, 2H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  169,78, 135,37, 133,41, 124,13, 37,64, 32,72, 30,91. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{11}H_{10}BrNO_2+H^+$  267,9973, znaleziono 267,9966.

**2-(4-Bromobutylo)ftalimid (P2.11.1)** został zsyntetyzowany z 1,4-dibromobutanu (140 mmol, 30,0 g) oraz ftalimidku potasu (70 mmol, 12,9 g) zgodnie z procedurą E. Otrzymano 17,7 g (90%) bezbarwnych kryształów. Temperatura topnienia: 79-81°C.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  7,88 – 7,83 (m, 2H), 7,83 – 7,77 (m, 2H), 3,70 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 3,49 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H), 1,85 (m, 4H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CD_3OD$ )**  $\delta$  169,85, 135,39, 133,36, 124,12, 37,83, 33,56, 31,14, 28,17. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{12}H_{12}BrNO_2+H^+$  282,0130, znaleziono 282,0132.

**2-(5-Bromopentyl)ftalimid (P2.12.1)** został zsyntetyzowany z 1,5-dibromopentanu (130 mmol, 30,0 g) oraz ftalimidku potasu (65 mmol, 12,1 g) zgodnie z procedurą E. Otrzymano 17,2 g (89%) bezbarwnych kryształów. Temperatura topnienia: 62-63°C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 7,87 – 7,82 (m, 2H), 7,81 – 7,77 (m, 2H), 3,68 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,44 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,89 (m, 2H), 1,69 (m, 2H), 1,49 (m, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 169,84, 135,34, 133,37, 124,08, 38,50, 34,03, 33,34, 28,61, 26,35. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>BrNO<sub>2</sub>+H<sup>+</sup> 296,0286, znaleziono 296,0265.

**Syntezę ftalimidoalkilofosfonianów dietylowych** przeprowadzono zgodnie z procedurą C, aczkolwiek etap konwencjonalnego ogrzewania został zastąpiony ogrzewaniem w synteźatorze mikrofalowym w 140°C przez 2 h.

**2-Ftalimidoetylofosfonian dietylu (P2.9.2)** został zsyntetyzowany z substratu P2.9.1 (73 mmol, 18,6 g) oraz fosforynu trietylu (146 mmol, 24,33 g). Otrzymano 21,9 g (96%) bezbarwnego oleju. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 7,89 – 7,84 (m, 2H), 7,84 – 7,77 (m, 2H), 4,08 (m, 4H), 3,94 (dt, *J* = 14,5, 7,3 Hz, 2H), 2,28 (dt, *J* = 18,2, 7,3 Hz, 2H), 1,27 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 169,28, 135,43, 133,44, 124,19, 63,51 (d, *J* = 6,6 Hz), 32,86 (d, *J* = 3,7 Hz), 24,74 (d, *J* = 140,8 Hz), 16,57 (d, *J* = 6,0 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 29,83. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub>P+H<sup>+</sup> 312,1001, znaleziono 312,0964.

**3-Ftalimidopropyl)fosfonian dietylu (P2.10.2)** został zsyntetyzowany z substratu P2.10.1 (68 mmol, 18,2 g) oraz fosforynu trietylu (136 mmol, 22,6 g). Otrzymano 21,3 g (96%) bezbarwnego oleju. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 7,88 – 7,82 (m, 2H), 7,82 – 7,77 (m, 2H), 4,08 (m, 4H), 3,72 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,02 – 1,78 (m, 4H), 1,31 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 169,79, 135,40, 133,33, 124,15, 63,33 (d,

$J = 6,6$  Hz), 39,06 (d,  $J = 19,0$  Hz), 23,48 (d,  $J = 139,3$  Hz), 22,75 (d,  $J = 1,7$  Hz), 16,69 (d,  $J = 6,0$  Hz).  **$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  32,88. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{P}+\text{H}^+$  326,1158, znaleziono 326,1157.

**4-Ftalimidobutylofosfonian dietylu (P2.11.2)** został zsyntetyzowany z substratu P2.11.1 (62 mmol, 17,5 g) oraz fosforynu trietylu (124 mmol, 20,6 g). Otrzymano 18,8 g (89%) bezbarwnego oleju. Temperatura topnienia: 77-79°C.  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  7,87 – 7,82 (m, 2H), 7,82 – 7,78 (m, 2H), 4,07 (m, 4H), 3,70 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,93 – 1,75 (m, 4H), 1,61 (m, 2H), 1,29 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H).  **$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  169,84, 135,39, 133,34, 124,11, 63,16 (d,  $J = 6,6$  Hz), 37,95, 30,04 (d,  $J = 16,1$  Hz), 25,11 (d,  $J = 140,5$  Hz), 20,71 (d,  $J = 5,2$  Hz), 16,69 (d,  $J = 6,0$  Hz).  **$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  33,60. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NO}_5\text{P}+\text{H}^+$  340,1314, znaleziono 340,1321.

**5-Ftalimidopentylofosfonian dietylu (P2.12.2)** został zsyntetyzowany z substratu P2.12.1 (57 mmol, 17,0 g) oraz fosforynu trietylu (114 mmol, 19,0 g). Otrzymano 19,2 g (95%) bezbarwnego oleju.  **$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  7,86 – 7,81 (m, 2H), 7,81 – 7,76 (m, 2H), 4,07 (m, 4H), 3,67 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 1,85 – 1,56 (m, 6H), 1,45 (m, 2H), 1,30 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H).  **$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  169,82, 135,34, 133,35, 124,07, 63,10 (d,  $J = 6,6$  Hz), 38,44, 28,97, 28,52 (d,  $J = 16,1$  Hz), 25,54 (d,  $J = 140,2$  Hz), 22,95 (d,  $J = 5,2$  Hz), 16,71 (d,  $J = 6,0$  Hz).  **$^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )**  $\delta$  33,93. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_5\text{P}+\text{H}^+$  354,1470, znaleziono 354,1458.

**Otrzymywanie aminoalkilofosfonianów** przeprowadzono zgodnie z procedurą F, aczkolwiek pominięto etap chromatograficznego oczyszczania. Związki zostały wstępnie oczyszczone poprzez utworzenie chlorowodorków: do oleistej

pozostałości (po odparowaniu lotnych składników przesączu po reakcji) rozpuszczonej w dioksanie (30 ml), dodano 4,0 M roztwór kwasu solnego w dioksanie (10 ml), ochłodzono, a wytrącony chlorowodorek aminy odsączono przemywając eterem dietylowym. Ponieważ chlorowodorki aminoalkilofosfonianów były higroskopijne ponownie zdeprotonowano grupę aminową zasadą, dodając osad do roztworu trietyloaminy (3 ml) w dichlorometanie (20 ml) i susząc nad bezwodnym siarczanem sodu – przesącz po odsączeniu środka suszącego używano bezpośrednio do reakcji z chlorkiem 2-(chloroseleno)benzoilu.

#### 4.2.2.5. Synteza chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu [91]

**Diselenek disodu.** W trójszyjnej kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w zamknięcie olejowe oraz termometr rozpuszczono wodorotlenek sodu (0,75 mol, 30,0 g) w metanolu (300 ml), dodano sproszkowany selen (0,25 mol, 19,7 g) oraz 100%-owy hydrat hydrazyny (64 mmol, 3,2 g). Składniki mieszano przez 48 h w temperaturze pokojowej.

**Sól diazoniowa kwasu antranilowego.** W zlewce rozpuszczono kwas antranilowy (0,25 mol, 34,3 g) w gorącym wodnym 10% roztworze kwasu solnego (200 ml), następnie ochłodzono roztwór w łaźni lodowej i dodano do niego porcjami schłodzony roztwór azotanu(III) sodu (0,28 mol, 18,6 g w 100 ml wody), tak aby temperatura mieszaniny nie przekroczyła  $-5^{\circ}\text{C}$ .

**Kwas 2,2'-diselenobisbenzoesowy.** Zimny roztwór soli diazoniowej wkroplono do schłodzonego do  $-20^{\circ}\text{C}$  roztworu diselenku disodu, tak aby temperatura mieszaniny reakcyjnej nie przekroczyła  $-10^{\circ}\text{C}$ . Reakcję kontynuowano w temperaturze pokojowej przez 48 h. Następnie odsączono nieprzereagowany selen a przesącz ogrzano do wrzenia z węglem aktywnym. Odsączono węgiel aktywny z przesącz zakwaszono stężonym kwasem solnym. Wytrącony osad

odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto gorącą wodą i rekrytalizowano z 1,4-dioksanu. Otrzymano 23,0 g (46%) kremowego osadu. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO)**  $\delta$  7,99 (dd,  $J = 7,7, 1,6$  Hz, 1H), 7,63 (dd,  $J = 8,0, 0,6$  Hz, 1H), 7,45 (ddd,  $J = 8,0, 7,7, 1,6$  Hz, 1H), 7,32 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO)**  $\delta$  169,10, 134,16, 133,99, 132,12, 130,02, 129,27, 127,09. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{14}H_{10}O_4Se_2+Na^+$  424,8807, znaleziono 424,8795.

**Chlorek 2-(chloroseleno)benzoilu.** Kwas 2,2'-diselenobisbenzoesowy (49 mmol, 19,5 g), chlorek tionylu (0,49 mol, 58,0 g) oraz DMF (1 ml) ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia przez 2 h. Następnie roztwór ochłodzono do temperatury pokojowej i odparowano lotne składniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą mieszaninę poreakcyjną rozpuszczono w toluenie i ponownie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Zestalony surowy produkt rekrytalizowano z heksanu. Otrzymano 24,2 g (98%) pomarańczowo-żółtych kryształów, które używano do dalszych reakcji bez dodatkowego oczyszczania.

#### 4.2.2.6. Synteza 1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onów

**Synteza 1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onów (procedura G).** Do roztworu aminy (1,0 eq.) w bezwodnym dichlorometanie (5 ml) dodano bezwodną trietyloaminę (2,5 eq.), a następnie wkroplono przez septę chlorek 2-(chloroseleno)benzoilu (0,95 eq.) rozpuszczony w bezwodnym dichlorometanie (1 ml). Po 48 h mieszania w temperaturze pokojowej dodano 5% wodny roztwór wodorowęglanu sodu (20 ml), mieszano 10 min i produkt ekstrahowano dichlorometanem (50 ml). Następnie warstwę organiczną przemyto 5% wodnym roztworem wodorosiarczanu sodu (20 ml) i solanką (20 ml). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu. Po odsączeniu środka suszącego odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość

oczyszczono z zastosowaniem chromatografii *flash*, stosując dichlorometan/metanol w gradiencie 100/0 → 90/10 v/v.

### **3-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)fenylofosfonian dietylu (P2.1.2)**

został zsyntetyzowany z substratu P2.1.1 (4,4 mmol, 1,0 g) oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (4,1 mmol, 1,0 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,90 g (53%) lekko żółtych kryształów. Temperatura topnienia: 107-110°C.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 8,07 (ddd, *J* = 14,5, 2,2, 1,4 Hz, 1H), 8,06 – 7,96 (m, 2H), 7,88 (dddd, *J* = 7,8, 2,3, 1,2, 1,2 Hz, 1H), 7,76 – 7,60 (m, 3H), 7,50 (ddd, *J* = 8,1, 7,3, 1,1 Hz, 1H), 4,16 (m, 4H), 1,35 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** 168,14, 141,25 (d, *J* = 18,9 Hz), 140,69, 133,90, 131,11 (d, *J* = 16,5 Hz), 130,72 (d, *J* = 3,4 Hz), 130,54 (d, *J* = 9,4 Hz), 130,34 (d, *J* = 189,9 Hz), 129,51, 129,27, 129,15, 127,67, 126,35, 64,11 (d, *J* = 5,9 Hz), 16,63 (d, *J* = 6,3 Hz).

**<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 18,30.

**<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 969,96. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>PSe+H<sup>+</sup> 412,0217, znaleziono 412,0180.

### **4-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)fenylofosfonian dietylu (P2.2.2)**

został zsyntetyzowany z substratu P2.2.1 (8,7 mmol, 2,0 g) oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (8,3 mmol, 2,1 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 2,5 g (74%) lekko żółtych kryształów. Temperatura topnienia: 165-170°C.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 8,01 (ddd, *J* = 7,9, 1,4, 0,6 Hz, 1H), 7,98 (ddd, *J* = 8,2, 0,9, 0,9 Hz, 1H), 7,88 (s, 2H), 7,86 (d, *J* = 2,5 Hz, 2H), 7,69 (ddd, *J* = 8,3, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 7,50 (ddd, *J* = 8,1, 7,2, 1,0 Hz, 1H), 4,14 (m, 4H), 1,34 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 168,11, 145,23, 140,57, 134,02, 133,91, 129,56, 129,40, 127,68, 126,29, 126,14 (d, *J* = 193,3 Hz), 125,84 (d, *J* = 15,5 Hz), 63,92 (d, *J* = 5,7 Hz), 16,62 (d, *J* = 6,3 Hz).

**<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 19,05.

**<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 968,38. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>PSe+H<sup>+</sup> 412,0217, znaleziono 412,0218.

**3-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)benzylofosfonian dietylu (P2.3.3)** został zsyntetyzowany z substratu P2.3.2 (2,5 mmol, 0,60 g) oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (2,3 mmol, 0,60 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,70 g (70%) żółty olej. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 7,99 (m, 2H), 7,68 (ddd, *J* = 8,3, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 7,57 (dd, *J* = 2,2, 2,2 Hz, 1H), 7,55 – 7,46 (m, 2H), 7,43 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,28 (dddd, *J* = 7,8, 2,8, 1,3, 1,3 Hz, 1H), 4,08 (m, 4H), 3,32 (d, *J* = 21,8 Hz, 2H), 1,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 8H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 167,97, 140,95, 140,64 (d, *J* = 3,3 Hz), 134,42 (d, *J* = 9,3 Hz), 133,65, 130,45 (d, *J* = 3,1 Hz), 129,58 (d, *J* = 6,6 Hz), 129,39, 129,29, 128,12 (d, *J* = 6,5 Hz), 127,53, 126,27, 125,34 (d, *J* = 3,6 Hz), 63,85 (d, *J* = 6,9 Hz), 33,48 (d, *J* = 137,8 Hz), 16,72 (d, *J* = 6,0 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 27,61. **<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 969,06. **HRMS (ESI) *m/z*** obliczono dla C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>PSe+H<sup>+</sup> 426,0374, znaleziono 426,0385.

**4-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)benzylofosfonian dietylu (P2.4.3)** został zsyntetyzowany z substratu P2.4.2 (4,1 mmol, 1,0 g) oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (3,9 mmol, 0,99 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 1,1 g (66%) lekko żółtych kryształów. Temperatura topnienia: 140-142°C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 7,99 (m, 2H), 7,68 (ddd, *J* = 8,3, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 7,57 (dd, *J* = 8,6, 1,1 Hz, 2H), 7,50 (ddd, *J* = 7,5, 7,3, 1,0 Hz, 1H), 7,42 (dd, *J* = 8,5, 2,6 Hz, 2H), 4,07 (m, 4H), 3,30 (d, *J* = 21,7 Hz, 2H), 1,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 167,96, 140,91, 139,35, 133,63, 131,89 (d, *J* = 6,6 Hz), 131,70 (d, *J* = 9,5 Hz), 129,38, 129,30, 127,52, 126,67 (d, *J* = 3,2 Hz), 126,25, 63,78 (d, *J* = 6,9 Hz), 33,22 (d, *J* = 137,9 Hz), 16,68 (d, *J* = 6,0 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 27,71. **<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 968,23. **HRMS (ESI) *m/z*** obliczono dla C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>PSe+H<sup>+</sup> 426,0374, znaleziono 426,0365.

**3-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)fenetylofosfonian dietylu (P2.5.3)** został zsyntetyzowany z substratu P2.5.2 (1,9 mmol, 0,50 g) oraz



chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,8 mmol, 0,47 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,45 g (56%) żółtego oleju. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 8,03 – 7,94 (m, 2H), 7,68 (ddd, *J* = 8,2, 7,3, 1,4 Hz, 1H), 7,54 – 7,46 (m, 2H), 7,45 – 7,38 (m, 2H), 7,23 (ddd, *J* = 6,4, 2,0, 2,0 Hz, 1H), 4,08 (m, 4H), 2,95 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,30 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 167,98, 143,64 (d, *J* = 15,8 Hz), 141,01, 140,56, 133,61, 130,59, 129,39, 129,28, 128,02, 127,51, 126,67, 126,24, 124,84, 63,28 (d, *J* = 6,7 Hz), 29,34 (d, *J* = 4,6 Hz), 27,55 (d, *J* = 139,5 Hz), 16,71 (d, *J* = 6,1 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 32,28. **<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 969,66. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>PSe+H<sup>+</sup> 440,0530, znaleziono 440,0538.

**4-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)fenetylofosfonian dietylu (P2.6.3)** został zsyntetyzowany z substratu P2.6.2 (1,9 mmol, 0,50 g) oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,8 mmol, 0,47 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,49 g (61%) lekko żółtych kryształów. Temperatura topnienia: 137-139°C. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 8,03 – 7,93 (m, 2H), 7,67 (ddd, *J* = 8,2, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 7,56 – 7,45 (m, 3H), 7,39 – 7,32 (m, 2H), 4,08 (m, 4H), 2,93 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 1,29 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 167,99, 141,15 (d, *J* = 15,8 Hz), 140,99, 138,70, 133,58, 130,20, 129,36, 129,27, 127,51, 126,95, 126,25, 63,27 (d, *J* = 6,6 Hz), 29,06 (d, *J* = 4,6 Hz), 27,65 (d, *J* = 139,2 Hz), 16,72 (d, *J* = 6,1 Hz). **<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 32,30. **<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 968,14. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>PSe+H<sup>+</sup> 440,0530, znaleziono 440,0523.

**(3-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)metylo)benzylofosfonian dietylu (P2.7.4)** został zsyntetyzowany z substratu P2.7.3 (3,5 mmol, 0,90 g) oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (3,3 mmol, 0,84 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,76 g (52%) żółtego oleju. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 7,97 (ddd, *J* = 7,9, 1,4, 0,6 Hz, 1H), 7,89 (ddd, *J* = 8,1, 0,9, 0,9 Hz, 1H), 7,61 (ddd, *J* = 8,3, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 7,46 (ddd, *J* = 8,1, 7,2, 1,0 Hz, 1H), 7,39 – 7,23

(m, 4H), 4,99 (s, 2H), 3,96 (m, 4H), 3,23 (d,  $J = 21,8$  Hz, 2H), 1,17 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 169,21, 141,14, 139,37 (d,  $J = 3,3$  Hz), 133,54 (d,  $J = 9,4$  Hz), 133,14, 130,78 (d,  $J = 6,5$  Hz), 129,99 (d,  $J = 3,2$  Hz), 128,98, 128,89, 128,01, 127,97, 127,21, 126,33, 63,75 (d,  $J = 6,9$  Hz), 54,81, 33,61 (d,  $J = 137,7$  Hz), 16,61 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  27,84.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 903,93. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  440,0530, znaleziono 440,0538.

**(4-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)metylo)benzylofosfonian**

**dietylu (P2.8.4)** został zsyntetyzowany z substratu P2.8.3 (2,7 mmol, 0,70 g) oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (2,6 mmol, 0,66 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,64 g (56%) lekko żółtych kryształów. Temperatura topnienia: 152-153°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,96 (ddd,  $J = 7,8, 1,4, 0,6$  Hz, 1H), 7,89 (ddd,  $J = 8,1, 0,9, 0,9$  Hz, 1H), 7,61 (ddd,  $J = 8,2, 7,2, 1,4$  Hz, 1H), 7,45 (ddd,  $J = 8,1, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 7,32 (m, 4H), 4,98 (d,  $J = 1,7$  Hz, 2H), 4,01 (m, 4H), 3,24 (d,  $J = 21,7$  Hz, 2H), 1,24 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  169,23, 141,11, 137,76 (d,  $J = 3,9$  Hz), 133,12, 132,72 (d,  $J = 9,3$  Hz), 131,43 (d,  $J = 6,6$  Hz), 129,53 (d,  $J = 3,2$  Hz), 128,94, 128,91, 127,21, 126,31, 63,74 (d,  $J = 6,9$  Hz), 54,81, 33,40 (d,  $J = 137,9$  Hz), 16,65 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  27,97.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 903,25. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  440,0530, znaleziono 440,0541.

**2-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)etylofosfonian dietylu (P2.9.3)**

został zsyntetyzowany z surowego produktu reakcji związku P2.9.2 (3,2 mmol, 1,00 g) z monohydratem hydrazyny (9,6 mmol, 0,48 g) otrzymanego zgodnie z procedurą F oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (3,1 mmol, 0,78 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,70 g (63%) pomarańczowego osadu. Temperatura topnienia: 123-124°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,97 – 7,89 (m, 2H), 7,62 (ddd,  $J = 8,3, 7,2, 1,4$  Hz, 1H), 7,45 (ddd,  $J = 8,0, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 4,11 (m, 4H),

4,04 (m, 2H), 2,30 (m, 2H), 1,29 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  169,35, 141,21, 133,18, 128,75, 128,73, 127,20, 126,40, 63,54 (d,  $J = 6,6$  Hz), 39,84 (d,  $J = 2,1$  Hz), 26,66 (d,  $J = 138,9$  Hz), 16,62 (d,  $J = 6,2$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  28,88.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  914,51. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  364,0217, znaleziono 364,0226.

**3-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)propylofosfonian dietylu (P2.10.3)** został zsyntetyzowany z surowego produktu reakcji związku P2.10.2 (3,1 mmol, 1,00 g) z monohydratem hydrazyny (9,2 mmol, 0,46 g) otrzymanego zgodnie z procedurą F oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (2,9 mmol, 0,74 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,75 g (68%) ciemnego oleju.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,97 – 7,90 (m, 2H), 7,61 (ddd,  $J = 8,3, 7,2, 1,4$  Hz, 1H), 7,44 (ddd,  $J = 8,0, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 4,08 (m, 4H), 3,90 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 2,07 – 1,93 (m, 2H), 1,93 – 1,78 (m, 2H), 1,30 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  169,39, 140,93, 133,10, 128,85, 128,82, 127,21, 126,36, 63,30 (d,  $J = 6,6$  Hz), 45,40 (d,  $J = 19,0$  Hz), 24,45 (d,  $J = 4,7$  Hz), 23,07 (d,  $J = 142,2$  Hz), 16,71 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  32,83.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  907,96. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  378,0373, znaleziono 378,0396.

**4-(3-Oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)butylofosfonian dietylu (P2.11.3)** został zsyntetyzowany z surowego produktu reakcji związku P2.11.2 (2,9 mmol, 1,00 g) z monohydratem hydrazyny (8,8 mmol, 0,44 g) otrzymanego zgodnie z procedurą F oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (2,8 mmol, 0,71 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,80 g (73%) ciemnego oleju.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,97 – 7,89 (m, 2H), 7,62 (ddd,  $J = 8,2, 7,2, 1,4$  Hz, 1H), 7,45 (ddd,  $J = 8,7, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 4,06 (m, 4H), 3,88 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 1,94 – 1,80 (m, 4H), 1,72 – 1,57 (m, 2H), 1,27 (t,  $J = 7,1$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  169,31, 140,89, 133,03,

129,00, 128,82, 127,19, 126,33, 63,15 (d,  $J = 6,6$  Hz), 44,46, 31,86 (d,  $J = 16,2$  Hz), 25,19 (d,  $J = 140,5$  Hz), 20,42 (d,  $J = 5,1$  Hz), 16,69 (d,  $J = 6,1$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  33,56.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  902,97. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  392,0530, znaleziono 392,0533.

**5-(3-Oksobenzod[1,2]selenazol-2(3H)-ilo)pentylfosfonian dietylu (P2.12.3)** został zsyntetyzowany z surowego produktu reakcji związku P2.12.2 (2,8 mmol, 1,00 g) z monohydratem hydrazyny (8,5 mmol, 0,42 g) otrzymanego zgodnie z procedurą F oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (2,7 mmol, 0,68 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,88 g (81%) ciemnego oleju.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,97 – 7,89 (m, 2H), 7,61 (ddd,  $J = 8,2, 7,2, 1,4$  Hz, 1H), 7,44 (ddd,  $J = 7,9, 7,2, 1,1$  Hz, 1H), 4,05 (m, 4H), 3,84 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 1,86 – 1,70 (m, 4H), 1,70 – 1,56 (m, 2H), 1,55 – 1,42 (m, 2H), 1,29 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  169,23, 140,87, 132,99, 129,08, 128,80, 127,17, 126,30, 63,09 (d,  $J = 6,6$  Hz), 45,14, 30,91, 28,39 (d,  $J = 16,1$  Hz), 25,62 (d,  $J = 140,4$  Hz), 23,09 (d,  $J = 5,2$  Hz), 16,71 (d,  $J = 6,0$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  33,90.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  902,95. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  406,0687, znaleziono 406,0688.

**(3-Oksobenzod[1,2]selenazol-2(3H)-ilo)fosforamid dietylu (P2.13)** został zsyntetyzowany z estru dietylowego amidu kwasu fosforowego (2,0 mmol, 0,30 g) oraz chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,9 mmol, 0,47 g) zgodnie z procedurą G. Otrzymano 0,32 g (51%) kremowego osadu. Temperatura topnienia 135-137°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,94 (m, 2H), 7,71 (ddd,  $J = 8,3, 7,2, 1,2$  Hz, 1H), 7,48 (ddd,  $J = 8,9, 7,2, 1,1$  Hz, 1H), 4,25 (m, 4H), 1,36 (dt,  $J = 7,1, 0,9$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  170,66, 143,88 (d,  $J = 4,0$  Hz), 134,90, 129,69, 128,68 (d,  $J = 11,8$  Hz), 127,61, 126,66, 66,28 (d,  $J = 6,0$  Hz), 16,41 (d,  $J = 6,6$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) -2.23.

$^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  989,15 (d,  $J = 7,9$  Hz). HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  335,9904, znaleziono 335,9884.

**Kwas 3-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)fenylofosfonowy (P2.1.3)** został otrzymany z substratu P2.1.2 (0,61 mmol, 0,25 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,13 g (60%) białego osadu. Temperatura topnienia: 223-225°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,87 (m, 2H), 7,81 – 7,64 (m, 3H), 7,56 – 7,44 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  167,95, 160,49, 142,71 (d,  $J = 165,6$  Hz), 140,08, 136,96 (d,  $J = 15,7$  Hz), 132,88, 130,11 (d,  $J = 8,2$  Hz), 129,02 (d,  $J = 13,5$  Hz), 128,10 (d,  $J = 9,5$  Hz), 128,01, 126,82, 126,66 (t,  $J = 13,4$  Hz), 124,63.  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  10,37.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  997,23. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  355,9591, znaleziono 355,9593.

**Kwas 4-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)fenylofosfonowy (P2.2.3)** został otrzymany z substratu P2.2.2 (0,61 mmol, 0,25 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,14 g (65%) białego osadu. Temperatura topnienia powyżej 260°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,85 – 7,73 (m, 4H), 7,62 (ddd,  $J = 8,5, 7,2, 1,3$  Hz, 1H), 7,49 – 7,39 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  167,72, 162,00, 140,83 (d,  $J = 166,8$  Hz), 139,89, 137,78 (d,  $J = 3,4$  Hz), 132,81, 131,44 (d,  $J = 9,5$  Hz), 127,90, 126,57, 126,37, 125,61 (d,  $J = 13,1$  Hz), 124,49.  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  10,84.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  997,91. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  355,9591, znaleziono 355,9673.

**Kwas 3-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)benzylofosfonowy (P2.3.4)** został otrzymany z substratu P2.3.3 (0,59 mmol, 0,25 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,10 g (48%) białego osadu. Temperatura topnienia: 200-205°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,93 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,88 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,53 (m, 1H), 7,44 – 7,34 (m, 3H), 7,30 (ddd,  $J = 7,5, 1,9, 1,9$  Hz, 1H), 2,90 (d,  $J = 19,6$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  168,04, 162,49,

140,33 (d,  $J = 7,9$  Hz), 137,17, 132,89, 129,66 (d,  $J = 5,2$  Hz), 129,14, 128,04, 127,58 (d,  $J = 5,6$  Hz), 126,67, 126,60, 124,67, 123,41, 37,24 (d,  $J = 121,7$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  17,71.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  996,60. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  369,9747, znaleziono 369,9730.

**Kwas 4-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)benzylofosfonowy (P2.4.4)** został otrzymany z substratu P2.4.3 (0,59 mmol, 0,25 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,11 g (53%) białego osadu. Temperatura topnienia powyżej 260°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,80 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,77 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,62 (m, 1H), 7,48 – 7,30 (m, 5H), 2,89 (d,  $J = 19,8$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  167,73, 162,07, 139,93, 138,84, 134,57, 132,71, 130,54 (d,  $J = 5,5$  Hz), 127,87, 126,56, 125,99, 124,50, 37,16 (d,  $J = 121,9$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  17,82.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  996,14. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  369,9747, znaleziono 369,9730.

**Kwas 2-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)etylofosfonowy (P2.9.4)** został otrzymany z substratu P2.9.3 (0,83 mmol, 0,30 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,15 g (59%) białego osadu. Temperatura topnienia: 215-217°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,83 – 7,74 (m, 2H), 7,60 (ddd,  $J = 8,4, 7,2, 1,3$  Hz, 1H), 7,44 (ddd,  $J = 8,0, 7,2, 1,1$  Hz, 1H), 3,77 (m, 2H), 1,74 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  167,98, 137,43, 133,05, 127,88, 127,22, 126,12, 125,09, 44,29 (d,  $J = 7,2$  Hz), 27,02 (d,  $J = 130,7$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  17,16.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  931,78. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  307,9591, znaleziono 307,9597.

**Kwas 3-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)propylofosfonowy (P2.10.4)** został otrzymany z substratu P2.10.3 (0,80 mmol, 0,30 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,16 g (63%) białego osadu. Temperatura topnienia: 222-223°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,74 (m, 2H), 7,57 (ddd,  $J = 8,5, 7,2,$

1,3 Hz, 1H), 7,39 (ddd,  $J = 8,0, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 3,78 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 1,89 (m, 2H), 1,49 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  168,37, 139,43, 132,19, 127,31, 126,76, 126,22, 124,50, 46,08 (d,  $J = 19,8$  Hz), 25,96 (d,  $J = 131,7$  Hz), 25,13 (d,  $J = 3,6$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  22,77.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  925,64. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  321,9748, znaleziono 321,9755.

**Kwas 4-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)butylofosfonowy (P2.11.4)** został otrzymany z substratu P2.11.3 (0,77 mmol, 0,30 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,17 g (66%) białego osadu. Temperatura topnienia: 226-228°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,77 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 7,74 (dd,  $J = 8,0, 1,4$  Hz, 1H), 7,55 (ddd,  $J = 8,2, 7,2, 1,4$  Hz, 1H), 7,40 (m, 1H), 3,70 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,72 (p,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,52 (m, 2H), 1,46 – 1,33 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  168,51, 138,19, 132,08, 127,89, 127,30, 126,32, 125,49, 44,23, 31,49 (d,  $J = 17,2$  Hz), 29,02 (d,  $J = 130,5$  Hz), 21,56 (d,  $J = 3,8$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  23,38.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  923,75. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  335,9904, znaleziono 335,9909.

**Kwas 5-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)pentylfosfonowy (P2.12.4)** został otrzymany z substratu P2.12.3 (0,74 mmol, 0,30 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,18 g (70%) białego osadu. Temperatura topnienia: 190-192°C.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,74 – 7,66 (m, 2H), 7,54 (ddd,  $J = 8,3, 7,2, 1,3$  Hz, 1H), 7,36 (ddd,  $J = 8,0, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 3,70 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 1,67 (p,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,45 – 1,28 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  168,22, 139,34, 132,11, 127,26, 126,79, 126,18, 124,45, 44,92, 29,42, 28,88 (d,  $J = 131,4$  Hz), 27,73 (d,  $J = 17,8$  Hz), 23,50 (d,  $J = 4,1$  Hz).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  24,35.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  923,22. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_4\text{PSe}+\text{H}^+$  350,0061, znaleziono 350,0070.

**Otrzymywanie monoestrów (procedura H).** Do fosfonianu dietylowego rozpuszczonego w metanolu (2 ml) dodano 2 M wodny roztwór wodorotlenku sodu (2 ml) i mieszano przez 2 h. Po odparowaniu rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem, produkt oczyszczono metodą chromatografii HPLC na odwróconej fazie, stosując gradient acetonitryl/woda, 10/90 → 90/10 v/v + 0,05% TFA, 45 min.

**Monoester etylowy kwasu 2-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)etylofosfonowego (P2.9.5)** został otrzymany z substratu P2.9.3 (0,28 mmol, 0,10 g) zgodnie z procedurą H. Otrzymano 0,040 g (43%) białego osadu. Temperatura topnienia: 210-211°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,80 (dd, *J* = 7,9, 1,2 Hz, 1H), 7,60 (dd, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 1H), 7,36 (ddd, *J* = 8,8, 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,31 (ddd, *J* = 8,8, 7,7, 1,2 Hz, 1H), 3,86 (m, 2H), 3,61 (m, 2H), 1,96 (m, 2H), 1,16 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 169,54, 135,60, 132,08, 130,84, 128,66, 127,56, 126,58, 60,78 (d, *J* = 6,0 Hz), 37,95 (d, *J* = 4,0 Hz), 26,70 (d, *J* = 131,6 Hz), 15,89 (d, *J* = 6,6 Hz). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 24,10. <sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 925,56. HRMS (ESI) *m/z* obliczono dla C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>PSe+H<sup>+</sup> 335,9904, znaleziono 335,9968.

**Monoester etylowy kwasu 5-(3-oksobenzo[*d*][1,2]selenazol-2(3*H*)-ilo)pentylfosfonowego (P2.12.5)** został otrzymany z substratu P2.12.3 (0,25 mmol, 0,10 g) zgodnie z procedurą H. Otrzymano 0,045 g (48%) białego osadu. Temperatura topnienia: 182-183°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,75 (dd, *J* = 7,9, 1,2 Hz, 1H), 7,61 (dd, *J* = 7,6, 1,6 Hz, 1H), 7,33 (ddd, *J* = 8,9, 7,9, 1,6 Hz, 1H), 7,28 (ddd, *J* = 8,9, 7,6, 1,2 Hz, 1H), 3,78 (m, 2H), 3,47 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,60 (p, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,55 – 1,42 (m, 4H), 1,42 – 1,33 (m, 2H), 1,14 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 169,42, 135,89, 131,99, 130,81, 128,40, 127,53, 126,61, 60,37 (d, *J* = 5,7 Hz), 42,49, 28,76, 27,41 (d, *J* = 17,2 Hz), 25,99 (d, *J* = 134,1 Hz), 22,58 (d, *J* = 5,2 Hz), 15,97 (d, *J* = 6,3 Hz). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 29,26. <sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, D<sub>2</sub>O)



$\delta$  917,83. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{14}H_{20}NO_4PSe+H^+$  378,0373, znaleziono 378,0499.

**Kwas 2-ftalimidoetylofosfonowy (P2.9.6)** został otrzymany z substratu P2.9.2 (0,16 mmol, 0,050 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,025 g (61%) białego osadu. Temperatura topnienia: 177-178°C.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  7,56 – 7,52 (m, 1H), 7,50 – 7,40 (m, 3H), 3,47 (m, 2H), 1,71 (m, 2H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  172,46, 134,58, 129,36, 127,18, 36,89, 29,04 (d,  $J = 126,4$  Hz).  **$^{31}P$  NMR (162 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  18,73. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{10}H_{10}NO_5P+H^+$  256,0375, znaleziono 256,0383.

**Kwas 5-ftalimidopentylofosfonowy (P2.12.6)** został otrzymany z substratu P2.12.2 (0,14 mmol, 0,050 g) zgodnie z procedurą B. Otrzymano 0,029 g (69%) białego osadu. Temperatura topnienia: 168-169°C.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  7,58 – 7,54 (m, 1H), 7,51 – 7,39 (m, 3H), 3,32 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 1,60 (p,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 1,55 – 1,45 (m, 2H), 1,46 – 1,31 (m, 4H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  172,88, 134,68, 129,34, 127,20, 40,05, 29,38 (d,  $J = 130,7$  Hz), 28,30 (d,  $J = 17,8$  Hz), 28,05, 23,91 (d,  $J = 4,3$  Hz).  **$^{31}P$  NMR (162 MHz,  $D_2O$ )**  $\delta$  24,90. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{13}H_{16}NO_5P+H^+$  298,0844, znaleziono 298,0844.

### 4.2.3. Halogenowe pochodne *N*-benzylo-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu

Wszystkie poniższe związki zostały zsyntetyzowane według procedury G stosując 1,0 eq. aminy, 3,0 eq. trietyloaminy i 1,0 eq. chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu. Zmodyfikowano proces oczyszczania: związków nie oczyszczano chromatograficznie, natomiast po ekstrakcji i odparowaniu rozpuszczalnika krystaliczną pozostałość traktowano eterem dietylowym, a następnie odsączano przemywając osad kolejnymi porcjami tego rozpuszczalnika.

***N*-Benzylo-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.1)** został zsyntetyzowany z benzyloaminy (1,4 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,4 mmol, 0,36 g). Otrzymano 0,25 g (63%) kremowego osadu. Temperatura topnienia: 137-139°C.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8,00 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,85 (dd,  $J = 7,8, 1,5$  Hz, 1H), 7,61 (ddd,  $J = 8,4, 7,2, 1,5$  Hz, 1H), 7,43 (ddd,  $J = 8,0, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 7,38 – 7,25 (m, 5H), 4,91 (s, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  166,45, 139,37, 138,38, 131,70, 128,64, 128,01, 127,87, 127,60, 127,57, 125,97, 125,94, 46,78.  $^{77}\text{Se NMR}$  (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  858,78. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NOSe}+\text{H}^+$  290,0084, znaleziono 290,0089.

***N*-(2,4-Dichlorobenzylo)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.2)** został zsyntetyzowany z 2,4-dichlorobenzyloaminy (0,85 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,85 mmol, 0,22 g). Otrzymano 0,25 g (82%) białego osadu. Temperatura topnienia: 196-198°C.  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8,03 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,85 (dd,  $J = 7,8, 1,6$  Hz, 1H), 7,68 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,63 (ddd,  $J = 8,4, 7,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,47 – 7,41 (m, 2H), 7,27 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 4,96 (s, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  166,85, 139,69, 134,85, 133,72, 133,35, 132,09, 131,25, 129,13, 127,91, 127,78, 127,59, 126,26, 126,13, 44,36.  $^{77}\text{Se NMR}$  (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  868,93.

**HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{14}H_9Cl_2NOSe+H^+$  357,9305, znaleziono 357,9310.

***N*-(2,5-Dichlorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.3)** został zsyntetyzowany z 2,5-dichlorobenzylaminy (0,85 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,85 mmol, 0,22 g). Otrzymano 0,19 g (62%) białego osadu. Temperatura topnienia: 205-207°C.  **$^1H$  NMR (600 MHz,  $(CD_3)_2SO$ )**  $\delta$  8,04 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,86 (dd,  $J = 7,8, 1,6$  Hz, 1H), 7,64 (ddd,  $J = 8,3, 7,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,55 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,48 – 7,41 (m, 2H), 7,28 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1H), 4,97 (s, 2H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $(CD_3)_2SO$ )**  $\delta$  166,66, 139,60, 137,84, 132,01, 131,91, 131,23 (2C), 129,26, 129,11, 127,59, 127,38, 126,05 (2C), 44,40.  **$^{77}Se$  NMR (76 MHz,  $(CD_3)_2SO$ )**  $\delta$  868,95. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{14}H_9Cl_2NOSe+H^+$  357,9305, znaleziono 357,9310.

***N*-(3,4-Dichlorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.4)** został zsyntetyzowany z 3,4-dichlorobenzylaminy (0,85 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,85 mmol, 0,22 g). Otrzymano 0,23 g (74%) kremowego osadu. Temperatura topnienia: 154-156°C.  **$^1H$  NMR (600 MHz,  $(CD_3)_2SO$ )**  $\delta$  8,04 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 7,85 (dd,  $J = 7,8, 1,6$  Hz, 1H), 7,62 (ddd,  $J = 8,4, 7,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,61 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,59 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 7,44 (ddd,  $J = 7,6, 7,1, 0,9$  Hz, 1H), 7,29 (dd,  $J = 8,3, 2,1$  Hz, 1H), 4,92 (s, 2H).  **$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $(CD_3)_2SO$ )**  $\delta$  166,65, 139,77, 139,56, 131,81, 131,07, 130,83, 130,03, 129,86, 128,26, 127,58 (2C), 126,08, 126,00, 45,43.  **$^{77}Se$  NMR (76 MHz,  $(CD_3)_2SO$ )**  $\delta$  863,65. **HRMS (ESI)**  $m/z$  obliczono dla  $C_{14}H_9Cl_2NOSe+H^+$  357,9305, znaleziono 357,9310.

***N*-(2-Fluorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.5)** został zsyntetyzowany z 2-fluorobenzylaminy (1,6 mmol, 0,20 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,6 mmol, 0,41 g). Otrzymano 0,25 g (50%) białego

osadu. Temperatura topnienia: 153-154°C. **<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 7,98 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,95 (dd, *J* = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 7,64 (ddd, *J* = 8,3, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 7,47 (ddd, *J* = 7,7, 7,7, 1,1 Hz, 1H), 7,42 (ddd, *J* = 7,6, 7,6, 2,0 Hz, 1H), 7,38 (dddd, *J* = 7,4, 7,4, 5,4, 1,8 Hz, 1H), 7,18 (m, 2H), 5,05 (s, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 167,53, 161,67 (d, *J* = 245,8 Hz), 139,70, 132,79, 131,53 (d, *J* = 3,8 Hz), 130,88 (d, *J* = 8,2 Hz), 128,93, 128,43, 126,92, 126,09, 125,97, 125,47 (d, *J* = 3,8 Hz), 116,16 (d, *J* = 21,3 Hz), 41,91 (d, *J* = 4,9 Hz). **<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ -119,46 (m). **<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 879,51 (d, *J* = 17,2 Hz). **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>FNOSe+H<sup>+</sup> 307,9990, znaleziono 307,9996.

***N*-(3-Fluorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.6)** został zsyntetyzowany z 3-fluorobenzylaminy (1,2 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,2 mmol, 0,30 g). Otrzymano 0,15 g (41%) kremowego osadu. Temperatura topnienia: 138-140°C. **<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO)** δ 8,09 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,85 (dd, *J* = 7,7, 1,2 Hz, 1H), 7,61 (ddd, *J* = 8,0, 8,0, 1,7 Hz, 1H), 7,43 (ddd, *J* = 7,4, 7,4, 1,0 Hz, 1H), 7,39 (m, 1H), 7,17 – 7,08 (m, 3H), 4,92 (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO)** δ 166,61, 162,28 (d, *J* = 243,9 Hz), 141,48 (d, *J* = 7,2 Hz), 139,63, 131,70, 130,65 (d, *J* = 8,3 Hz), 127,83, 127,56, 126,21, 125,96, 123,94 (d, *J* = 2,9 Hz), 114,60 (d, *J* = 21,5 Hz), 114,29 (d, *J* = 20,7 Hz), 46,10. **<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO)** δ -113,04 (m). **<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO)** δ 857,44. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>FNOSe+H<sup>+</sup> 307,9990, znaleziono 307,9996.

***N*-(4-Fluorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.7)** został zsyntetyzowany z 4-fluorobenzylaminy (1,2 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,2 mmol, 0,30 g). Otrzymano 0,19 g (53%) białego osadu. Temperatura topnienia: 153-155°C. **<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 7,96 (m, 2H), 7,63 (ddd, *J* = 8,2, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 7,47 (ddd, *J* = 8,2, 7,2, 1,0

Hz, 1H), 7,46 – 7,43 (m, 2H), 7,12 (dd,  $J = 8,9, 8,9$  Hz, 2H), 4,98 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,50, 163,23 (d,  $J = 244,1$  Hz), 139,69, 135,47 (d,  $J = 3,3$  Hz), 132,75, 131,20 (d,  $J = 8,7$  Hz), 128,94, 128,61, 126,90, 126,08, 116,17 (d,  $J = 21,8$  Hz), 47,51.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -116,11 (m).  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  876,98. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FNOSe}+\text{H}^+$  307,9990, znaleziono 307,9993.

***N*-(2,4-Difluorobenzyl)-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-on (P3.8)** został zsyntetyzowany z 2,4-difluorobenzylaminy (1,0 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,0 mmol, 0,27 g). Otrzymano 0,30 g (89%) białego osadu. Temperatura topnienia: 187-188°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,98 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,94 (dd,  $J = 7,9, 1,5$  Hz, 1H), 7,64 (ddd,  $J = 8,3, 7,2, 1,5$  Hz, 1H), 7,52 – 7,46 (m, 2H), 7,07 (ddd,  $J = 10,3, 9,1, 2,5$  Hz, 1H), 7,02 (dddd,  $J = 8,5, 8,5, 2,5, 1,0$  Hz, 1H), 5,03 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,54, 163,56 (dd,  $J = 247,6, 11,8$  Hz), 161,75 (dd,  $J = 248,3, 12,5$  Hz), 139,67, 132,85, 132,83 (dd,  $J = 9,2, 5,5$  Hz), 128,93, 128,36, 126,96, 126,10, 122,42 (dd,  $J = 15,3, 3,5$  Hz), 112,41 (dd,  $J = 21,2, 3,8$  Hz), 104,54 (t,  $J = 26,0$  Hz), 41,45 (d,  $J = 4,2$  Hz).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -111,78 (m, 1F), -114,82 (m, 1F).  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  876,17 (d,  $J = 17,9$  Hz). HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_2\text{NOSe}+\text{H}^+$  325,9896, znaleziono 325,9905.

***N*-(2,6-Difluorobenzyl)-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-on (P3.9)** został zsyntetyzowany z 2,6-difluorobenzylaminy (1,0 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,0 mmol, 0,27 g). Otrzymano 0,25 g (74%) białego osadu. Temperatura topnienia: 192-193°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,95 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,93 (dd,  $J = 7,7, 1,5$  Hz, 1H), 7,62 (ddd,  $J = 8,2, 7,1, 1,4$  Hz, 1H), 7,53 – 7,43 (m, 2H), 7,09 (dd,  $J = 8,1, 8,1$  Hz, 2H), 5,12 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,07, 162,49 (dd,

$J = 249,0, 7,6$  Hz), 139,36, 132,78, 131,90 (t,  $J = 10,4$  Hz), 128,93, 128,42, 126,95, 126,02, 114,59 (t,  $J = 19,4$  Hz), 112,47 (dd,  $J = 21,2, 4,5$  Hz), 35,86 (t,  $J = 3,8$  Hz).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -114,81 (m).  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  872,54 (t,  $J = 21,9$  Hz). HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_2\text{NOSe}+\text{H}^+$  325,9896, znaleziono 325,9905.

***N*-(3,4-Difluorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.10)** został zsyntetyzowany z 3,4-difluorobenzylaminy (1,0 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,0 mmol, 0,27 g). Otrzymano 0,23 g (68%) białego osadu. Temperatura topnienia: 151-152°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,98 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 7,96 (dd,  $J = 7,9, 1,7$  Hz, 1H), 7,65 (ddd,  $J = 8,3, 7,2, 1,7$  Hz, 1H), 7,48 (ddd,  $J = 7,7, 7,4, 1,0$  Hz, 1H), 7,38 (ddd,  $J = 11,5, 7,7, 2,2$  Hz, 1H), 7,31 (ddd,  $J = 10,5, 8,3, 8,3$  Hz, 1H), 7,25 (m, 1H), 4,99 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,65, 150,92 (dd,  $J = 246,1, 12,9$  Hz), 150,49 (dd,  $J = 245,5, 12,5$  Hz), 139,72, 137,03 (dd,  $J = 5,6, 4,0$  Hz), 132,88, 128,99, 128,35, 126,97, 126,13, 125,72 (dd,  $J = 6,6, 3,1$  Hz), 118,33 (d,  $J = 17,3$  Hz), 118,05 (d,  $J = 18,0$  Hz), 47,15.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -139,56 (m, 1F), -141,43 (m, 1F).  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  883,71. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_2\text{NOSe}+\text{H}^+$  325,9896, znaleziono 325,9904.

***N*-(3,5-Difluorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.11)** został zsyntetyzowany z 3,5-difluorobenzylaminy (1,0 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,0 mmol, 0,27 g). Otrzymano 0,15 g (44%) białego osadu. Temperatura topnienia: 149-150°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  8,00 (dd,  $J = 8,1, 1,0$  Hz, 1H), 7,97 (dd,  $J = 7,8, 1,5$  Hz, 1H), 7,66 (ddd,  $J = 8,1, 7,2, 1,5$  Hz, 1H), 7,49 (ddd,  $J = 8,1, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 7,05 (dd,  $J = 8,4, 2,4$  Hz, 2H), 6,95 (dddd,  $J = 9,3, 9,3, 2,4, 2,4$  Hz, 1H), 5,04 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,78, 164,02 (dd,  $J = 247,4, 12,5$  Hz),

144,02 (t,  $J = 9,0$  Hz), 139,78, 132,97, 129,04, 128,17, 127,01, 126,18, 111,77 (dd,  $J = 20,4, 5,2$  Hz), 103,58 (t,  $J = 25,9$  Hz), 47,30 (q,  $J = 2,7$  Hz).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -110,85 (m).  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  889,75. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_2\text{NOSe}+\text{H}^+$  325,9896, znaleziono 325,9905.

***N*-(2,3,4-Trifluorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.12)** został zsyntetyzowany z 2,3,4-trifluorobenzylaminy (0,62 mmol, 0,10 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,62 mmol, 0,16 g). Otrzymano 0,055 g (26%) żółtego osadu. Temperatura topnienia: 178-180°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  8,00 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,94 (dd,  $J = 7,8, 2,1$  Hz, 1H), 7,65 (ddd,  $J = 8,3, 7,1, 1,5$  Hz, 1H), 7,48 (ddd,  $J = 8,0, 7,3, 1,1$  Hz, 1H), 7,27 (m, 1H), 7,19 (m, 1H), 5,07 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,65, 151,45 (ddd,  $J = 248,3, 9,9, 2,9$  Hz), 150,19 (ddd,  $J = 249,0, 10,1, 3,3$  Hz), 140,47 (dt,  $J = 249,4, 15,4$  Hz), 139,70, 132,97, 128,97, 128,14, 127,03, 126,17, 125,44 (dt,  $J = 9,0, 4,5$  Hz), 124,24 (dd,  $J = 12,0, 3,6$  Hz), 113,37 (dd,  $J = 17,7, 3,8$  Hz), 41,34 (t,  $J = 3,5$  Hz).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -137,06 (m 1F), -140,06 (m, 1F), -162,99 (m, 1F).  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  880,88 (d,  $J = 16,6$  Hz). HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{F}_3\text{NOSe}+\text{H}^+$  343,9801, znaleziono 343,9797.

***N*-(3-(Trifluorometylo)benzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.13)** został zsyntetyzowany z 3-(trifluorometylo)benzylaminy (0,86 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,86 mmol, 0,22 g). Otrzymano 0,16 g (53%) białego osadu. Temperatura topnienia: 134-135°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,99 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,97 (dd,  $J = 7,8, 1,7$  Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,71 – 7,58 (m, 4H), 7,49 (ddd,  $J = 7,8, 7,5, 1,0$  Hz, 1H), 5,12 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,53, 140,62, 139,57, 132,72, 132,69, 130,93 (q,  $J = 32,0$  Hz), 130,27, 128,80, 128,12, 126,78, 125,98, 125,40

(q,  $J = 4,0$  Hz), 125,05 (q,  $J = 3,9$  Hz), 125,04 (d,  $J = 271,7$  Hz), 47,41.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -62,96.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  883,95. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NOSe}+\text{H}^+$  357,9958, znaleziono 357,9954.

***N*-(4-(Trifluorometylo)benzylo)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.14)** został zsyntetyzowany z 4-(trifluorometylo)benzyloaminy (0,86 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,86 mmol, 0,22 g). Otrzymano 0,12 g (38%) białego osadu. Temperatura topnienia: 156-157°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  7,99 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 7,97 (dd,  $J = 7,9, 2,1$  Hz, 1H), 7,71 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 7,65 (ddd,  $J = 8,2, 7,2, 1,5$  Hz, 1H), 7,60 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 7,49 (ddd,  $J = 7,9, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 5,11 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,72, 143,98, 139,75, 132,91, 130,08 (q,  $J = 32,2$  Hz), 129,53, 129,02, 128,29, 126,99, 126,36 (q,  $J = 4,1$  Hz), 126,16, 125,34 (d,  $J = 271,3$  Hz), 47,63.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -62,86.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  885,50. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NOSe}+\text{H}^+$  357,9958, znaleziono 357,9957.

***N*-(3,5-Bis(trifluorometylo)benzylo)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.15)** został zsyntetyzowany z 3,5-bis(trifluorometylo)benzyloaminy (0,62 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,62 mmol, 0,16 g). Otrzymano 0,080 g (31%) białego osadu. Temperatura topnienia: 218-220°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  8,08 (s, 2H), 8,00 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,97 (dd,  $J = 7,8, 1,5$  Hz, 1H), 7,67 (ddd,  $J = 8,1, 7,2, 1,5$  Hz, 1H), 7,50 (ddd,  $J = 7,9, 7,2, 1,0$  Hz, 1H), 5,23 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  168,01, 142,91, 139,89, 133,08, 132,25 (q,  $J = 33,3$  Hz), 129,67 (q,  $J = 4,2$  Hz), 129,06, 128,04, 127,10, 124,42 (d,  $J = 272,6$  Hz), 122,23 (p,  $J = 4,2$  Hz), 47,24.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -63,15.  $^{77}\text{Se}$  NMR



(76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  879,91. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{F}_6\text{NOSe}+\text{H}^+$  425,9832 znaleziono 425,9841.

***N*-(2-Chloro-5-fluorobenzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.16)** został zsyntetyzowany z 2-chloro-5-fluorobenzylaminy (0,94 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,94 mmol, 0,24 g). Otrzymano 0,19 g (59%) białego osadu. Temperatura topnienia: 183-184°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  8,02 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,97 (dd,  $J = 7,8, 1,7$  Hz, 1H), 7,67 (ddd,  $J = 8,4, 7,2, 1,5$  Hz, 1H), 7,54 – 7,47 (m, 2H), 7,19 – 7,12 (m, 2H), 5,08 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,80, 162,46 (d,  $J = 244,8$  Hz), 139,92, 138,99, 132,98, 132,04 (d,  $J = 9,0$  Hz), 129,00, 128,08, 127,02, 126,20, 117,47 (d,  $J = 23,6$  Hz), 117,10 (d,  $J = 22,9$  Hz), 45,77.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -115,74 (m).  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  880,78. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClFNOSe}+\text{H}^+$  341,9600 znaleziono 341,9590.

***N*-(4-Chloro-3-(trifluorometylo)benzyl)-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-on (P3.17)** został zsyntetyzowany z 4-chloro-3-(trifluorometylo)benzylaminy (0,72 mmol, 0,15 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,72 mmol, 0,18 g). Otrzymano 0,16 g (57%) białego osadu. Temperatura topnienia: 141-143°C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  8,00 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,96 (dd,  $J = 7,8, 1,5$  Hz, 1H), 7,88 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H), 7,70 – 7,62 (m, 3H), 7,48 (ddd,  $J = 8,7, 7,3, 1,0$  Hz, 1H), 5,10 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  167,80, 139,79, 139,46, 134,34, 132,96, 132,80, 131,47, 129,01, 128,53 (q,  $J = 30,9$  Hz), 128,32 (q,  $J = 5,2$  Hz), 128,19, 127,02, 126,20, 123,93 (q,  $J = 272,6$  Hz), 47,05.  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  -62,91.  $^{77}\text{Se}$  NMR (76 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$  887,20. HRMS (ESI)  $m/z$  obliczono dla  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{NOSe}+\text{H}^+$  391,9568 znaleziono 391,9570.

***N*-(3-Fluoro-4-(trifluorometylo)benzylo)-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-on**

**(P3.18)** został zsyntetyzowany z 3-fluoro-4-(trifluorometylo)benzyloaminy (1,0 mmol, 0,20 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (1,0 mmol, 0,26 g). Otrzymano 0,13 g (35%) żółtego osadu. Temperatura topnienia: 155-157°C. **<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 8,01 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,97 (dd, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,74 (dd, *J* = 7,8, 7,8 Hz, 1H), 7,67 (ddd, *J* = 8,2, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 7,49 (ddd, *J* = 7,7, 7,2, 1,0 Hz, 1H), 7,43 – 7,39 (m, 2H), 5,12 (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 167,70, 160,29 (d, *J* = 254,4 Hz), 147,26 (d, *J* = 7,7 Hz), 139,67, 132,82, 128,84, 128,19 (d, *J* = 4,2 Hz), 127,85, 126,84, 126,03, 124,70 (d, *J* = 3,4 Hz), 123,56 (q, *J* = 271,0 Hz), 116,90 (d, *J* = 21,2 Hz), 46,96. **<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ -61,63 (d, *J* = 12,3 Hz, 3F), -116,30 (m, 1F). **<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 892,63. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>F<sub>4</sub>NOSe+H<sup>+</sup> 375,9864 znaleziono 375,9859.

***N*-(4-Fluoro-3-(trifluorometylo)benzylo)-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-on**

**(P3.19)** został zsyntetyzowany z 4-fluoro-3-(trifluorometylo)benzyloaminy (0,52 mmol, 0,10 g) i chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu (0,52 mmol, 0,13 g). Otrzymano 0,075 g (39%) białego osadu. Temperatura topnienia: 154-156°C. **<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 8,01 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,97 (dd, *J* = 7,9, 1,7 Hz, 1H), 7,74 (dd, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,67 (ddd, *J* = 8,3, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 7,49 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,44 – 7,38 (m, 2H), 5,12 (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 167,65, 160,31 (d, *J* = 254,5 Hz), 147,30 (d, *J* = 7,8 Hz), 139,64, 132,83, 128,85, 128,20 (d, *J* = 4,3 Hz), 127,87, 126,85, 126,03, 124,70 (d, *J* = 3,4 Hz), 123,58 (q, *J* = 271,2 Hz), 116,90 (d, *J* = 21,2 Hz), 46,96. **<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ -61,64 (d, *J* = 12,3 Hz, 3F), -116,31 (m, 1F). **<sup>77</sup>Se NMR (76 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO)** δ 892,08. **HRMS (ESI)** *m/z* obliczono dla C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>F<sub>4</sub>NOSe+H<sup>+</sup> 375,9864 znaleziono 375,9859.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. R. Söderlund, B.H. Svensson, *The global nitrogen cycle*. Ecological Bulletins 22 (1976) 23-73.
2. J.N. Galloway, F.J. Dentener, D.G. Capone, E.W. Boyer, R.W. Howarth, S.P. Seitzinger, G.P. Asner, C.C. Cleveland, P.A. Green, E.A. Holland, D.M. Karl, A.F. Michaels, J.H. Porter, A.R. Townsend, C.J. Vöösmary, *Nitrogen cycles: past, present, and future*. Biogeochemistry 70 (2004) 153-226.
3. D. Fowler, M. Coyle, U. Skiba, M.A. Sutton, J.N. Cape, S. Reis, L.J. Sheppard, A. Jenkins, B. Grizzetti, J.N. Galloway, P. Vitousek, A. Leach, A.F. Bouwman, K. Butterbach-Bahl, F. Dentener, D. Stevenson, M. Amann, M. Voss, *The global nitrogen cycle in the twenty-first century*. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 368 (2013) 20130164.
4. J.C. Polacco, M.A. Holland, *Roles of urease in plant cells*. Int. Rev. Cytol. 145 (1993) 65-103.
5. A. Sirko, R. Brodzik, *Plant ureases: roles and regulation*. Acta Biochim. Pol. 47 (2000) 1189-1195.
6. C.M. Solomon, J.L. Collier, G.M. Berg, P.M. Glibert, *Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review*. Aquat. Microb. Ecol. 59 (2010) 67-88.
7. J.J. Sigurdarson, S. Svane, H. Karring, *The molecular processes of urea hydrolysis in relation to ammonia emissions from agriculture*. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 17 (2008) 241-258.
8. J.M.C.S Magalhães, A.A.S.C Machado, *Urea potentiometric biosensor based on urease immobilized on chitosan membranes*. Talanta 47 (1998) 183-191.
9. N.J. Peng, K.H. Lai, R.S. Liu, S.C. Lee, D.G. Tsay, C.C. Lo, H.H. Tseng, W.K. Huang, G.H. Lo, P.I. Hsu, *Clinical significance of oral urease in diagnosis of Helicobacter pylori infection by [<sup>13</sup>C]urea breath test*. Dig. Dis. Sci. 46 (2001) 1772-1778.
10. T. Ahuja, D. Kumar, N. Singh, A.M. Biradar, Rajesh, *Potentiometric urea biosensor based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)/silica composite material*. Mater. Sci. Eng. C 31 (2011) 90-94.

11. J.Y. Kim, G.Y. Sung, M. Park, *Efficient portable urea biosensor based on urease immobilized membrane for monitoring of physiological fluids*. *Biomedicines* 8 (2020) 596.
12. R.L. Mulvaney, J.M. Bremner, *Control of urea transformation in soils*. *Soil Biochemistry* 5 (1981) 153-196.
13. M.R. Martins, S.A.C. Sant'Anna, M. Zaman, R.C. Santos, R.C. Monteiro, B.J.R. Alves, C.P. Jantalia, R.M. Boddey, S. Urquiaga, *Strategies for the use of urease and nitrification inhibitors with urea: Impact on N<sub>2</sub>O and NH<sub>3</sub> emissions, fertilizer-<sup>15</sup>N recovery and maize yield in a tropical soil*, *Agric. Ecosyst. Environ.* 247 (2017) 54-62.
14. Y. Li, L. Zhang, W. Liu, Z. Zhou, *Simultaneous removal of urea nitrogen and inorganic nitrogen from high-salinity wastewater by *Halomonas sp. H36**. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30 (2023) 2544-2554.
15. M.J.C. Alonso, C.E.L. Ortiz, S.O.G. Perez, R. Narayanasamy, G.D.J. Fajardo San Miguel, H.H. Hernández, N. Balagurusamy, *Improved strength and durability of concrete through metabolic activity of ureolytic bacteria*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25 (2018) 21451-21458.
16. R. Yamauchi, E. Maguin, H. Horiuchi, M. Hosokawa, Y. Sasaki, *The critical role of urease in yogurt fermentation with various combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus**. *J. Dairy Sci.* 102 (2019) 1033-1043.
17. S. Pernoud, C. Fremaux, A. Sepulchre, G. Corrieu, C. Monnet, *Effect of the Metabolism of Urea on the Acidifying Activity of *Streptococcus thermophilus**. *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 550-555.
18. S. Kodama, *Optimal conditions for effective use of acid urease in wine*. *J. Food Sci.* 61 (2006) 548-552.
19. F. Cosme, L. Filipe-Ribeiro, F.M. Nunes, *Wine stabilisation: an overview of defects and treatments, chemistry and biochemistry of winemaking*. *Wine Stabilization and Aging* (2021) 1-32.
20. Z.S. Varga, É. Lövitusz, Z.S. Csanádi, K. Bélafi-Bakó, *Manufacture of acid urease by *Lactobacillus fermentum* fermentation*. *Hung. J. Ind. Chem.* 39 (2011) 391-394.
21. P.M. Vitousek, J.D. Aber, R.W. Howarth, G.E. Likens, P.A. Matson, D.W. Schindler, W.H. Schlesinger, D.G. Tilman, *Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences*. *Ecol. Appl.* 7 (1997) 737-750.
22. B. Krajewska, *Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review*. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 59 (2009) 9-21.

23. F.A. Musculus, *Sur le ferment de l'urée*. Comptes rendus de l'Académie des sciences 82 (1876) 333-336.
24. J.B. Sumner, *The isolation and crystallization of the enzyme urease*. J. Biol. Chem. 69 (1926) 435-441.
25. N.E. Dixon, C. Gazzola, R.L. Blakeley, B. Zerner, *Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel*. J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 4131-4133.
26. P.A. Karplus, M.A. Pearson, R.P. Hausinger, *70 years of crystalline urease: What have we learned?* Acc. Chem. Res. 30 (1997) 330-337.
27. I. Konieczna, P. Zarnowiec, M. Kwinkowski, B. Kolesinska, J. Fraczyk, Z. Kaminski, W. Kaca, *Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases*. Curr. Protein Pept. Sci. 13 (2012) 789-806.
28. Z. Amtul, A.U. Rahman, R.A. Siddiqui, M.I. Choudhary, *Chemistry and mechanism of urease inhibition*. Curr. Med. Chem. 9 (2002) 1323-1348.
29. P. Kosikowska, Ł. Berlicki, *Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: A patent review*. Expert Opin. Ther. Pat. 21 (2011) 945-957.
30. P. Kafarski, M. Talma, *Recent advances in design of new urease inhibitors: A review*. J. Adv. Res. 13 (2018) 101-112.
31. S. Loharch, Ł. Berlicki, *Rational development of bacterial ureases inhibitors*. Chem. Rec. 22 (2022) e202200026.
32. N. Aniceto, V.D.B. Bonifácio, R.C. Guedes, N. Martinho, *Exploring the chemical space of urease inhibitors to extract meaningful trends and drivers of activity*. J. Chem. Inf. Model. 62 (2022) 3535-3550.
33. U.K. Schäfer, H. Kaltwasser, *Urease from Staphylococcus saprophyticus: purification, characterization and comparison to Staphylococcus xylosus urease*. Arch. Microbiol. 161 (1994) 393-399.
34. H. Nakano, S. Takenishi, Y. Watanabe, *Purification and properties of urease from Brevibacterium ammoniagenes*. Agric. Biol. Chem. 48 (1984) 1495-1502.
35. A. Contreras-Rodriguez, J. Quiroz-Limon, A.M. Martins, H. Peralta, E. Avila-Calderon, N. Sriranganathan, S.M. Boyle, A. Lopez-Merino, *Enzymatic, immunological and phylogenetic characterization of Brucella suis urease*. BMC Microbiol. 8 (2008) 121.
36. W.Y. Li, W.W. Ni, Y.X. Ye, H.L. Fang, X.M. Pan, J.L. He, T.L. Zhou, J. Yi, S.S. Liu, M. Zhou, Z.P. Xiao, H.L. Zhu, *N-monoarylacetoithiouras as potent urease inhibitors: synthesis, SAR, and biological evaluation*. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 35 (2020) 404-413.

37. K.M. Khan, F. Rahim, A. Khan, M. Shabeer, S. Hussain, W. Rehman, M. Taha, M. Khan, S. Perveen, M.I. Choudhary, *Synthesis and structure-activity relationship of thiobarbituric acid derivatives as potent inhibitors of urease*. *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 4119-4123.
38. F. Rahim, M. Ali, S. Ullah, U. Rashid, H. Ullah, M. Taha, M.T. Javed, W. Rehman, O.U.R. Abid, A.A. Khan, M. Bilal, *Development of bis-thiobarbiturates as successful urease inhibitors and their molecular modelling studies*. *Chin. Chem. Lett.* 27 (2016) 693-697.
39. M.J. Todd, R.P. Hausinger, *Competitive inhibitors of Klebsiella aerogenes urease. Mechanisms of interaction with the nickel active site*. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 15835-15842.
40. A.J. Pope, C.D. Toseland, B. Rushant, S. Richardson, M. McVey, J. Hills, *Effect of potent urease inhibitor, fluorofamide, on Helicobacter sp. in vivo and in vitro*. *Dig. Dis. Sci.* 43 (1998) 109-119.
41. K. Macegoniuk, E. Grela, J. Palus, E. Rudzińska-Szostak, A. Grabowiecka, M. Biernat, Ł. Berlicki, *1,2-Benzisoseleazol-3(2H)-one derivatives as a new class of bacterial urease inhibitors*. *J. Med. Chem.* 59 (2016) 8125-8133.
42. N.C. Bailie, C.A. Osborne, J.R. Leininger, T.F. Fletcher, S.D. Johnston, P.N. Ogburn, D.P. Griffith, *Teratogenic effect of acetohydroxamic acid in clinically normal beagles*. *Am. J. Vet. Res.* 47 (1986) 2604-2611.
43. D.P. Griffith, F. Khonsari, J.H. Skurnick, K.E. James, *A randomized trial of acetohydroxamic acid for the treatment and prevention of infection-induced urinary stones in spinal cord injury patients*. *J. Urol.* 140 (1988) 318-324.
44. S. Otake, K. Nakahashi, T. Morikawa, S. Takebe, K. Kobashi, *Inhibition of urease activity by dipeptidyl hydroxamic acids*. *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992) 2764-2768.
45. S. Otake, T. Morikawa, M. Tsuchiya, L. Imamura, K. Kobashi, *Inhibition of Helicobacter pylori urease activity by hydroxamic acid derivatives*. *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1994) 1329-1332.
46. G.W. McCarty, J.M. Bremner, S.J. Lee, *Inhibition of plant and microbial urease by phosphoramides*. *Plant Soil* 127 (1990) 269-283.
47. Takeda Chemical Industries Ltd, patent US5840917 (1998).
48. S. Vassiliou, P. Kosikowska, A. Grabowiecka, A. Yiotakis, P. Kafarski, Ł. Berlicki, *Computer-aided optimization of phosphinic inhibitors of bacterial ureases*. *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5597-5606.
49. Ł. Berlicki, M. Bochno, A. Grabowiecka, A. Białas, P. Kosikowska, P. Kafarski, *N-substituted aminomethanephosphonic and*

- aminomethane-P-methylphosphinic acids as inhibitors of ureases. Amino Acids* 42 (2012) 1937-1945.
50. S. Vassiliou, A. Grabowiecka, P. Kosikowska, Ł. Berlicki, *Three component Kabachnik-Fields condensation leading to substituted aminomethane-p-hydroxymethylphosphonic acids as a tool for screening of bacterial urease inhibitors. ARKIVOC* 2012 (2012) 33-43.
  51. K. Macegoniuk, A. Dziełak, A. Mucha, Ł. Berlicki, *Bis(aminomethyl)phosphinic acid, a highly promising scaffold for the development of bacterial urease inhibitors. ACS Med. Chem. Lett.* 6 (2014) 146-150.
  52. S. Vassiliou, A. Grabowiecka, P. Kosikowska, A. Yiotakis, P. Kafarski, Ł. Berlicki, *Design, synthesis, and evaluation of novel organophosphorus inhibitors of bacterial ureases. J. Med. Chem.* 51 (2008) 5736-5744.
  53. K. Macegoniuk, R. Kowalczyk, A. Rudzińska, M. Psurski, J. Wietrzyk, Ł. Berlicki, *Potent covalent inhibitors of bacterial urease identified by activity-reactivity profiling. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 1346-1350.
  54. V. Ntatsopoulos, S. Vassiliou, K. Macegoniuk, Ł. Berlicki, A. Mucha, *Novel organophosphorus scaffolds of urease inhibitors obtained by substitution of Morita-Baylis-Hillman adducts with phosphorus nucleophiles. Eur. J. Med. Chem.* 133 (2017) 107-120.
  55. V. Ntatsopoulos, K. Macegoniuk, A. Mucha, S. Vassiliou, Ł. Berlicki *Structural exploration of cinnamate-based phosphonic acids as inhibitors of bacterial ureases. Eur. J. Med. Chem.* 159 (2018) 307-316.
  56. T. Arshad, K. M. Khan, N. Rasool, U. Salar, S. Hussain, H. Asghar, M. Ashraf, A. Wadood, M. Riaz, S. Perveen, M. Taha, N. H. Ismail, *5-Bromo-2-aryl benzimidazole derivatives as non-cytotoxic potential dual inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase and urease enzymes. Bioorg. Chem.* 72 (2017) 21-31.
  57. T. Arshad, K.M. Khan, N. Rasool, U. Salar, S. Hussain, T. Tahir, M. Ashraf, A. Wadood, M. Riaz, S. Perveen, M. Taha, N.H. Ismail, *Syntheses, in vitro evaluation and molecular docking studies of 5-bromo-2-aryl benzimidazoles as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. Med. Chem. Res.* 25 (2016) 2058-2069.
  58. M. A. Laothi, S. Shams, K. M. Khan, *Thiazolidine esters: new potent urease inhibitors. J. Chem. Soc. Pak.* 36 (2014) 858-864.

59. W. Zaborska, B. Krajewska, M. Kot, W. Karcz, *Quinone-induced inhibition of urease: elucidation of its mechanisms by probing thiol groups of the enzyme*. *Bioorg Chem* 35 (2007) 233-242.
60. L.S. Redgrave, S.B. Sutton, M.A. Webber, L.J.V. Piddock, *Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success*. *Trends Microbiol.* 22 (2014) 438-445.
61. G.J. Noel, *A review of levofloxacin for the treatment of bacterial infections*. *Clin. Med. Ther.* 1 (2009).
62. A. Cheng, W.-H. Sheng, J.-M. Liou, H.-P. Wang, M.-S. Wu, J.-T. Lin, S.-C. Chang, *Comparative in vitro antimicrobial susceptibility and synergistic activity of antimicrobial combinations against Helicobacter pylori isolates in Taiwan*, *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 48 (2015) 72-79.
63. J. M. Breitenbach, R. P. Hausinger, *Proteus mirabilis urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids*. *Biochem. J.* 250 (1988) 917-920.
64. S. Benini, W.R. Rypniewski, K.S. Wilson, S. Mangani, S. Ciurli, *Molecular details of urease inhibition by boric acid: Insights into the catalytic mechanism*. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 3714-3715.
65. G.K. Azad, R.S. Tomar, *Ebselen, a promising antioxidant drug: Mechanisms of action and targets of biological pathways*. *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 4865-4879.
66. X. Ren, L. Zou, J. Lu, A. Holmgren, *Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic*. *Free Radic. Biol. Med.* 127 (2018) 238-247.
67. E. Weglarz-Tomczak, J.M. Tomczak, M. Talma, M. Burda-Grabowska, M. Giurg, S. Brul, *Identification of ebselen and its analogues as potent covalent inhibitors of papain-like protease from SARS-CoV-2*. *Sci. Rep.* 11 (2021) 3640.
68. M. Maślanka, A. Mucha, *Antibacterial activity of ebselen*. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023) 1610.
69. K. Macegoniuk, W. Tabor, L. Mazzei, M. Cianci, M. Giurg, K. Olech, M. Burda-Grabowska, R. Kaleta, A. Grabowiecka, A. Mucha, S. Ciurli, Ł. Berlicki, *Optimized ebselen-based inhibitors of bacterial ureases with nontypical mode of action*. *J. Med. Chem.* 9 (2023) 2054-2063.
70. L. Mazzei, M. Cianci, F. Musiania, S. Ciurli, *Inactivation of urease by 1,4-benzoquinone: chemistry at the protein surface*. *Dalton Trans.* 45 (2016) 5455-5459.



71. L. Mazzei, M. Cianci, F. Musiani, G. Lente, M. Palombo, S. Ciurli, *Inactivation of urease by catechol: kinetics and structure*. J. Inorg. Biochem. 166 (2017) 182-189.
72. Z.P. Xiao, T.W. Ma, W.C. Fu, X.C. Peng, A.H. Zhang, H.L. Zhu, *The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catechol derivatives as Helicobacter pylori urease inhibitors*. Eur. J. Med. Chem. 45 (2010) 5064-5070.
73. A. Pagoni, T. Daliani, K. Macegoniuk, S. Vassiliou, Ł. Berlicki, *Catechol-based inhibitors of bacterial urease*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 29 (2019) 1085-1089.
74. A. Pagoni, A. Grabowiecka, W. Tabor, A. Mucha, S. Vassiliou, Ł. Berlicki, *Covalent inhibition of bacterial urease by bifunctional catechol-based phosphonates and phosphinates*. J. Med. Chem. 64 (2021) 404-416.
75. M.M. Al-Rooqi, E.U. Mughal, Q.A. Raja, E.M. Hussein, N. Naeem, A. Sadiq, B.H. Asghar, Z. Moussa, S.A. Ahmed, *Flavonoids and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors: a review*. RSC Adv. 13 (2023) 3210-3233.
76. J. Kanner, T. Lapidot, *The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants*. Free Radic. Biol. Med. 31 (2001) 1388-1395.
77. Z.P. Xiao, X.D. Wang, Z.Y. Peng, S. Huang, P. Yang, Q.S. Li, L.H. Zhou, X.J. Hu, L.J. Wu, Y. Zhou, H.L. Zhu, *Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as Helicobacter pylori urease inhibitors*. J. Agric. Food. Chem. 60 (2012) 10572-10577.
78. B. Krajewska, M. Leszko, W. Zaborska, *Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 48 (1990) 337-350.
79. B. Krajewska, W. Zaborska, M. Chudy, *Multi-step analysis of Hg<sup>2+</sup> ion inhibition of jack bean urease*. J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 1160-1168.
80. B. Krajewska, *Mono- (Ag, Hg) and di- (Cu, Hg) valent metal ions effects on the activity of jack bean urease. Probing the modes of metal binding to the enzyme*. J. Enzyme. Inhib. Med. Chem. 23 (2008) 535-542.
81. L. Zhang, S. B. Mulrooney, A. F. K. Leung, Y. Zeng, B. B. C. Ko, R. P. Hausinger, H. Sun, *Inhibition of urease by bismuth(III): Implications for the mechanism of action of bismuth drugs*. BioMetals 19 (2006) 503-511.
82. E.A. Boyd, M. Corless, K. James, A.C. Regan, *A versatile route to substituted phosphinic acids*. Tetrahedron Lett. 31 (1990) 2933-2936.

83. D. Albouy, A. Brun, A. Munoz, G. Etemad-Moghadam, *New ( $\alpha$ -hydroxyalkyl)phosphorus amphiphiles: synthesis and dissociation constants*. J. Org. Chem. 63 (1998) 7223-7230.
84. W.B. Jin, C. Xu, Q. Cheng, X.L. Qi, W. Gao, Z. Zheng, E.W.C. Chan, Y.-C. Leung, T.H. Chan, K.-Y. Wong, S. Chen, K.-F. Chan, *Investigation of synergistic antimicrobial effects of the drug combinations of meropenem and 1,2-benzisoseleazol-3(2H)-one derivatives on carbapenem-resistant Enterobacteriaceae producing NDM-1*. Eur. J. Med. Chem. 155 (2018) 285-302.
85. H. Wójtowicz, M. Chojnacka, J. Młochowski, J. Palus, L. Syper, D. Hudecova, M. Uher, E. Piasecki, M. Rybka, *Functionalized alkyl and aryl diselenides as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties*. Il Farmaco 58 (2003) 1235-1242.
86. N. Iranpoor, H. Firouzabadi, K. R. Moghadam, S. Motavalli, *First reusable ligand-free palladium catalyzed C-P bond formation of aryl halides with trialkylphosphites in neat water*. RSC Adv. 4 (2014) 55732– 55737.
87. M. Maślanka, W. Tabor, P. Krzyżek, A. Grabowiecka, Ł. Berlicki, A. Mucha, *Inhibitory activity of catecholic phosphonic and phosphinic acids against Helicobacter pylori ureolysis*. Eur. J. Med. Chem. 257 (2023) 115528.
88. W. Tabor, *Inhibicja aktywności ureaz o zróżnicowanym pochodzeniu mikrobiologicznym*. Rozprawa doktorska, 2023.
89. P. Krzyżek, P. Migdał, E. Paluch, M. Karwańska, A. Wieliczko, G. Gościński, *Myricetin as an antivirulence compound interfering with a morphological transformation into coccoid forms and potentiating activity of antibiotics against Helicobacter pylori*. Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 2695.
90. L. Macomber, M.S. Minkara, R.P. Hausinger, K.M. Merz Jr, *Reduction of urease activity by interaction with the flap covering the active site*. J. Chem. Inf. Model. 55 (2015) 354-361.
91. M. Chojnacka, *Poszukiwanie nowych, chiralnych selenoorganicznych katalizatorów i reagentów*. Rozprawa doktorska, 2007.

## 6. DOROBEK NAUKOWY

### Lista publikacji związanych z tematyką doktoratu:

1. M. Maślanka, W. Tabor, P. Krzyżek, A. Grabowiecka, Ł. Berlicki, A. Mucha, *Inhibitory activity of catecholic phosphonic and phosphinic acids against Helicobacter pylori ureolysis*. Eur. J. Med. Chem. 257 (2023) 115528.
2. M. Maślanka, A. Mucha, *Antibacterial Activity of Ebselen*. Int. J. Mol. Sci. 24 (2023) 1610.

### Pozostałe publikacje:

1. M. Maślanka, A. Mucha, *Recent developments in peptidyl diaryl phosphonates as inhibitors and activity-based probes for serine proteases*. Pharmaceuticals 12 (2019) 86.
2. M. Talma, M. Maślanka, A. Mucha, *Recent developments in the synthesis and applications of phosphinic peptide analogs*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 29 (2019) 1031–1042.
3. M. Maślanka, *Substytucja octanów allilowych nukleofilami fosforowymi oraz zawierającymi atom fosforu*. Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego, Nauki Ścisłe, Wydawnictwo Nowa Strona, Kraków, 14 (2017) 173-186.

### Prezentacje konferencyjne w tematyce doktoratu:

1. M. Maślanka, W. Tabor, Ł. Berlicki, A. Grabowiecka, A. Mucha, *Synthesis of phosphonic acid-functionalized benzoselenazolones and catechols, and their antiureolytic activity* (współautor), 22nd European Symposium on Organic Chemistry, Ghent, Belgia, 09-13.07.2023.
2. A. Grabowiecka, M. Maślanka, W. Tabor, P. Krzyżek, Ł. Berlicki, A. Mucha, *Catecholic phosphonic and phosphinic acid inhibitors*

- for the control of ureolytic microbial pathogens* (współautor), 23rd Tetrahedron Symposium, Goteborg, Szwecja, 27-30.06.2023.
3. W. Tabor, M. Maślanka, A. Grabowiecka, U. Nawrot, P. Krzyżek, A. Mucha, Ł. Berlicki, *Ebselen-based compounds act as covalent inhibitors of microbial ureases in nanomolar concentrations* (współautor), 23rd Tetrahedron Symposium, Goteborg, Szwecja, 27-30.06.2023
  4. A. Mucha, A. Grabowiecka, K. Macegoniuk, M. Maślanka, W. Tabor, M. Giurg, L. Mazzei, S. Ciurli, Ł. Berlicki, *Urease inhibition by cysteine modification* (współautor), 28th American Peptide Symposium, Scottsdale, USA, 24-29.06.2013.
  5. M. Maślanka, W. Tabor, A. Grabowiecka, A. Mucha, *Katecholowe fosfoniany i fosfiniany – synteza i właściwości antyureolityczne wobec Helicobacter pylori* (komunikat ustny), „Na pograniczu chemii i biologii” - XIX Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów, Trzebieszowice, 04-07.06.2023.
  6. M. Maślanka, W. Tabor, A. Grabowiecka, A. Mucha, *Fosforoorganiczne pochodne benzizoselenazol-3(2H)-onu i katecholu jako inhibitory ureazy o hybrydowym mechanizmie działania* (poster), 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, 11-16.09.2022.
  7. M. Maślanka, W. Tabor, A. Grabowiecka, A. Mucha, *Nowe fosforoorganiczne inhibitory ureazy – synteza, stabilność i aktywność biologiczna* (poster), XV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 20-22.06.2022.
  8. M. Maślanka, W. Tabor, A. Grabowiecka, A. Mucha, *Synteza i aktywność biologiczna nowych pochodnych benzizoselenazol-3(2H)-onu wobec ureazy bakteryjnej* (komunikat ustny), „Na pograniczu chemii i biologii” - XVIII Ogólnopolskie Seminarium dla Doktorantów i Studentów, Smardzewice, 12-15.06.2022.
  9. M. Maślanka, A. Mucha, *Inhibitory ureazy o hybrydowym mechanizmie działania* (komunikat ustny), XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 20-22.09.2021.
  10. M. Maślanka, A. Mucha, *Synteza oraz charakterystyka inhibitorów ureazy o dualnym mechanizmie oddziaływania z enzymem* (poster),

XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 20-22.09.2021.

11. M. Maślanka, A. Mucha, *Phosphorus derivatives of catechol and ebselen as an innovative approach to urease inhibitors* (poster), 23rd International Conference on Phosphorus Chemistry, Częstochowa, 05-09.07.2021.
12. M. Maślanka, A. Mucha, *Synthesis of multifunctional organophosphorus compounds as a route to new urease inhibitors with dual mechanism of interaction with the enzyme* (poster), ChemBiotIC, Wrocław, 24-25.06.2021.

#### **Pozostałe wystąpienia konferencyjne:**

1. M. Maślanka, A. Mucha, *Otrzymywanie fosfinodipeptydowych pochodnych kumaryny jako sond molekularnych aminopeptydaz* (poster), XI Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Organicznej, Warszawa, 08-11.04.2018.
2. M. Maślanka, A. Mucha, *Addition of the P-H bond to the Morita-Baylis-Hillman acetates as a route to non-covalent activity-based probes of metalloaminopeptidases* (poster), 15th European Workshop in Phosphorus Chemistry, Uppsala, Szwecja, 14-16.03.2018.
3. M. Maślanka, A. Mucha, *Synteza, charakterystyka oraz zastosowanie  $\alpha$ -podstawionych akrylanów zawierających grupę fosfonową* (poster), VI Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych - Puzzel, Wrocław, 01-02.04.2017.
4. M. Maślanka, *Substytucja octanów allilowych nukleofilami fosforowymi oraz zawierającymi atom fosforu* (komunikat ustny), Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Wiedza Kluczem do Sukcesu”, Łódź, 21.01.2017.



## 7. STRESZCZENIE

Ureaza jest enzymem występującym w wielu organizmach i odgrywającym kluczową rolę w globalnym obiegu azotu. Wiele chorobotwórczych bakterii, takich jak *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis* oraz *Staphylococcus aureus*, wykorzystuje to białko jako czynnik wirulencji. Inhibitory ureazy osłabiające zjadliwość mikroorganizmów, zastosowane w połączeniu z antybiotykami, mogą przyczynić się do ograniczenia oporności na dostępne środki. Celem pracy doktorskiej było opracowanie nowych klas inhibitorów ureaz bakteryjnych, zawierających w swojej strukturze ugrupowania zdolne do tworzenia zarówno wiązań kowalencyjnych, jak i niekowalencyjnych oddziaływań w centrum katalitycznym. W założeniu takie związki działałyby efektywniej i z większą specyficnością.

W części literaturowej rozprawy podsumowano podstawowe informacje o przedmiocie badań, koncentrując się typach inhibitorów ureazy, mechanizmach ich działania oraz metodach syntezy. W ramach badań własnych zaplanowano oraz zsyntetyzowano kilka typów struktur (55 indywidualnych związków chemicznych) o hybrydowym sposobie działania, łączących elementy funkcjonalne o różnych mechanizmach inhibitorowej aktywności antyureolitycznej. Były to grupy fosfonowa lub fosfinowa dedykowane koordynowaniu jonów niklu, a także fragmenty katecholu lub 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu, które są reaktywne względem tioli. Wymagało to zaplanowania indywidualnych ścieżek syntetycznych wiodących do złożonych docelowych cząsteczek, dodatkowo wykazujących komplementarność do centrum aktywnego białka. Otrzymane związki fosforoorganiczne i/lub selenoorganiczne zostały poddane testom aktywności

biologicznej wobec oczyszczonej ureazy z bakterii *Sporosarcina pasteurii* i ureolizy wykazywanej przez komórki *H. pylori*. Zidentyfikowano struktury będące niezwykle efektywnymi inhibitorami enzymu modelowego: pochodne katecholu wykazały co prawda stałe inhibicji w zakresie mikromolarnym, ale pochodne 1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu – w zakresie nanomolarym. Co więcej, w każdej z grup ujawniono związki wyjątkowo aktywne antyureolityczne w badaniach *in vitro* względem bakterii patogennej. Dla najskuteczniejszych inhibitorów zostały przeprowadzone testy cytotoksyczności wobec komórek ssaczy dowodzące znikomego bądź niskiego wpływu na ich żywotność. W ramach pracy doktorskiej uzyskano szereg pochodnych o pożądanym właściwościach w kontekście ewentualnego zastosowania w kombinowanych terapiach przeciwdrobnoustrojowych.



## 8. ABSTRACT

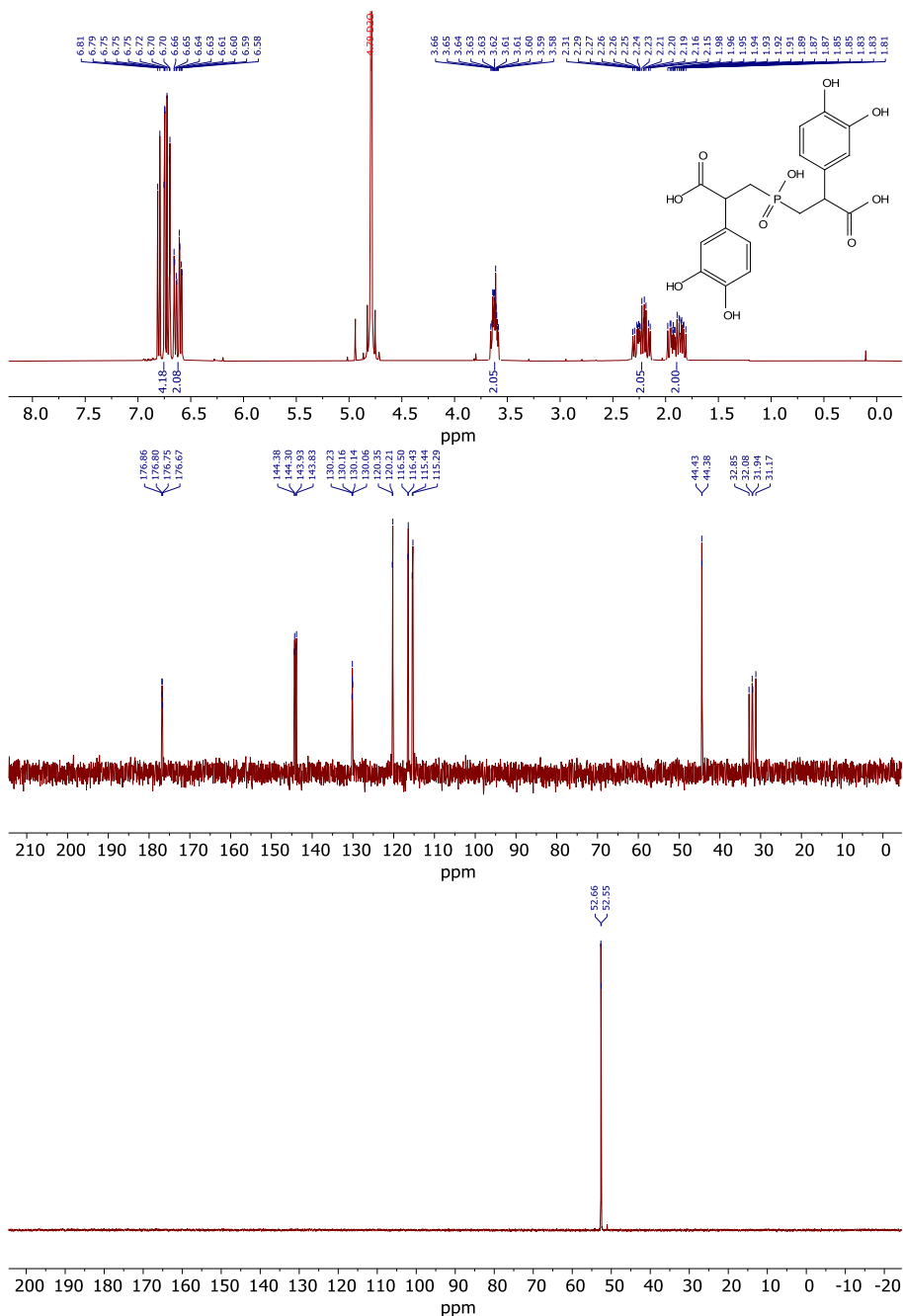
Urease is an enzyme found in many organisms and plays a key role in the global nitrogen cycle. Nevertheless, its uncontrolled activity is an undesirable phenomenon from the point of view of agriculture or health care. Many pathogenic bacteria, such as *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus*, use this protein as a virulence factor. Urease inhibitors weakening the virulence of microorganisms, used in combination with antibiotics, may help reduce resistance to available drugs. The aim of the doctoral thesis was to develop new classes of bacterial urease inhibitors containing groups capable of forming both covalent bonds and non-covalent interactions in the catalytic center. It is assumed that such compounds will work more effectively and with greater specificity.

The literature part of the dissertation summarizes basic information about the subject of research, focusing on the types of urease inhibitors, their mechanisms of action and synthesis methods. As part of my own research, several types of structures (55 individual chemical compounds) with a hybrid mode of action, combining functional elements with different mechanisms of inhibitory antiureolytic activity, were planned and synthesized. These were phosphonic or phosphine groups dedicated to coordinating nickel ions, as well as fragments of catechol or 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-one, which are reactive towards thiols. This required planning individual synthetic paths leading to complex target molecules, additionally showing complementarity to the active center of the protein. The obtained organophosphate and/or organoselenium compounds were a subject to biological activity tests against purified urease from the bacteria *Sporosarcina pasteurii* and ureolysis demonstrated by *H. pylori*

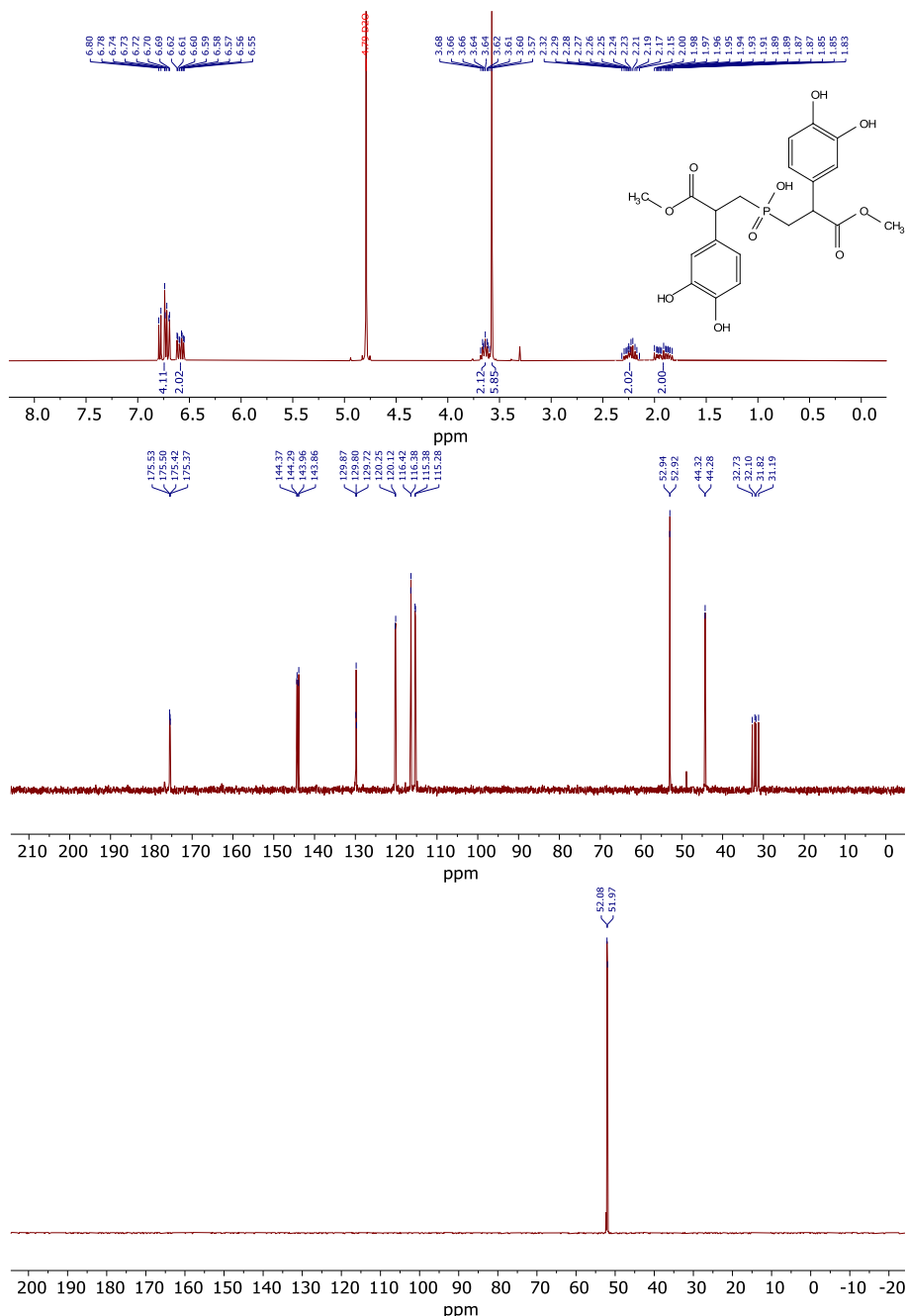
cells. Extremely effective inhibitors of the model enzyme were identified: catechol derivatives showed inhibition constants in the micromolar range, but 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-one derivatives showed inhibition constants in the nanomolar range. Moreover, in each group, exceptionally active antiureolytic compounds were found in *in vitro* tests against pathogenic bacteria. Cytotoxicity tests against mammalian cells were performed for the most effective inhibitors, showing a negligible or low impact on their viability. As a part of the doctoral thesis, a number of derivatives with desirable properties were obtained in the context of possible use in combined antimicrobial therapies.

## **9. MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE**

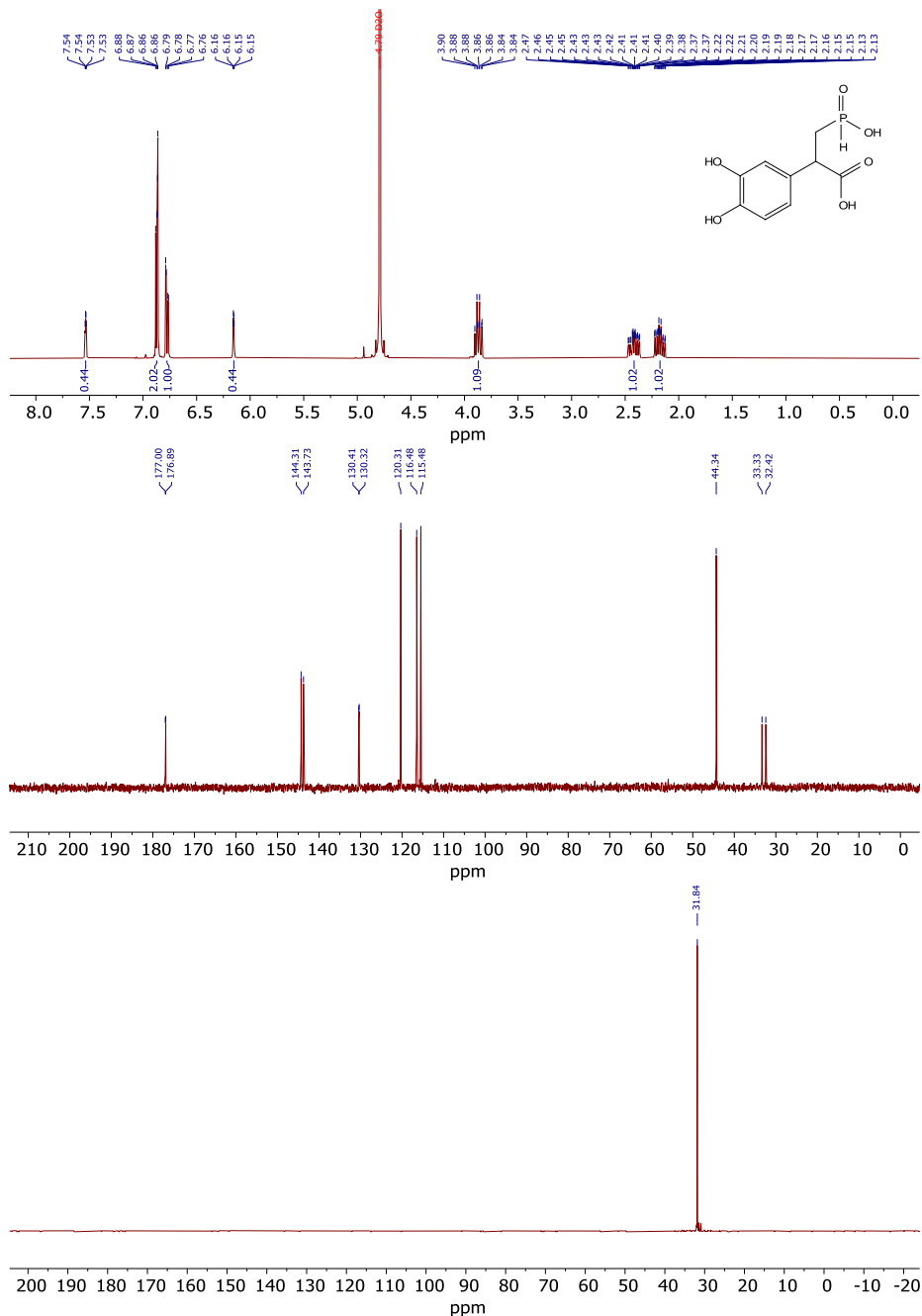
Widma NMR zsyntetyzowanych produktów końcowych



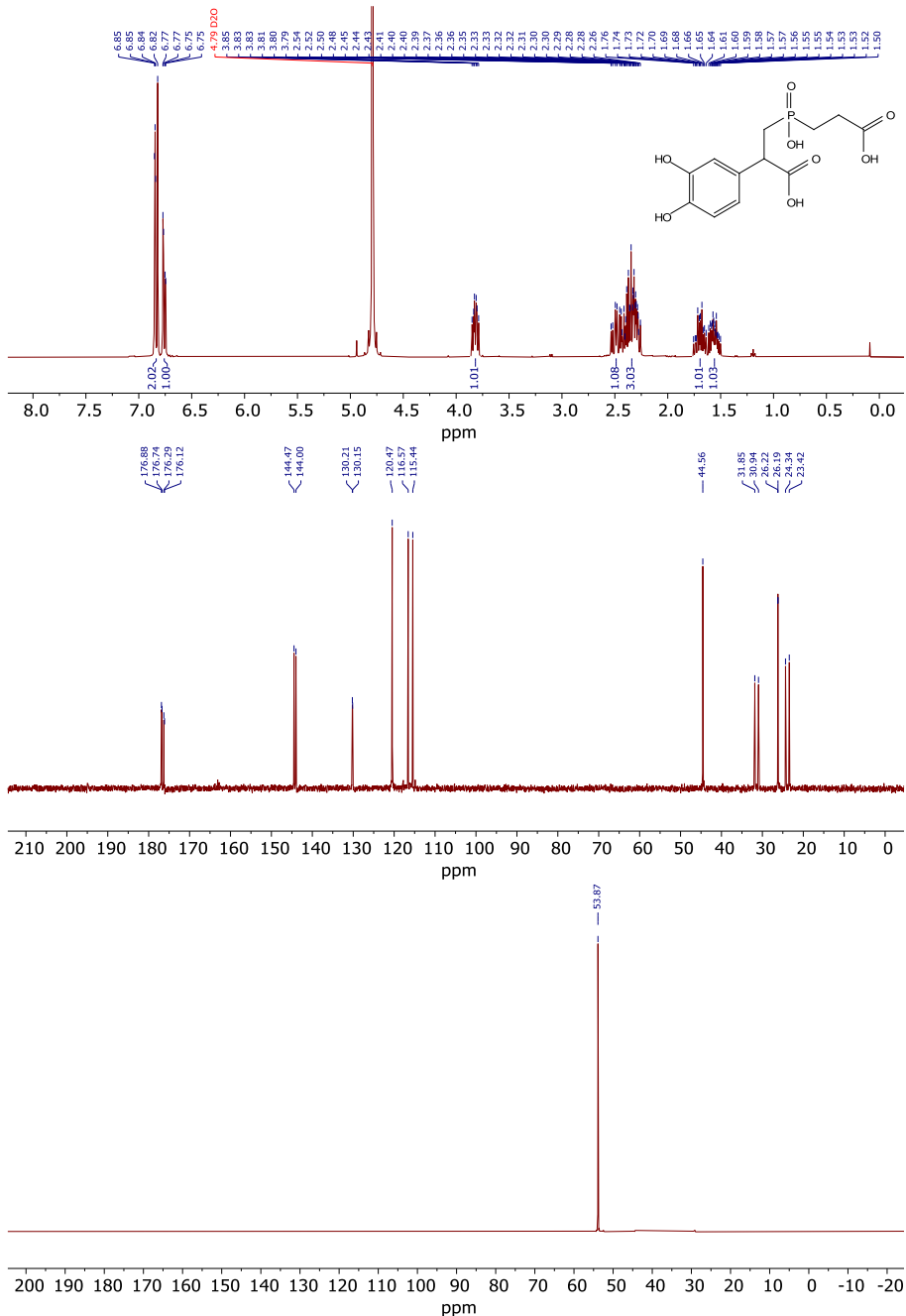
Rysunek 19. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR związku P1.7 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .



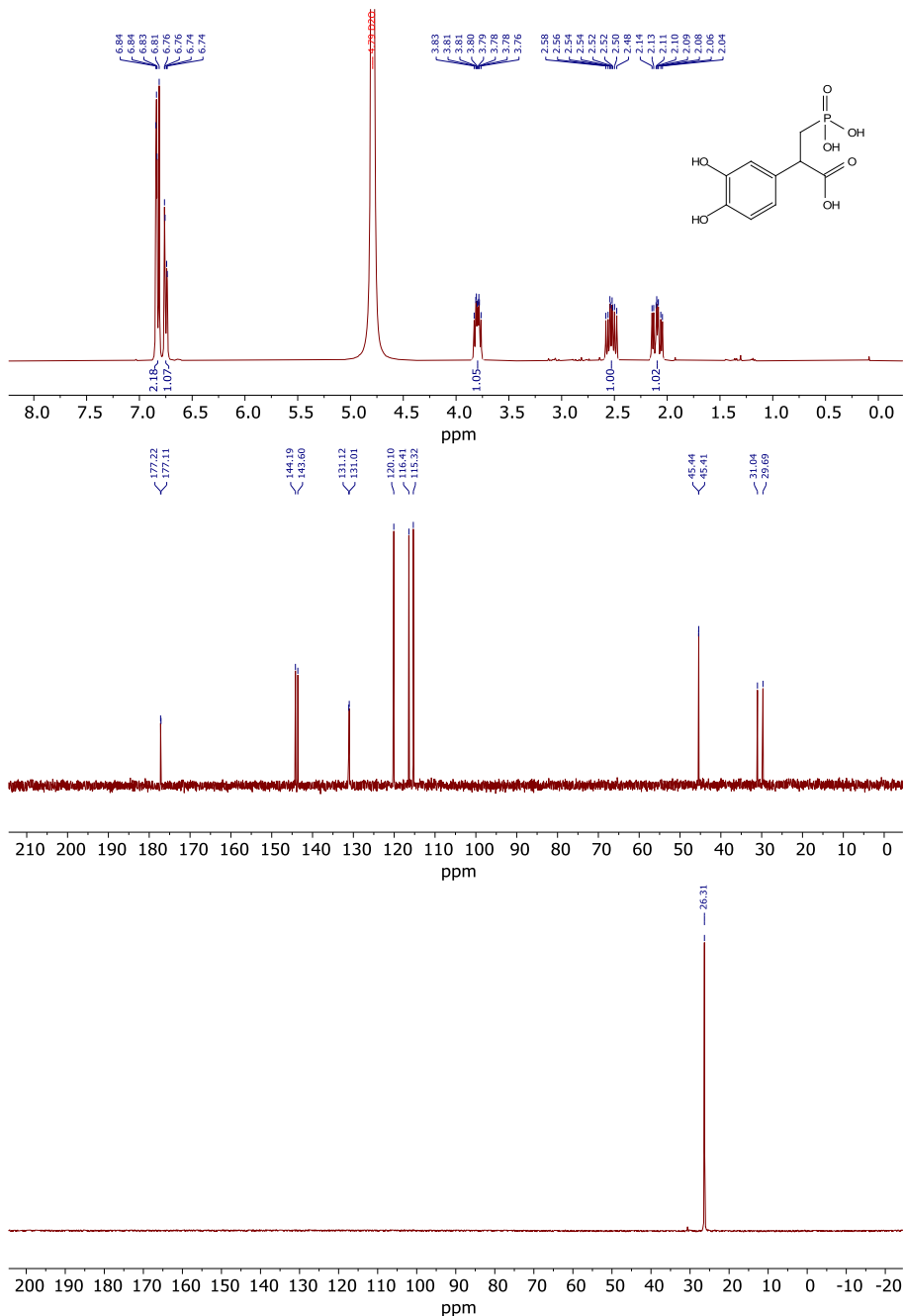
Rysunek 20. Widma <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C i <sup>31</sup>P NMR związku P1.8 wykonane w D<sub>2</sub>O.



Rysunek 21. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR związku P1.9 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .

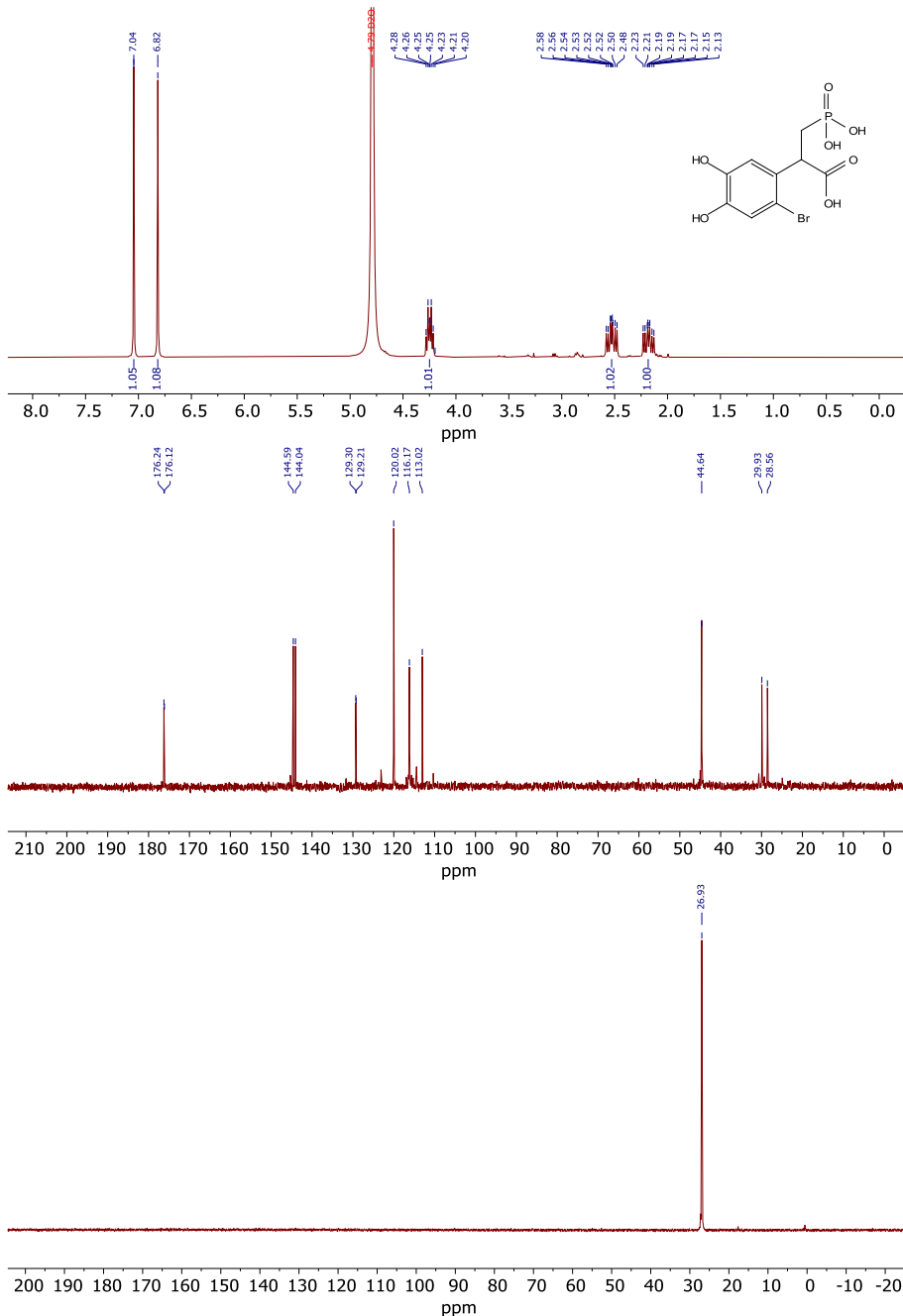


Rysunek 22. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR związku P1.10 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .

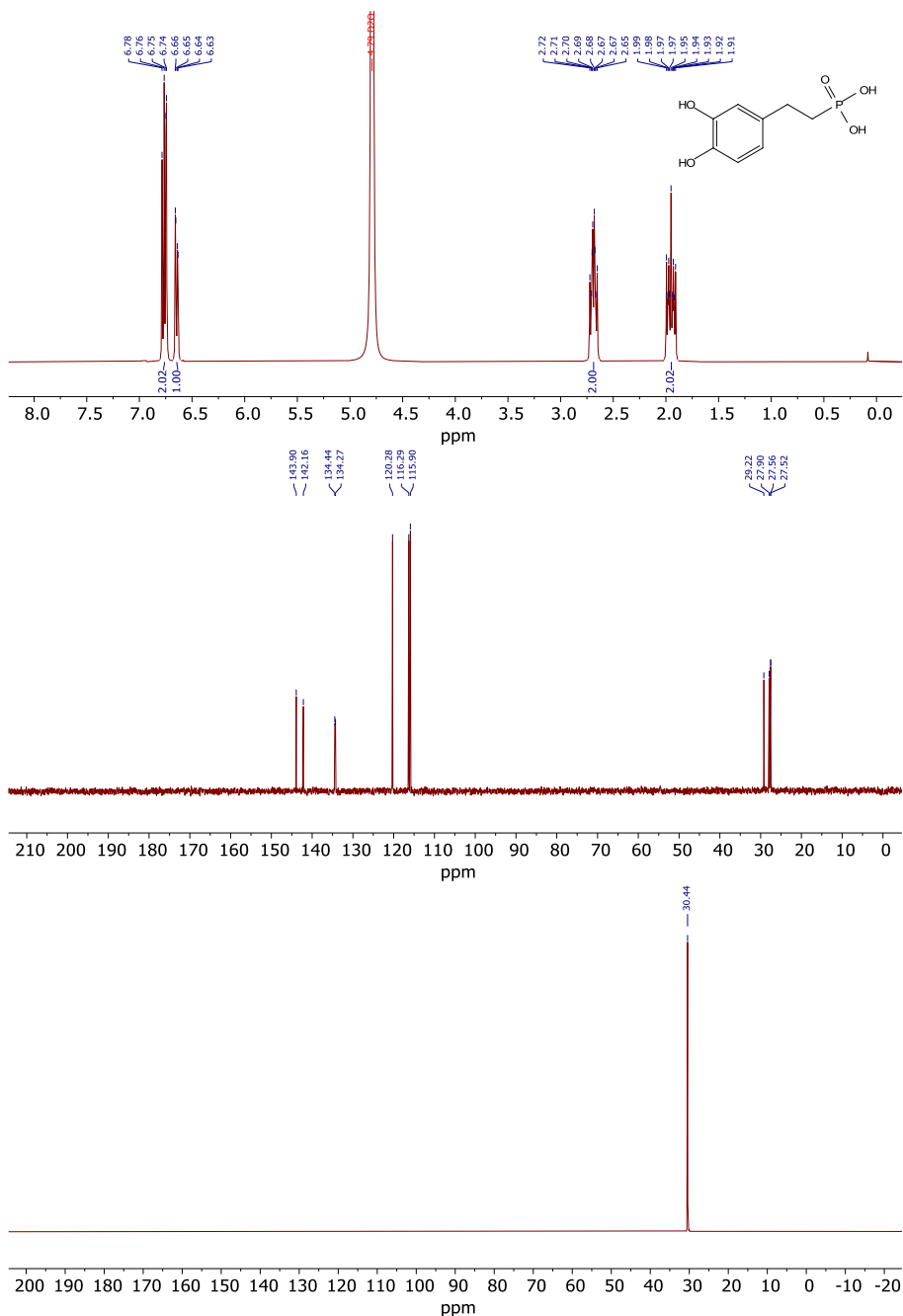


Rysunek 23. Widma <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C i <sup>31</sup>P NMR związku P1.11 wykonane w D<sub>2</sub>O.

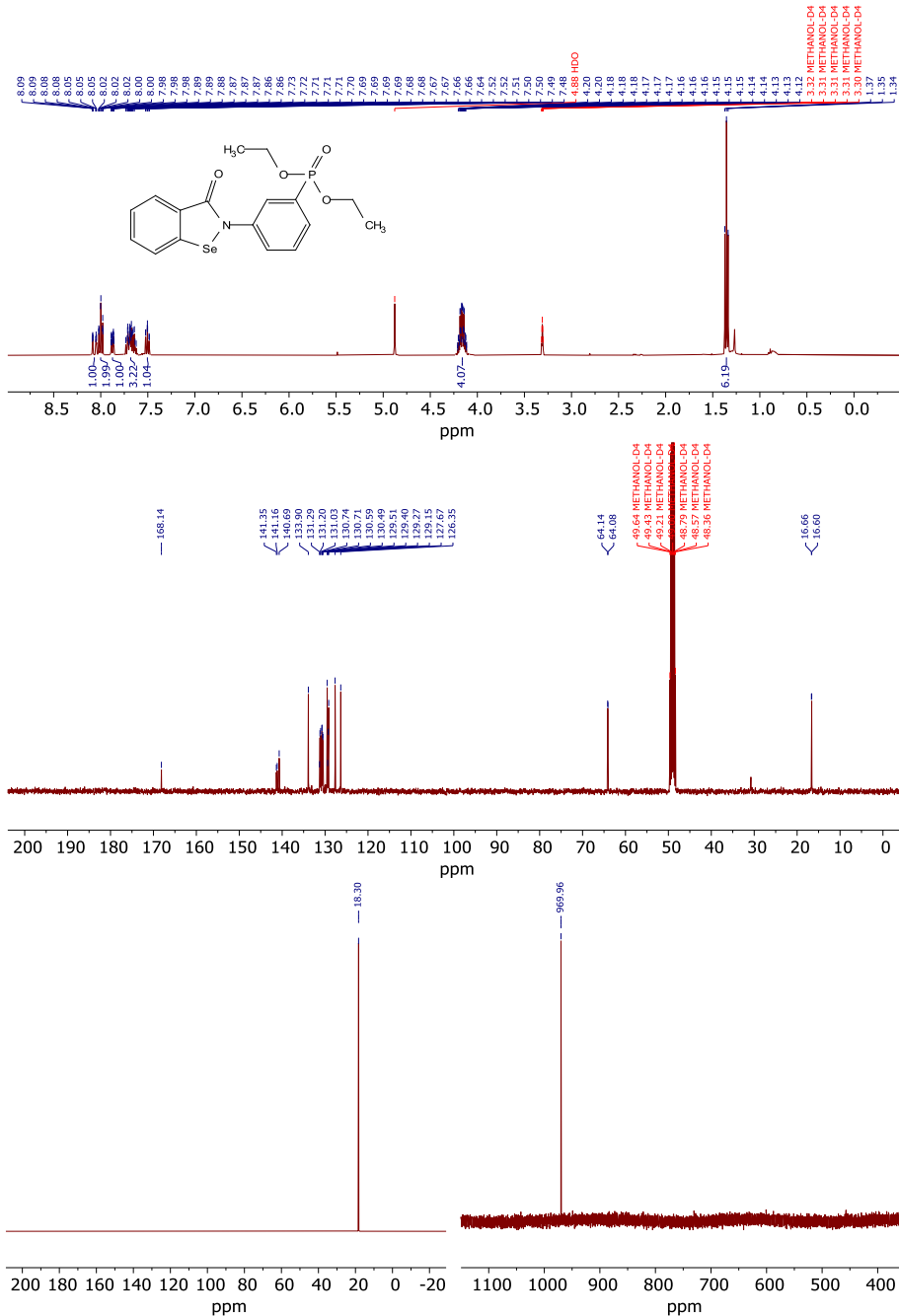




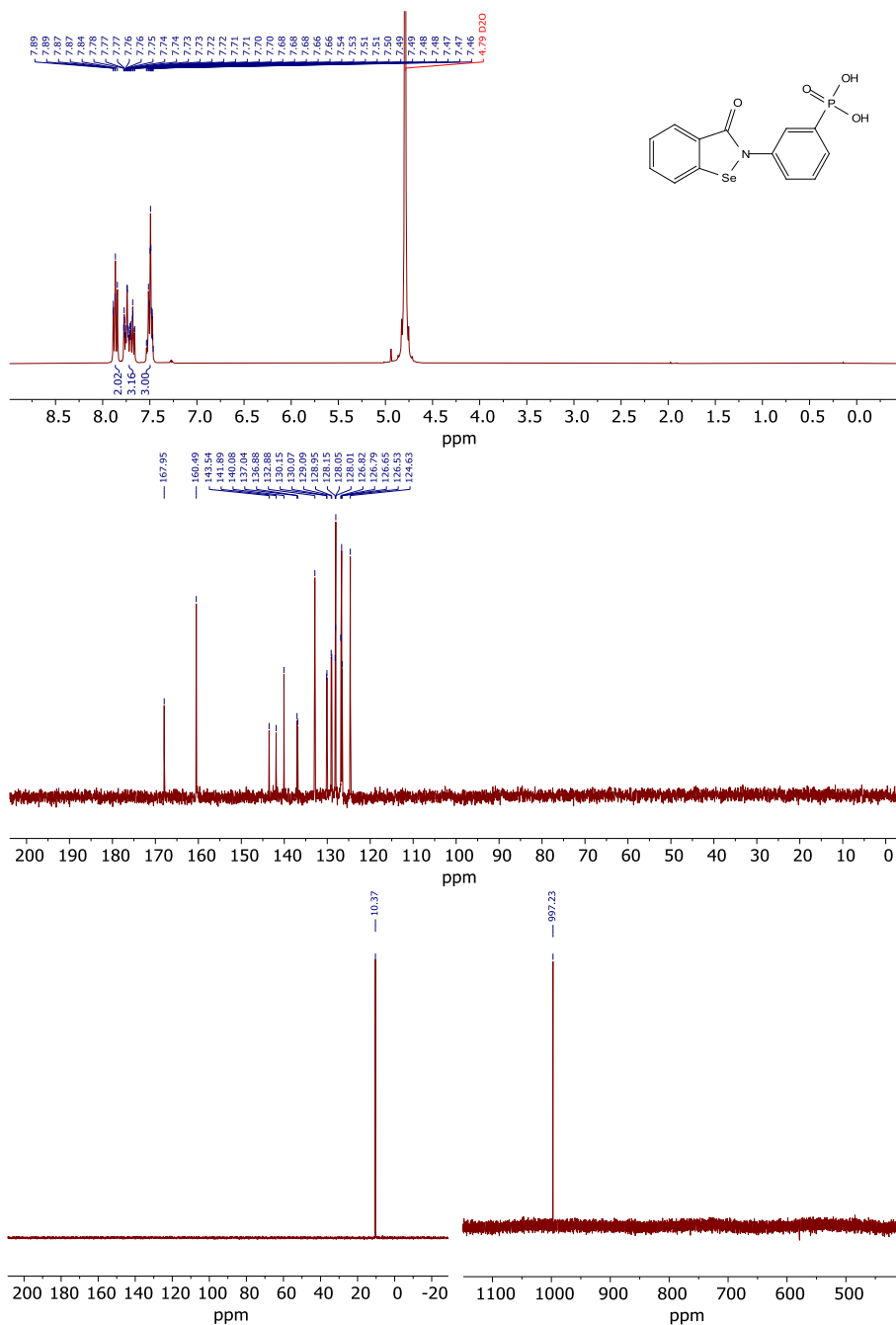
Rysunek 24. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR związku P1.12 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .



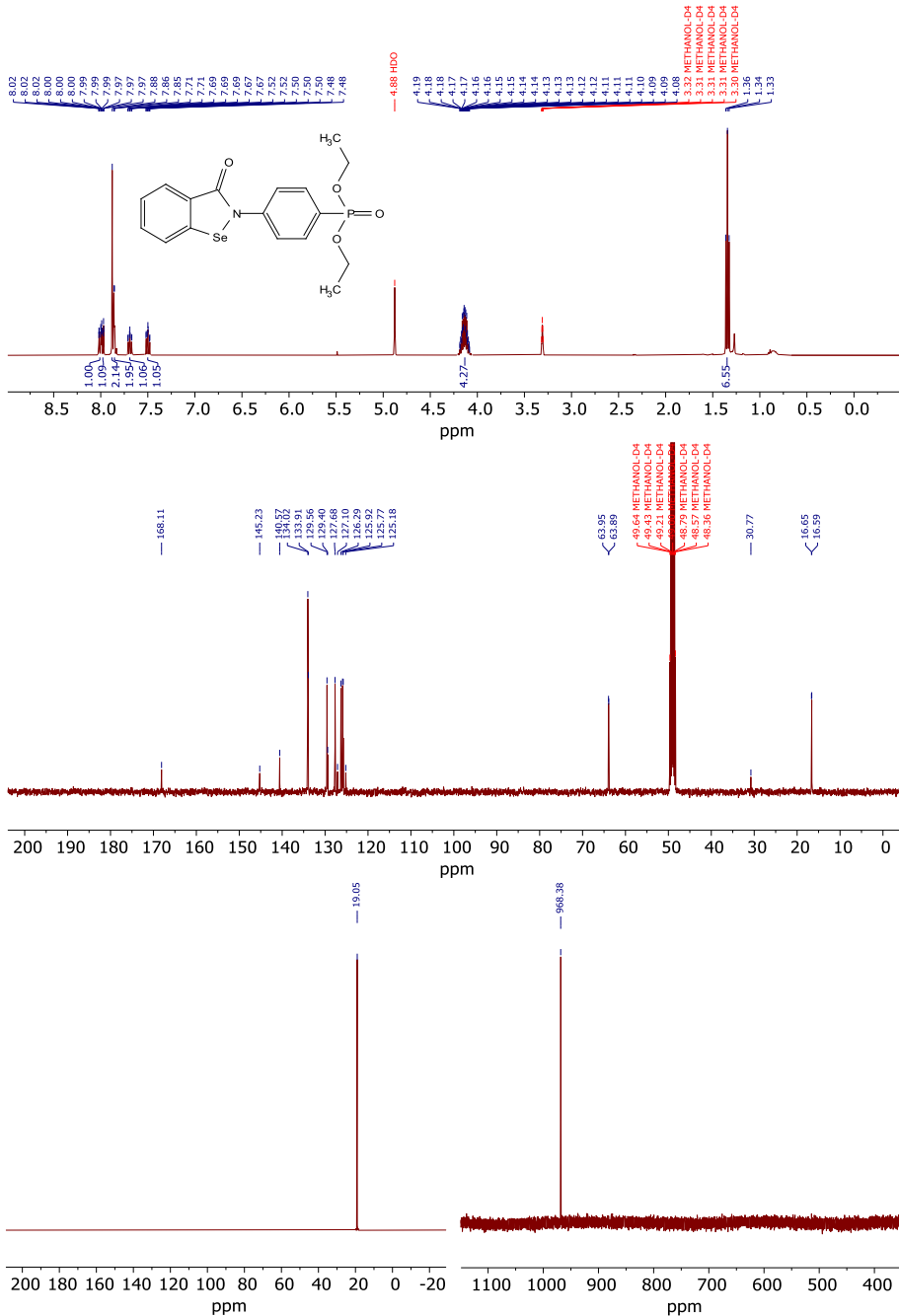
Rysunek 25. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR związku P1.16 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .



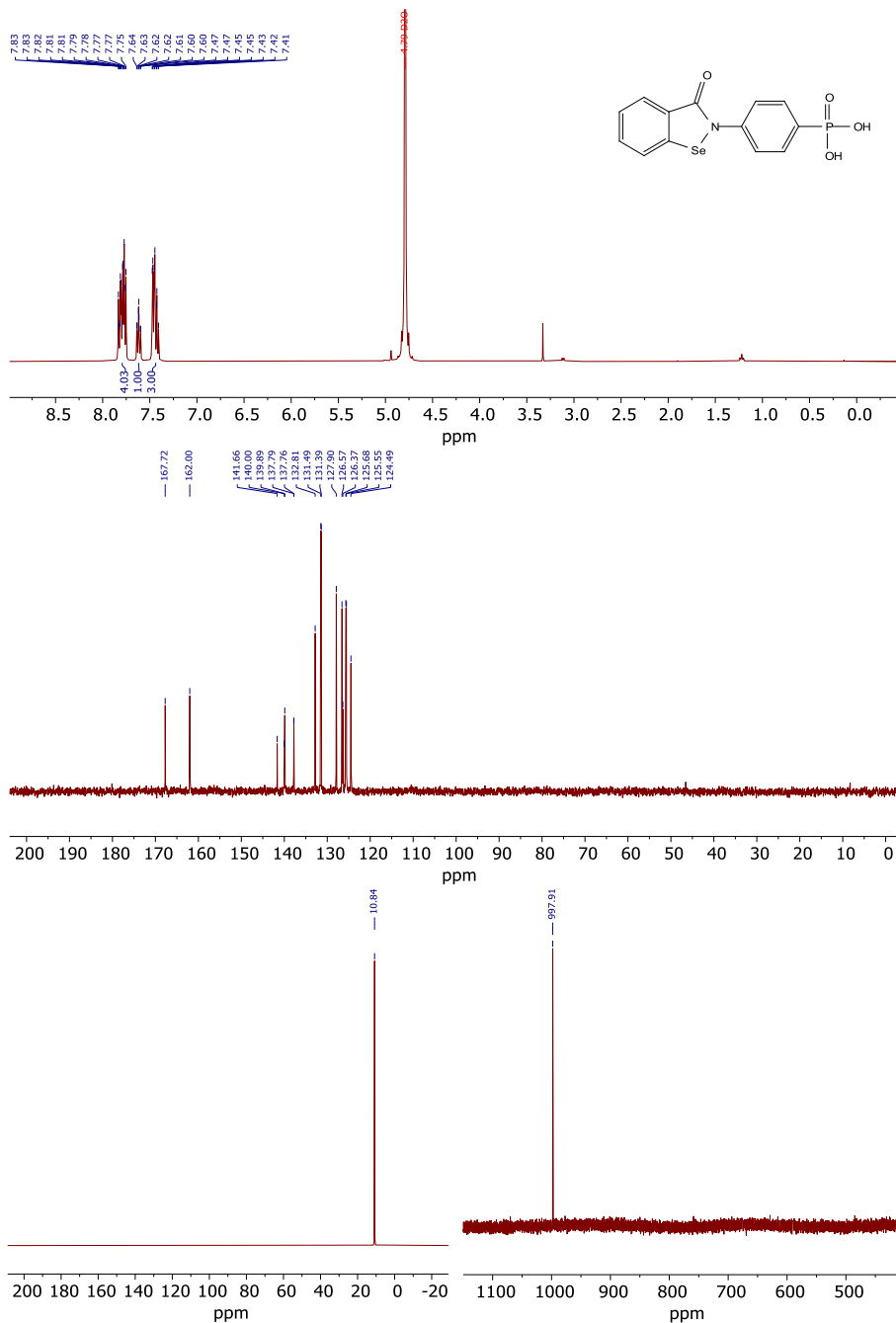
Rysunek 26. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.1.2 wykonane w  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



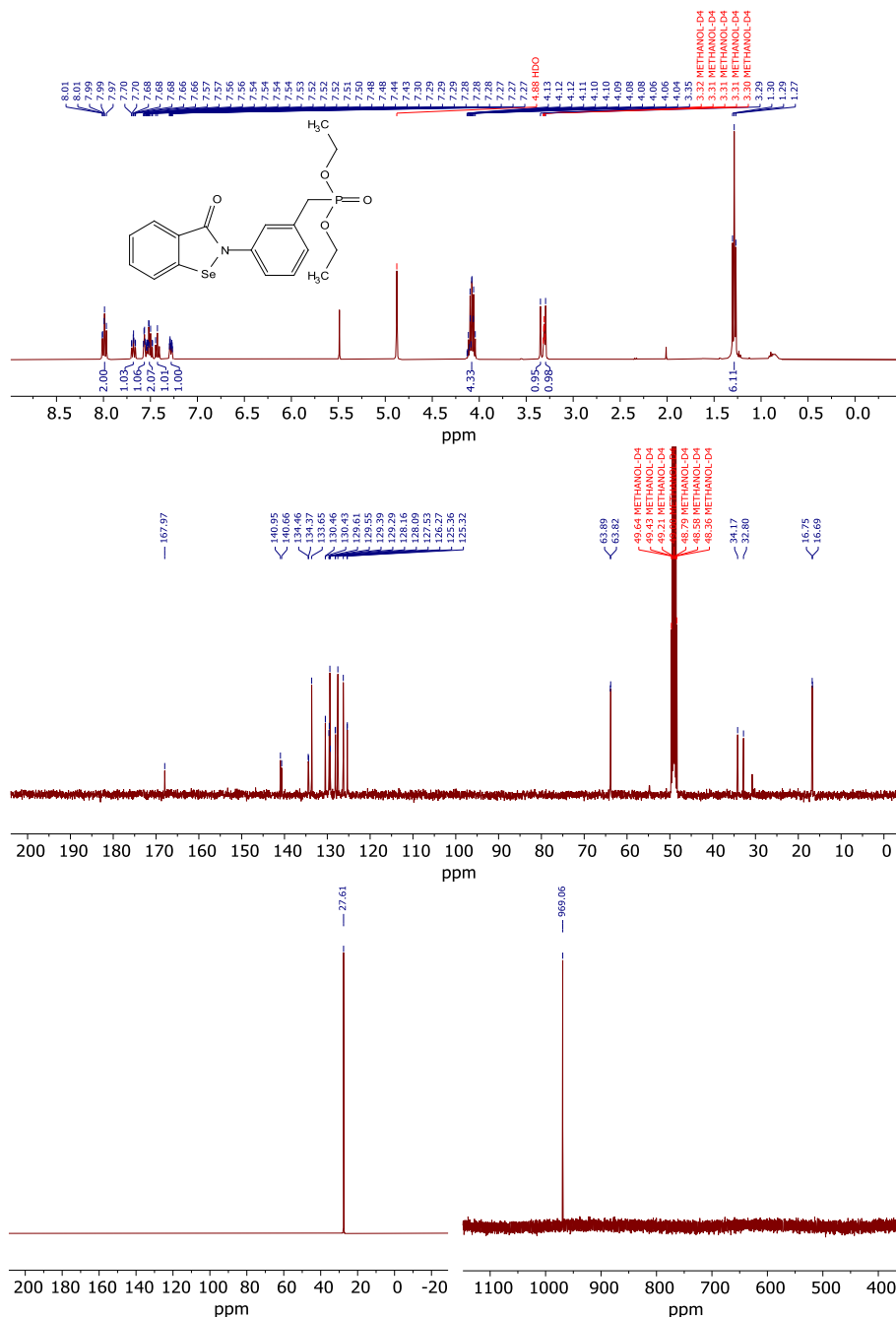
Rysunek 27. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.1.3 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .



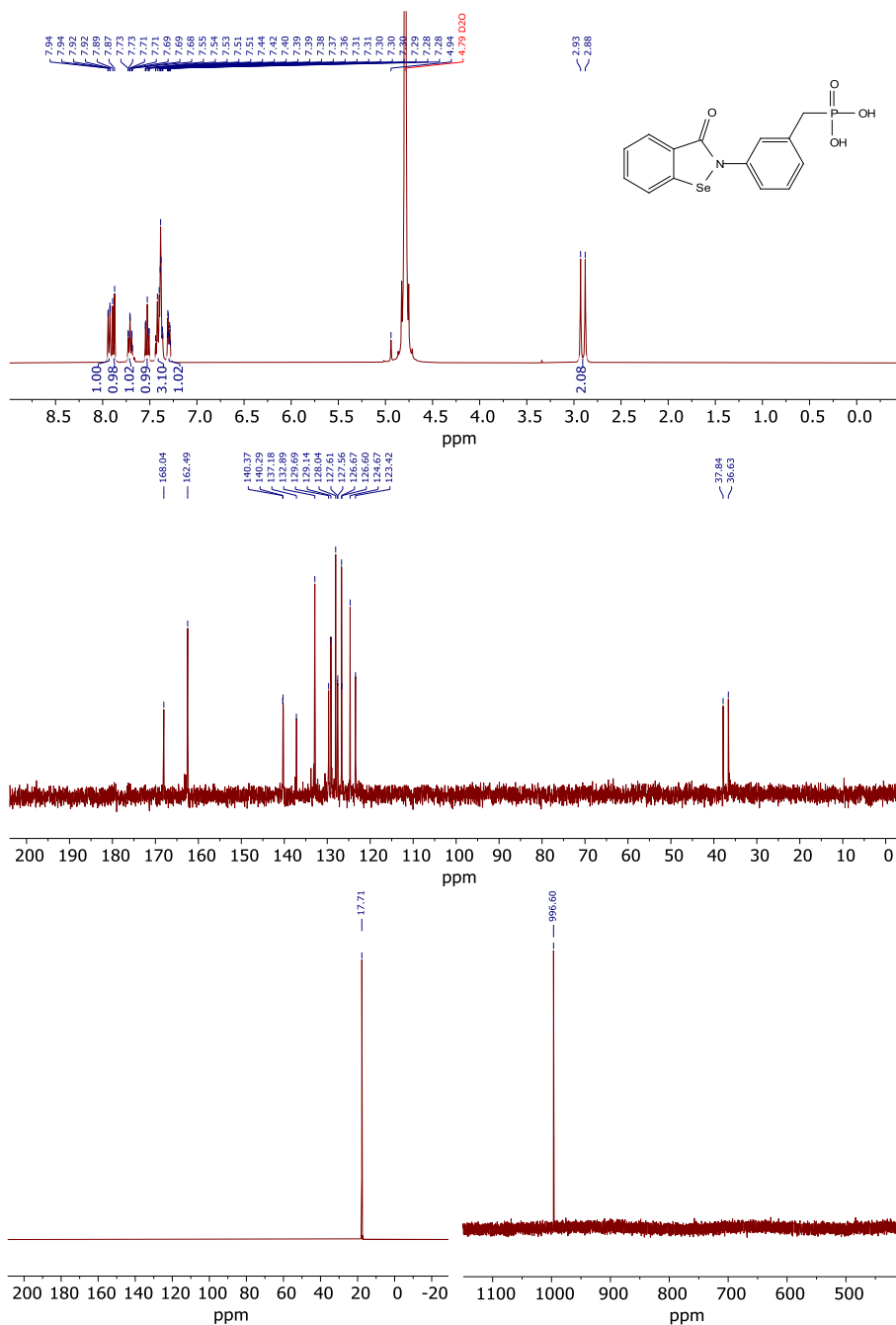
Rysunek 28. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.2.2 wykonane w  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



Rysunek 29. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.2.3 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .

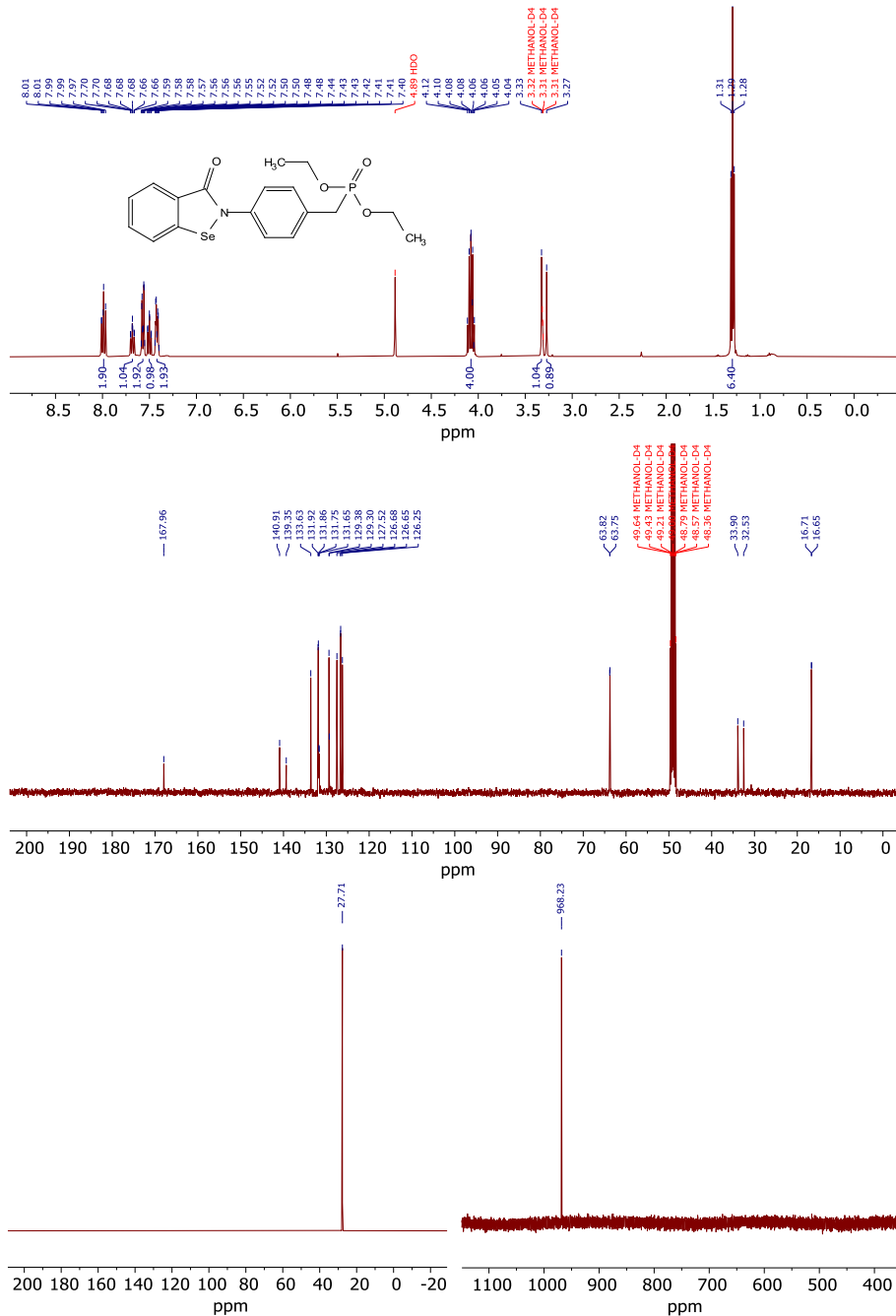


Rysunek 30. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.3.3 wykonane w  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

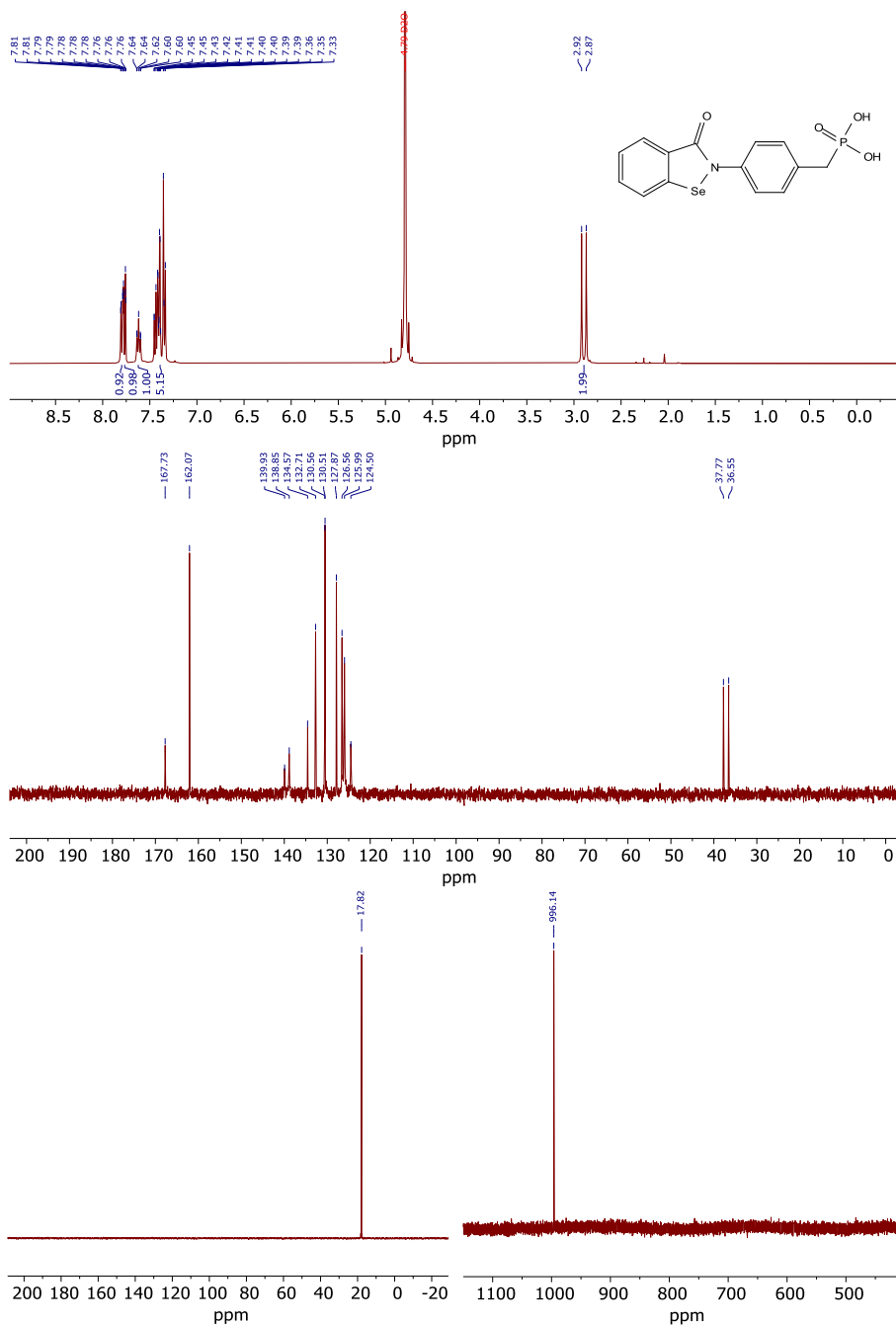


Rysunek 31. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.3.4 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .

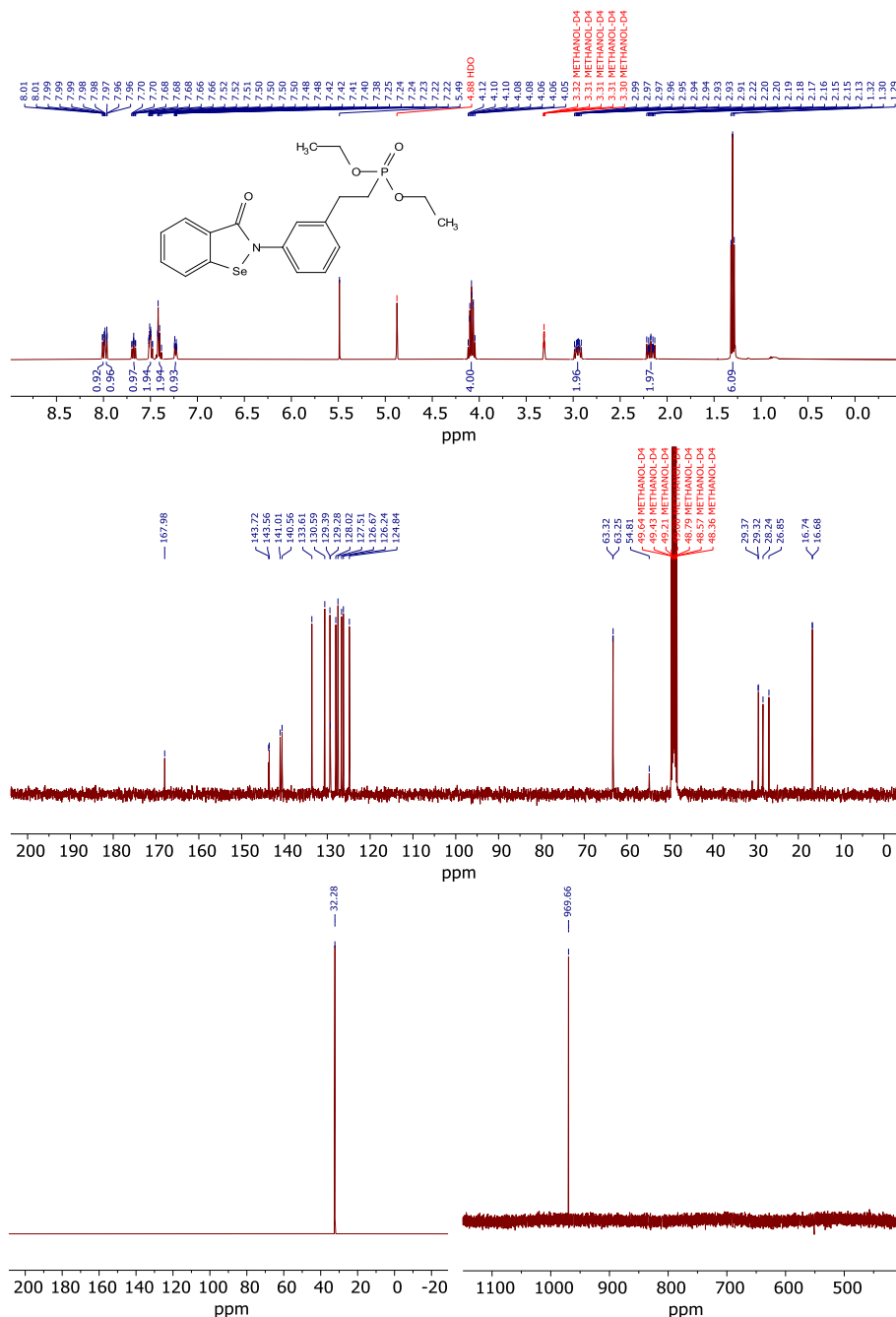




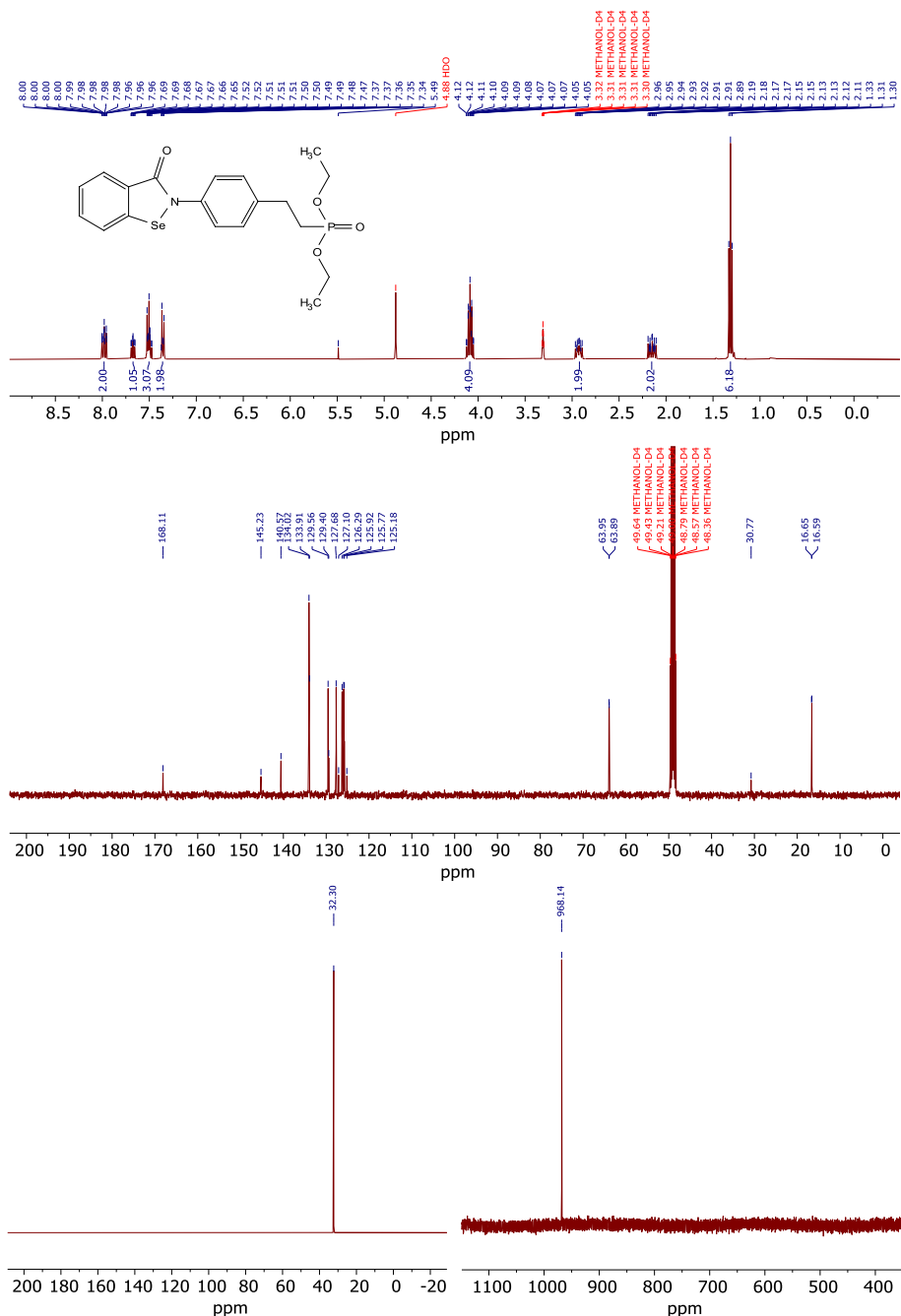
Rysunek 32. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.4.3 wykonane w  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



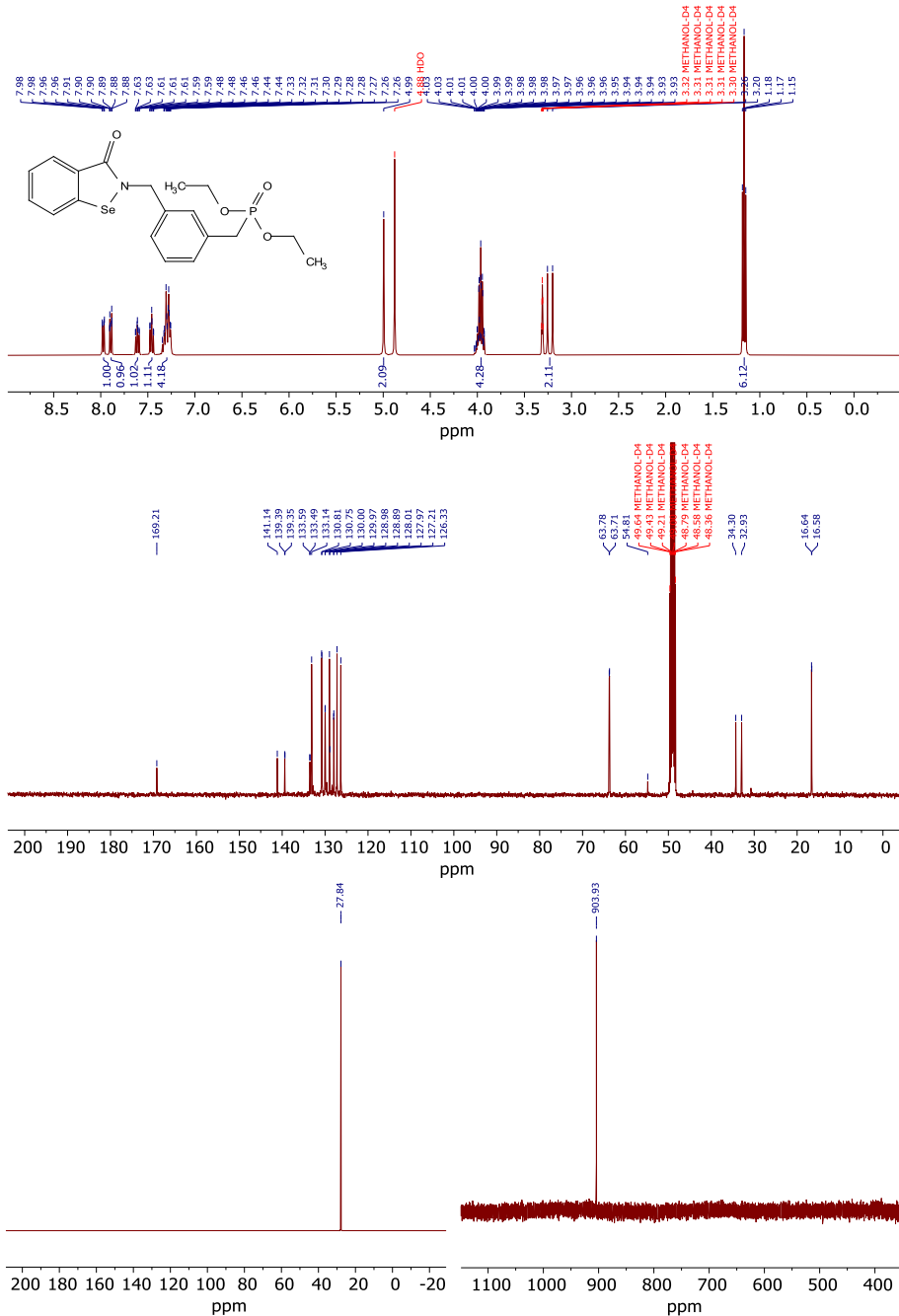
Rysunek 33. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.4.4 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .



Rysunek 34. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.5.3 wykonane w  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



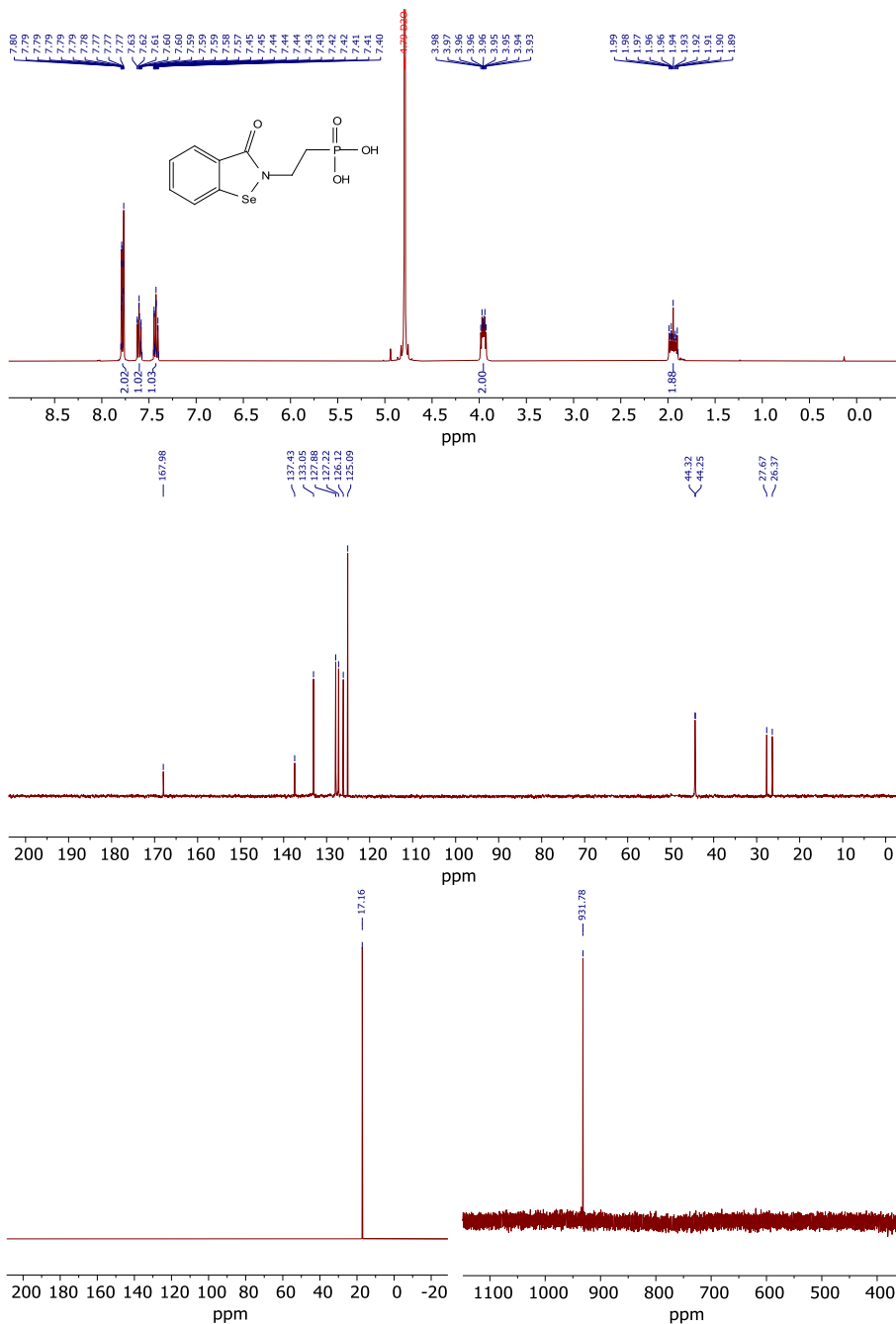
Rysunek 35. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.6.3 wykonane w  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



Rysunek 36. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.7.4 wykonane w  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

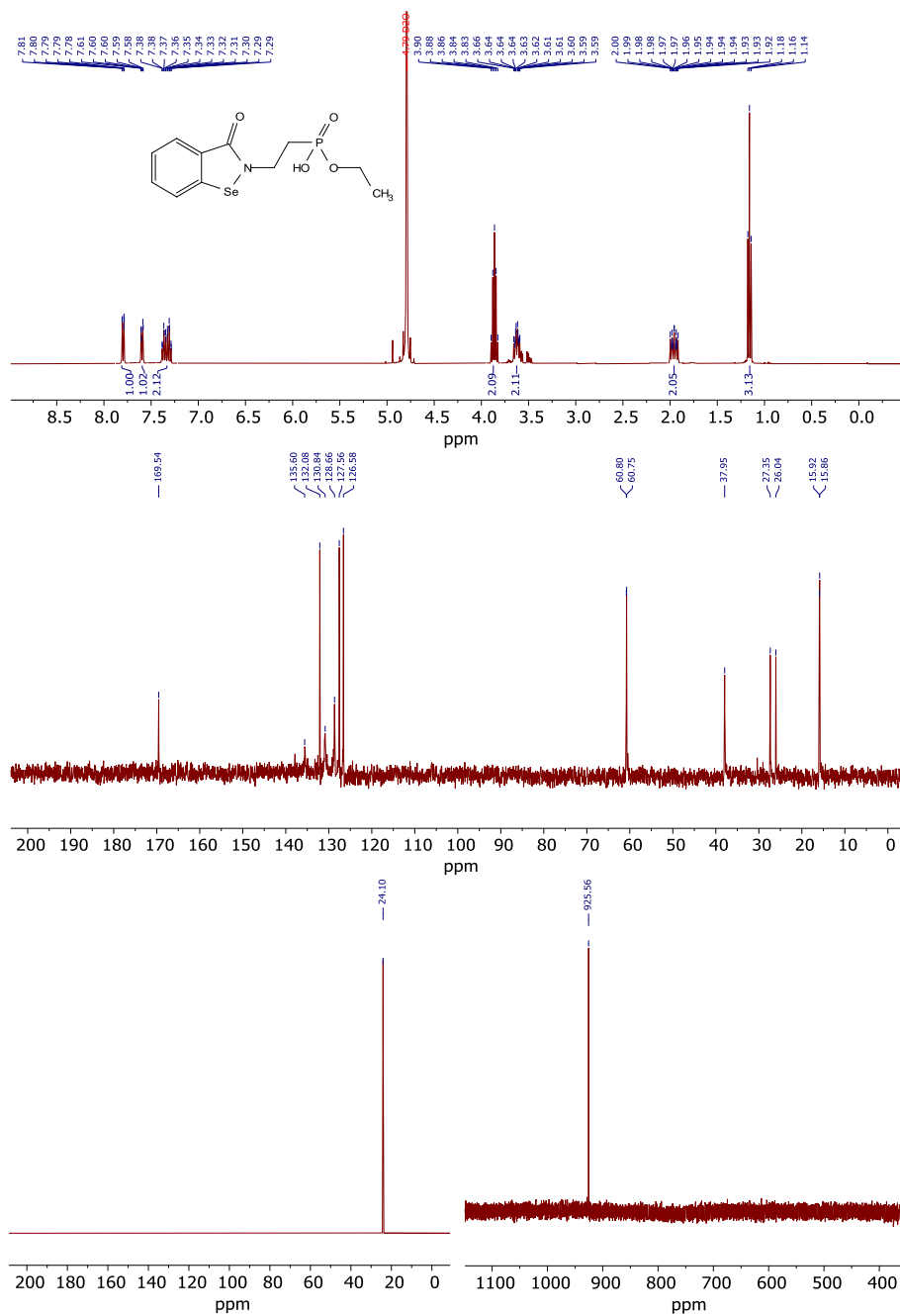




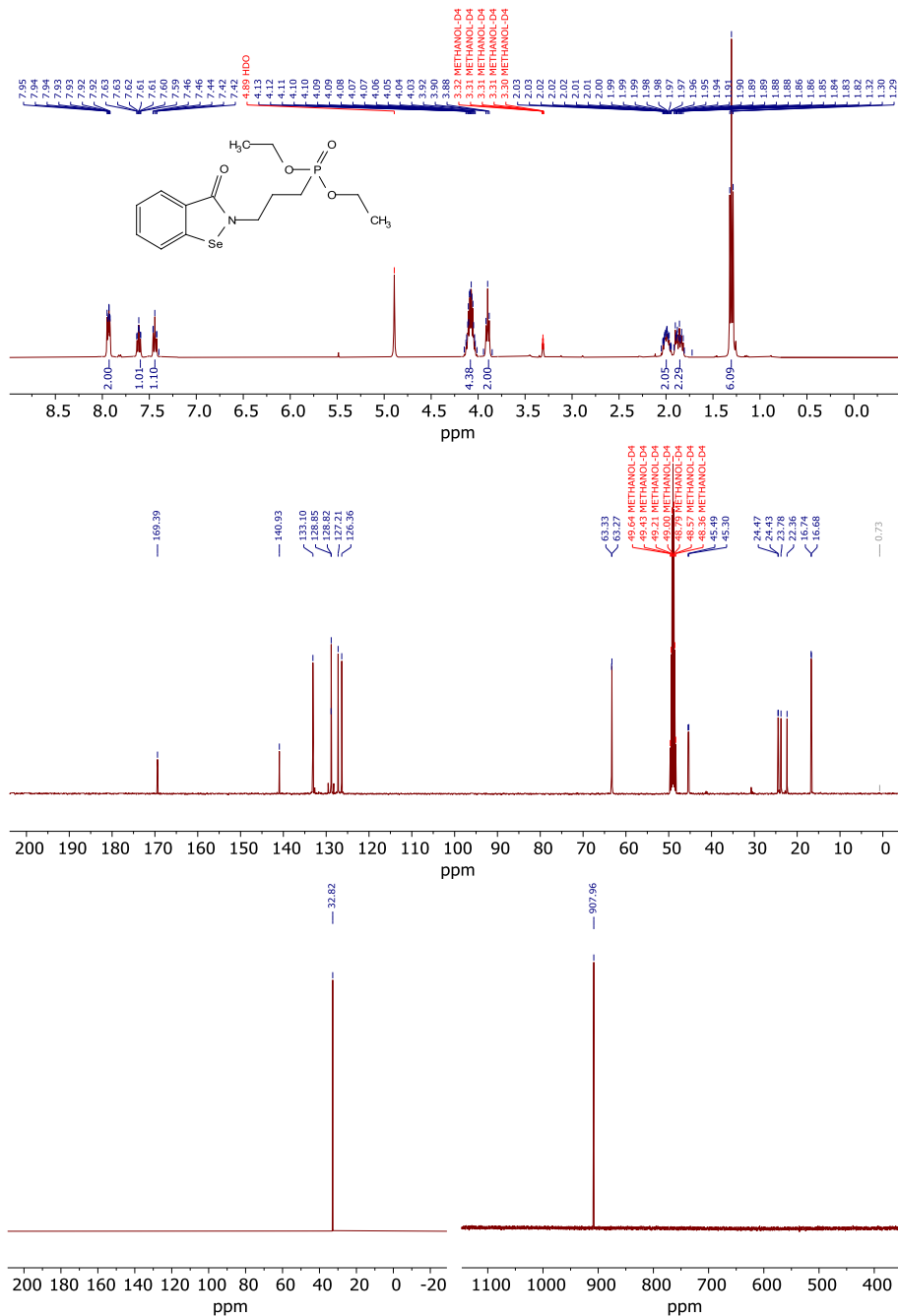


Rysunek 39. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.9.4 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .

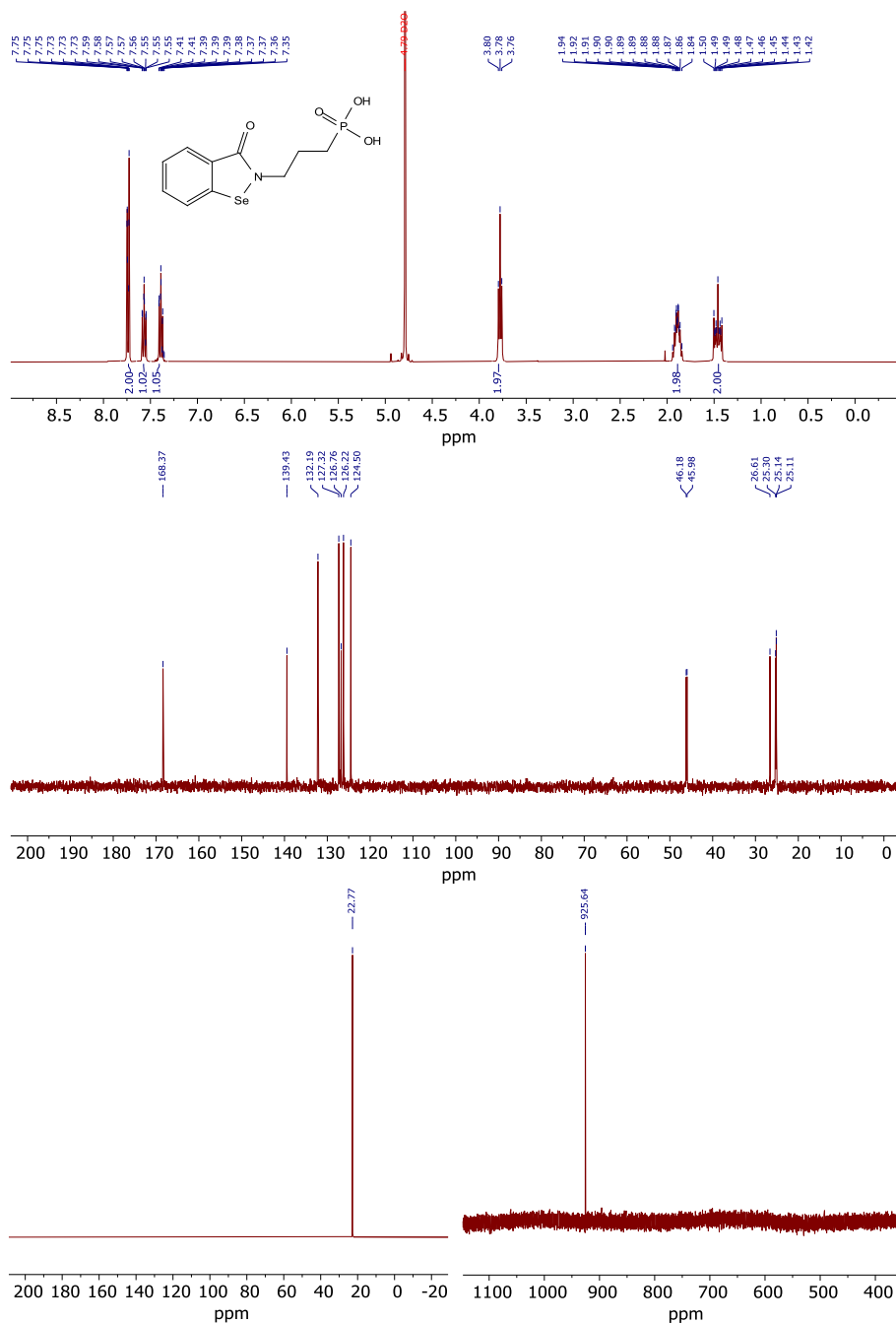




Rysunek 40. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.9.5 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .

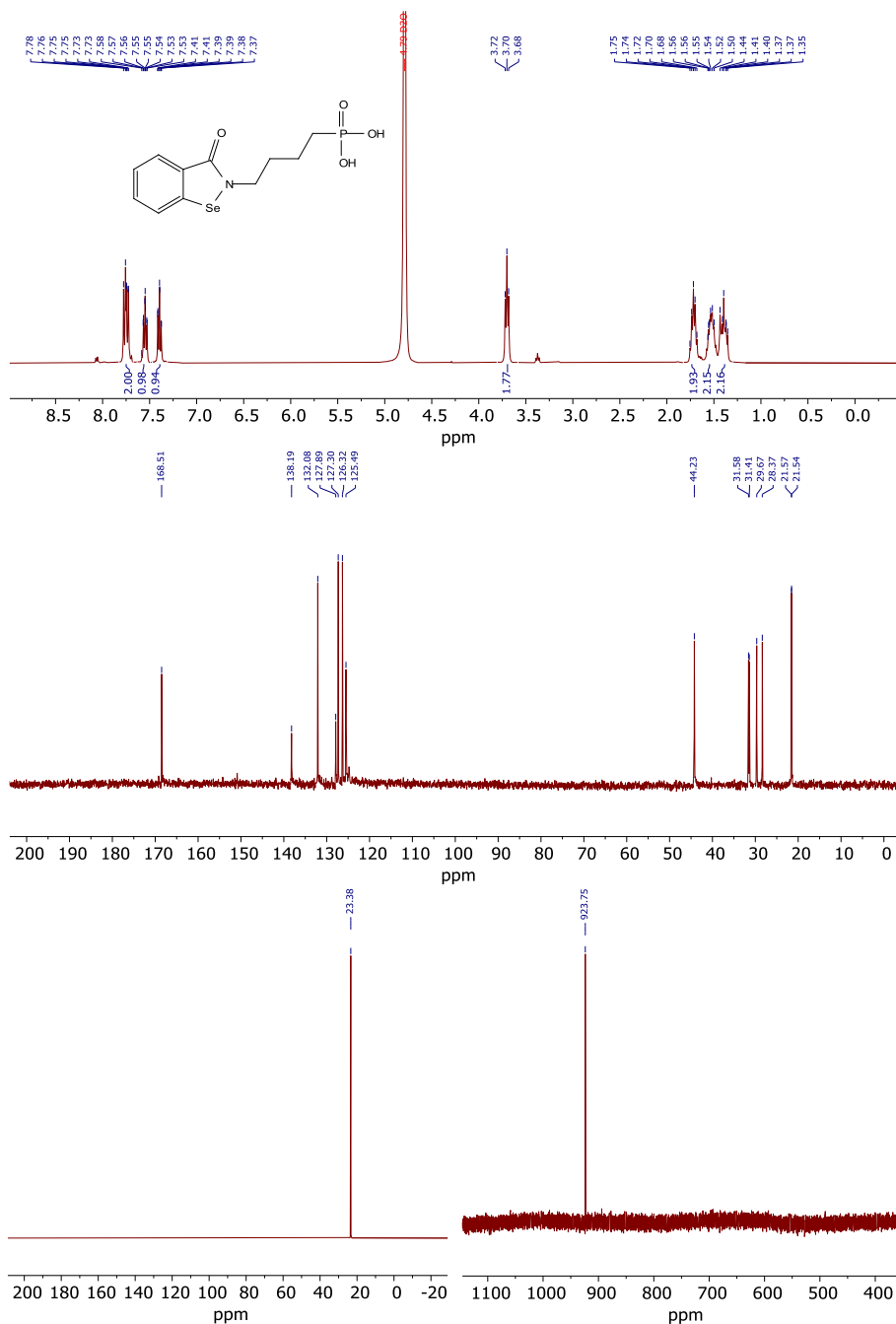


Rysunek 41. Widma <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P i <sup>77</sup>Se NMR związku P2.10.3 wykonane w CD<sub>3</sub>OD.



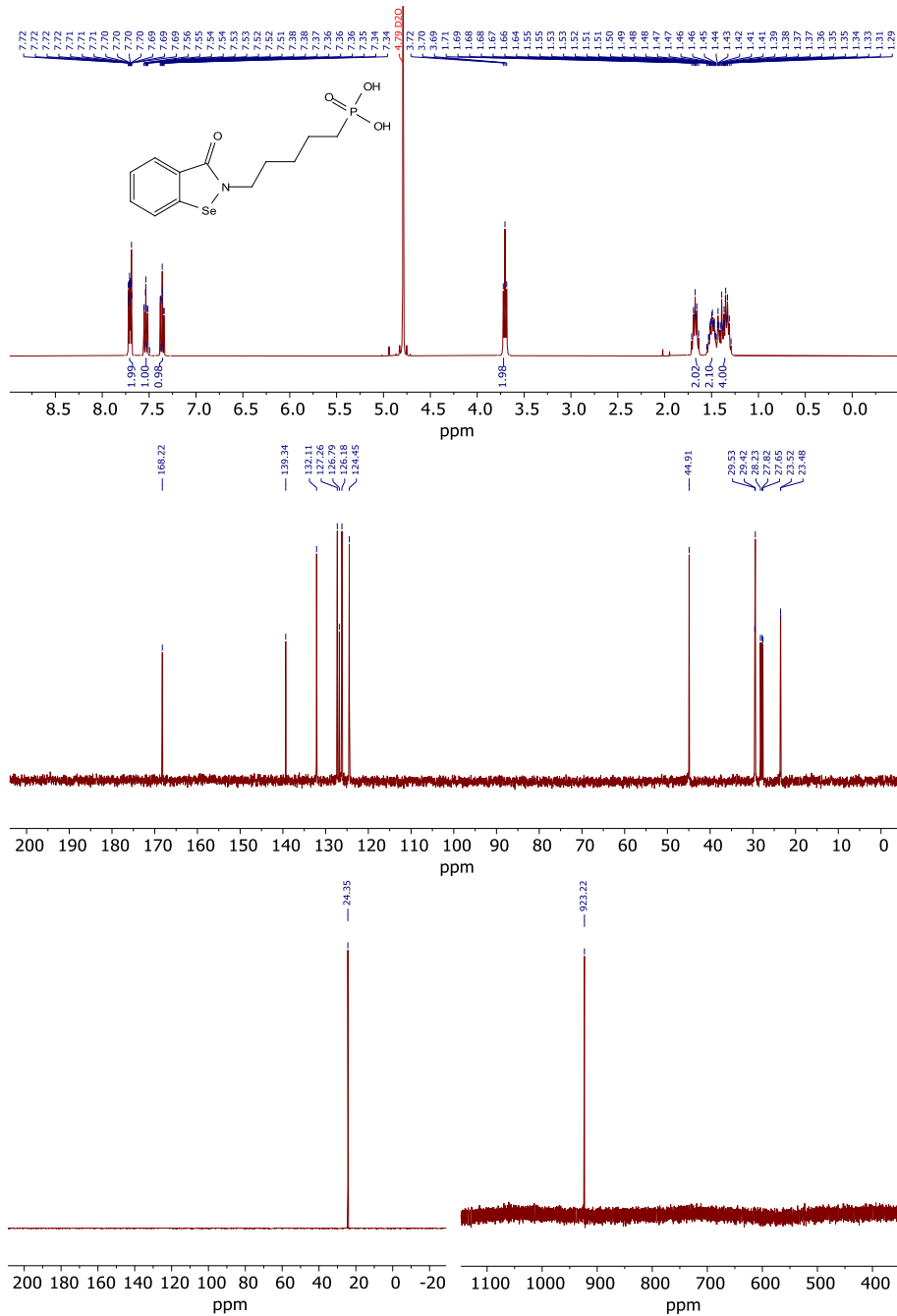
Rysunek 42. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.10.4 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .



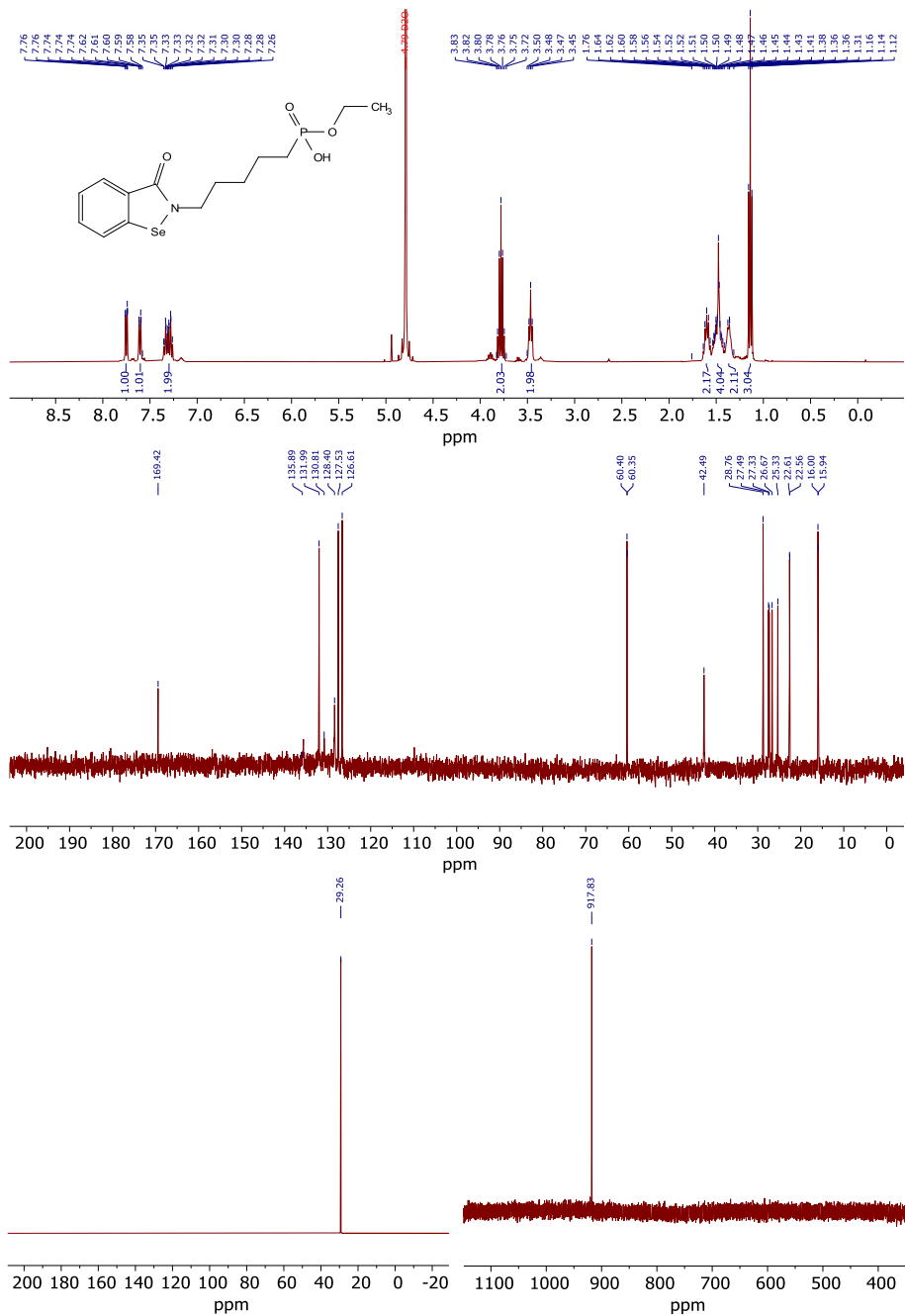


Rysunek 44. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.11.4 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .



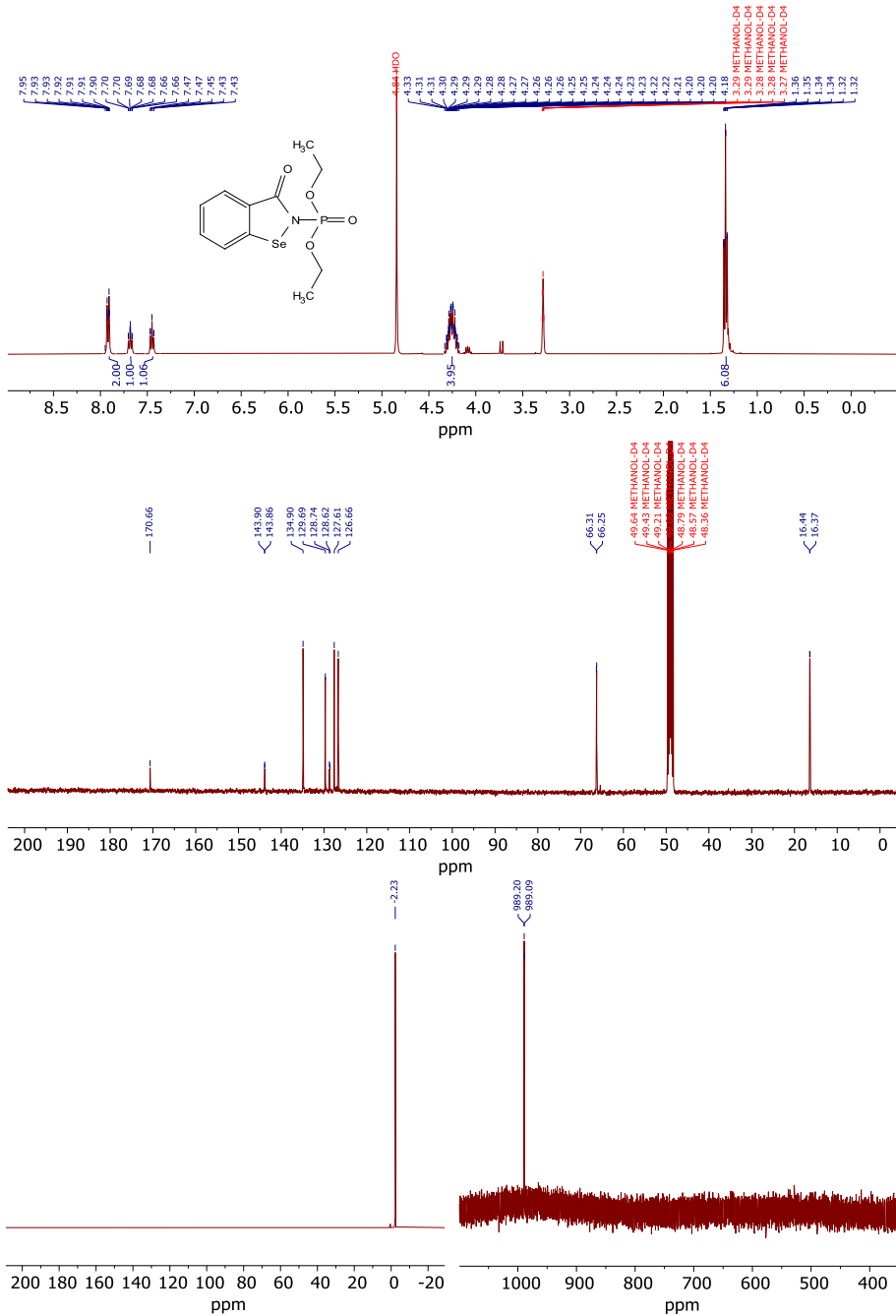


Rysunek 46. Widma  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{31}P$  i  $^{77}Se$  NMR związku P2.12.4 wykonane w  $D_2O$ .

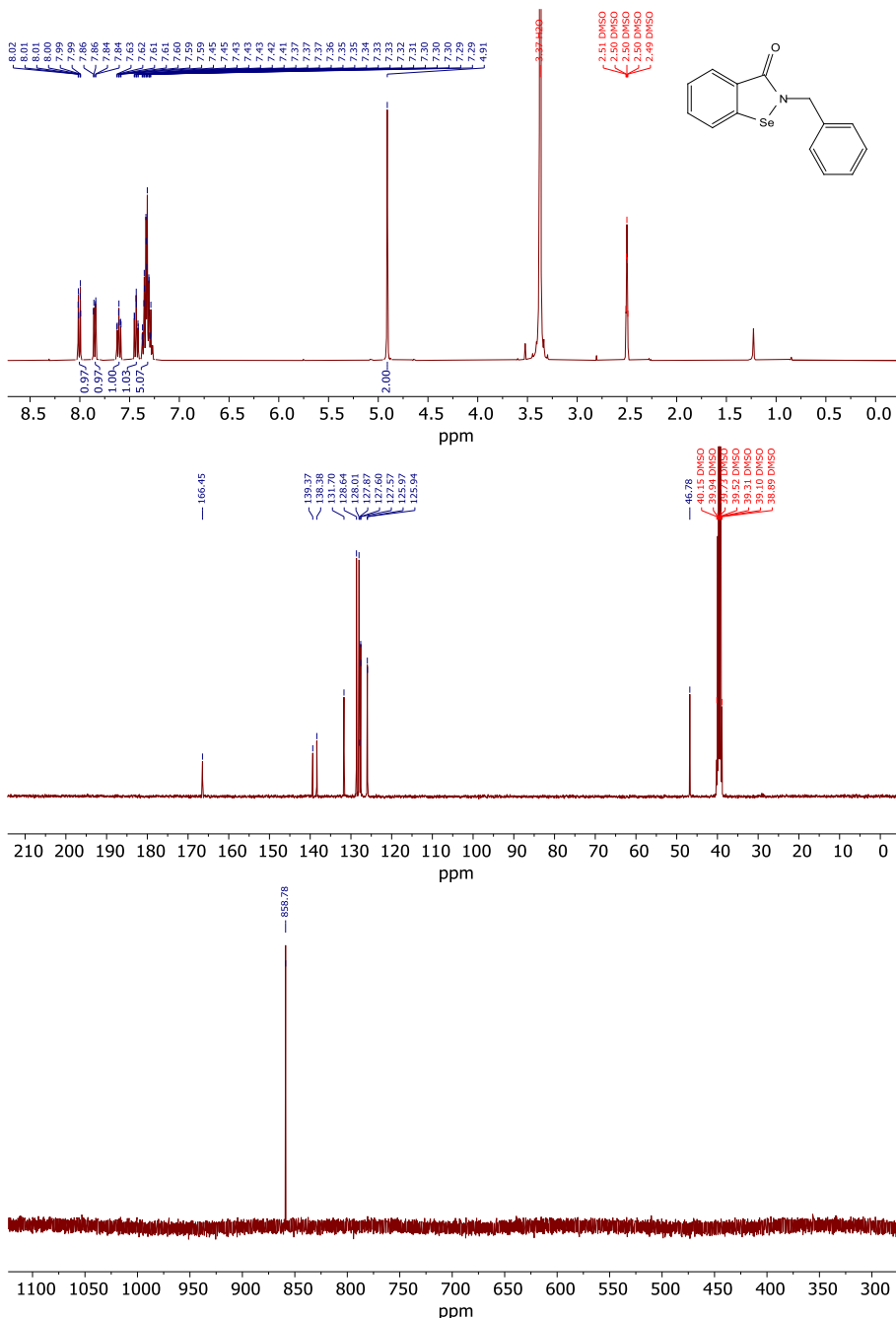


Rysunek 47. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.12.5 wykonane w  $\text{D}_2\text{O}$ .

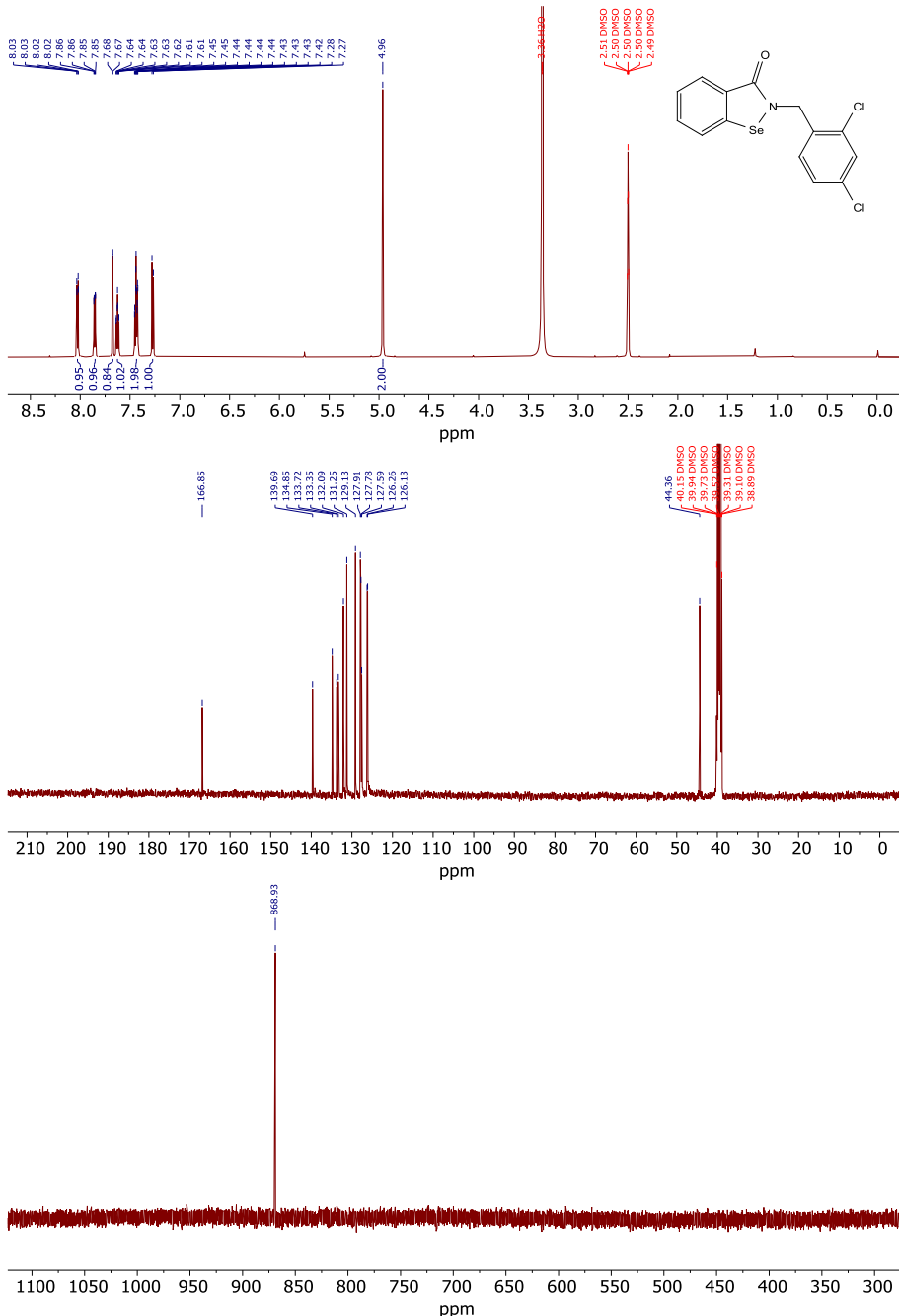




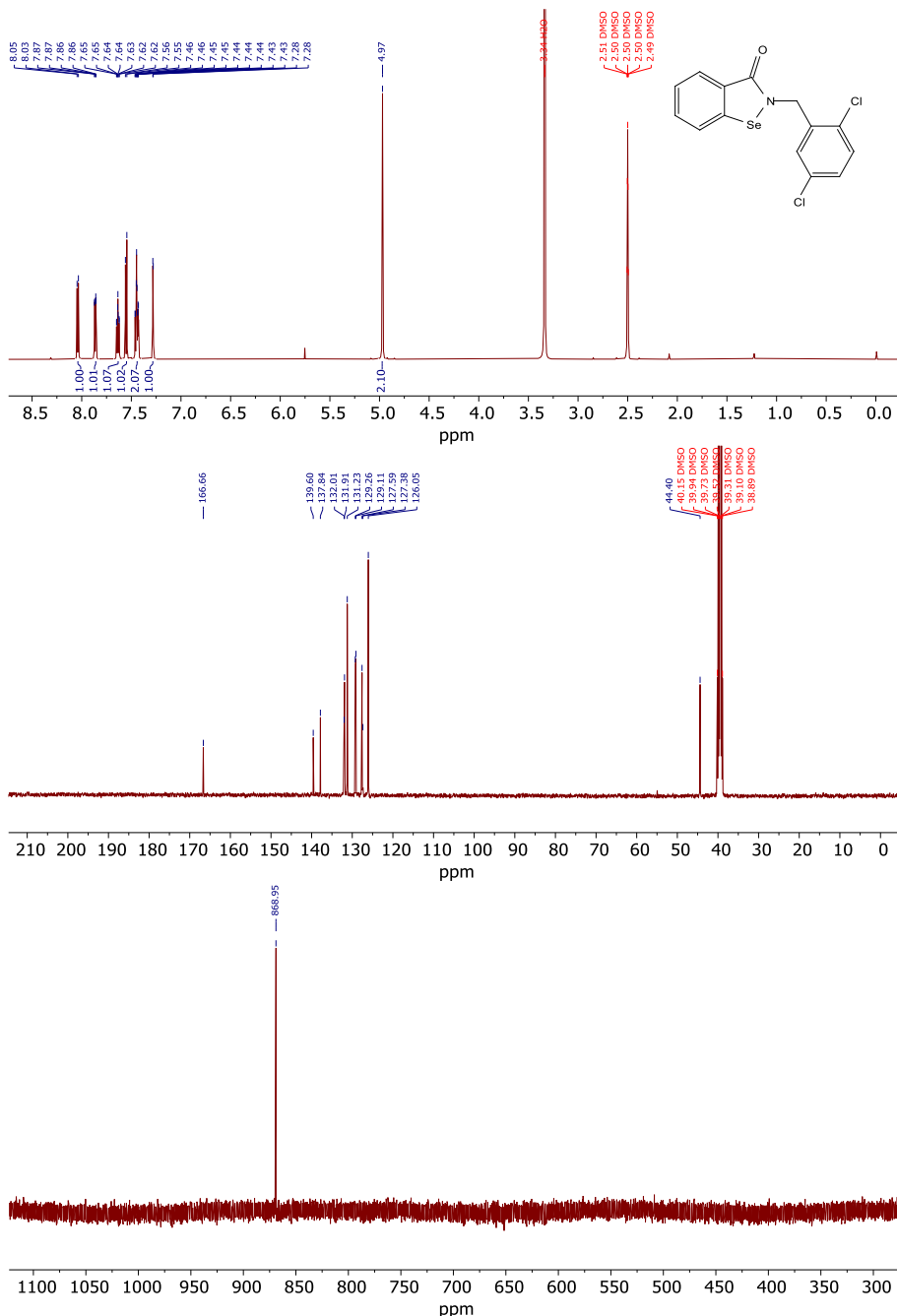
Rysunek 48. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P2.13 wykonane w  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



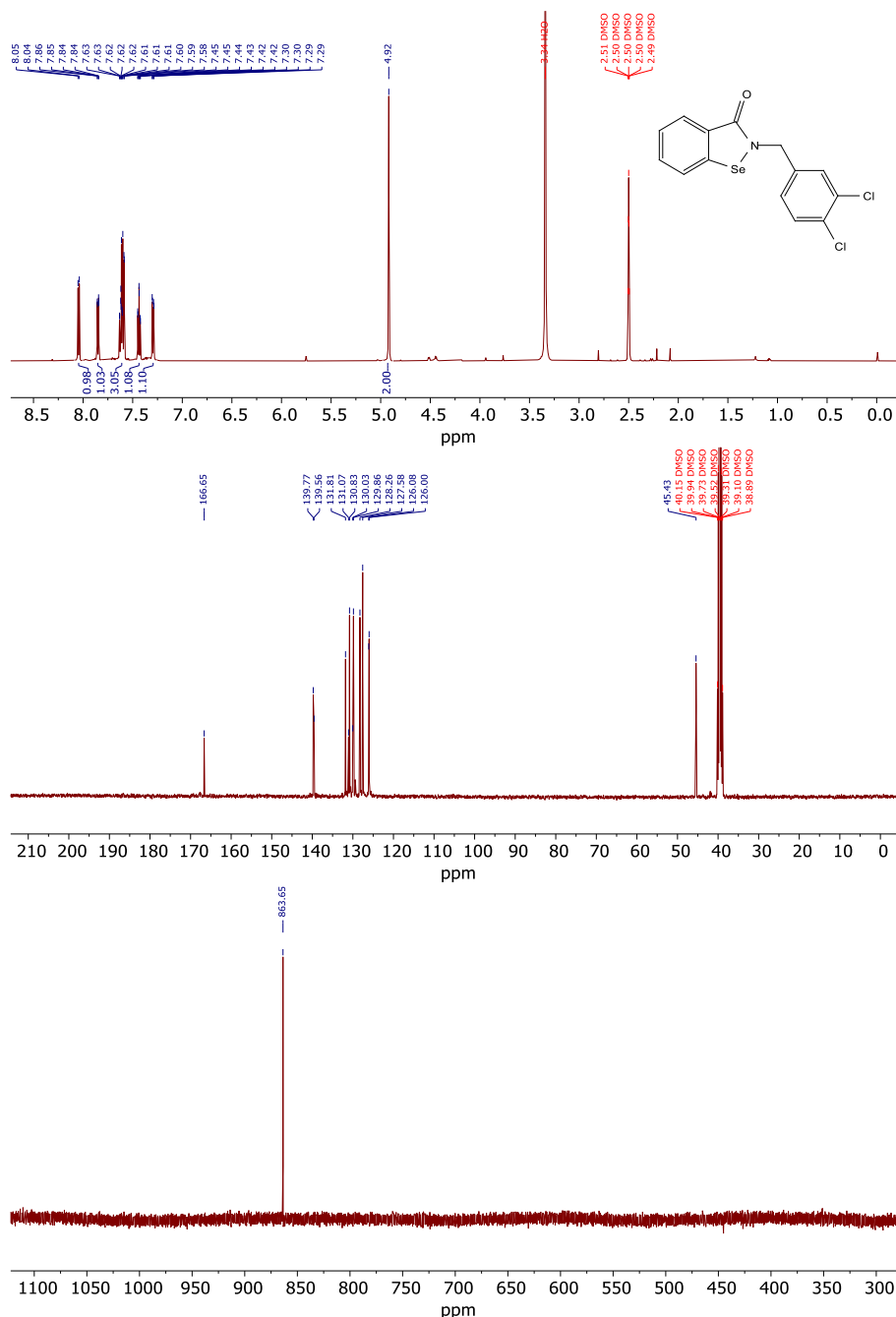
Rysunek 49. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.1 wykonane w  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ .



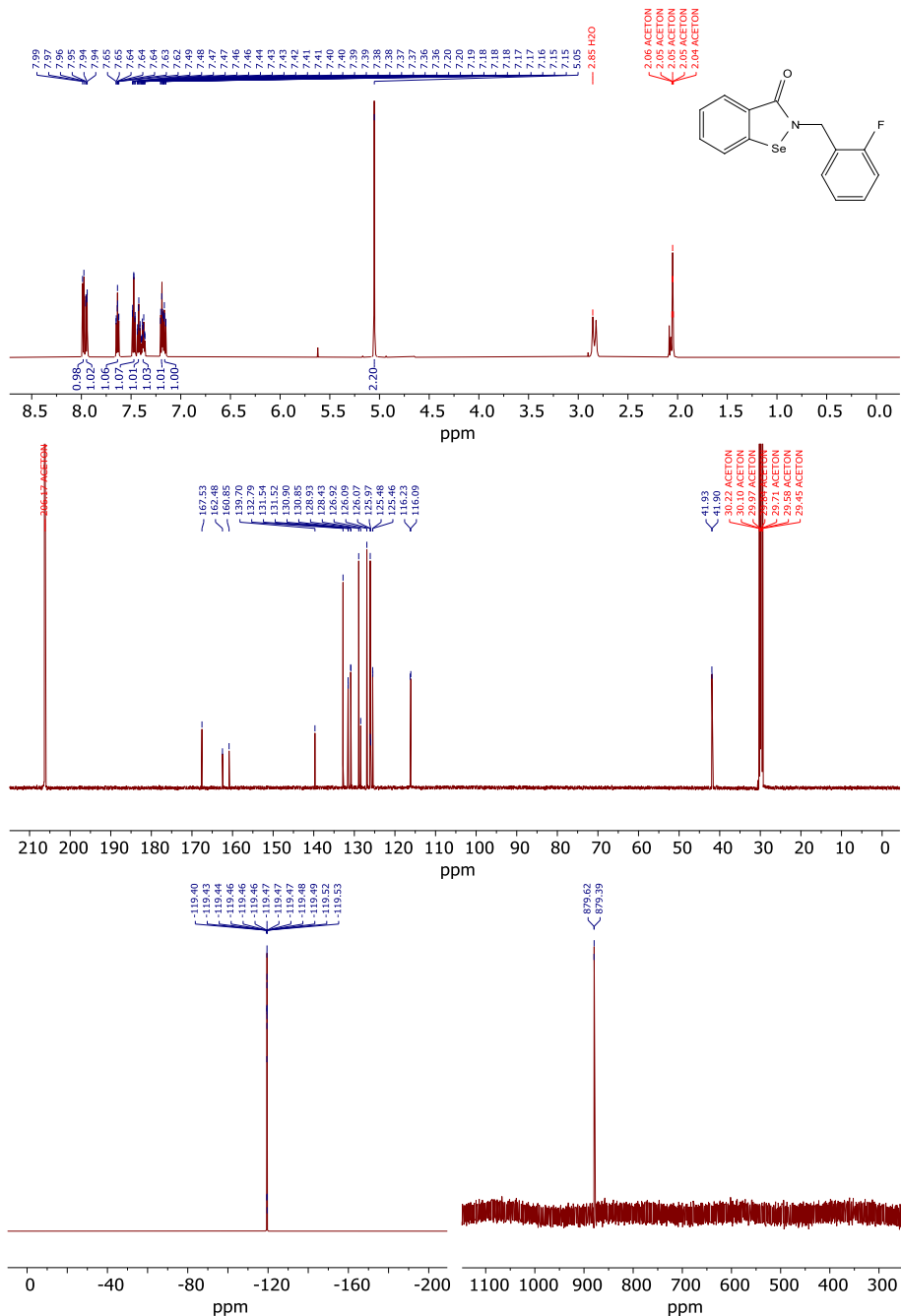
Rysunek 50. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.2 wykonane w  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ .



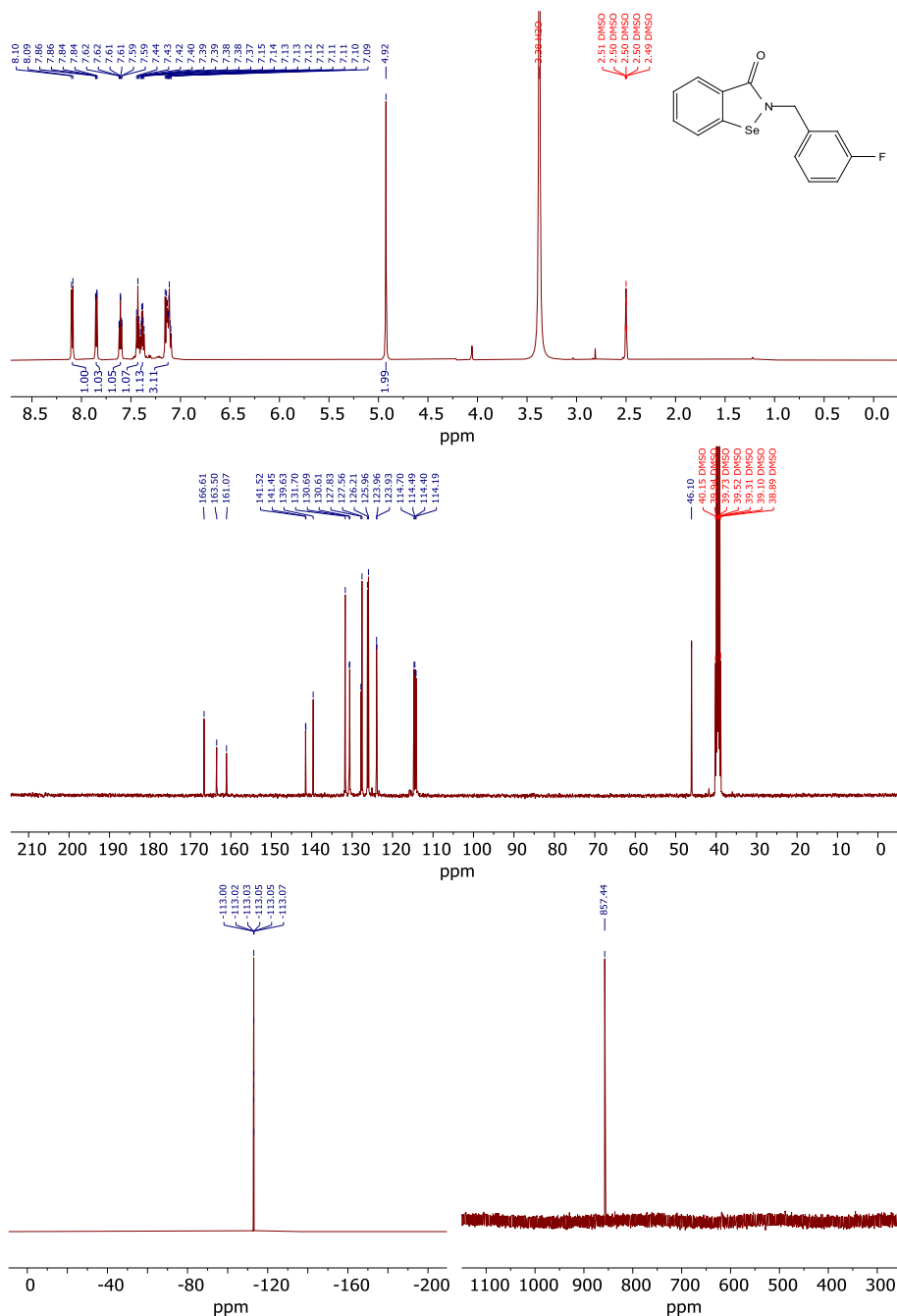
Rysunek 51. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.3 wykonane w  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ .



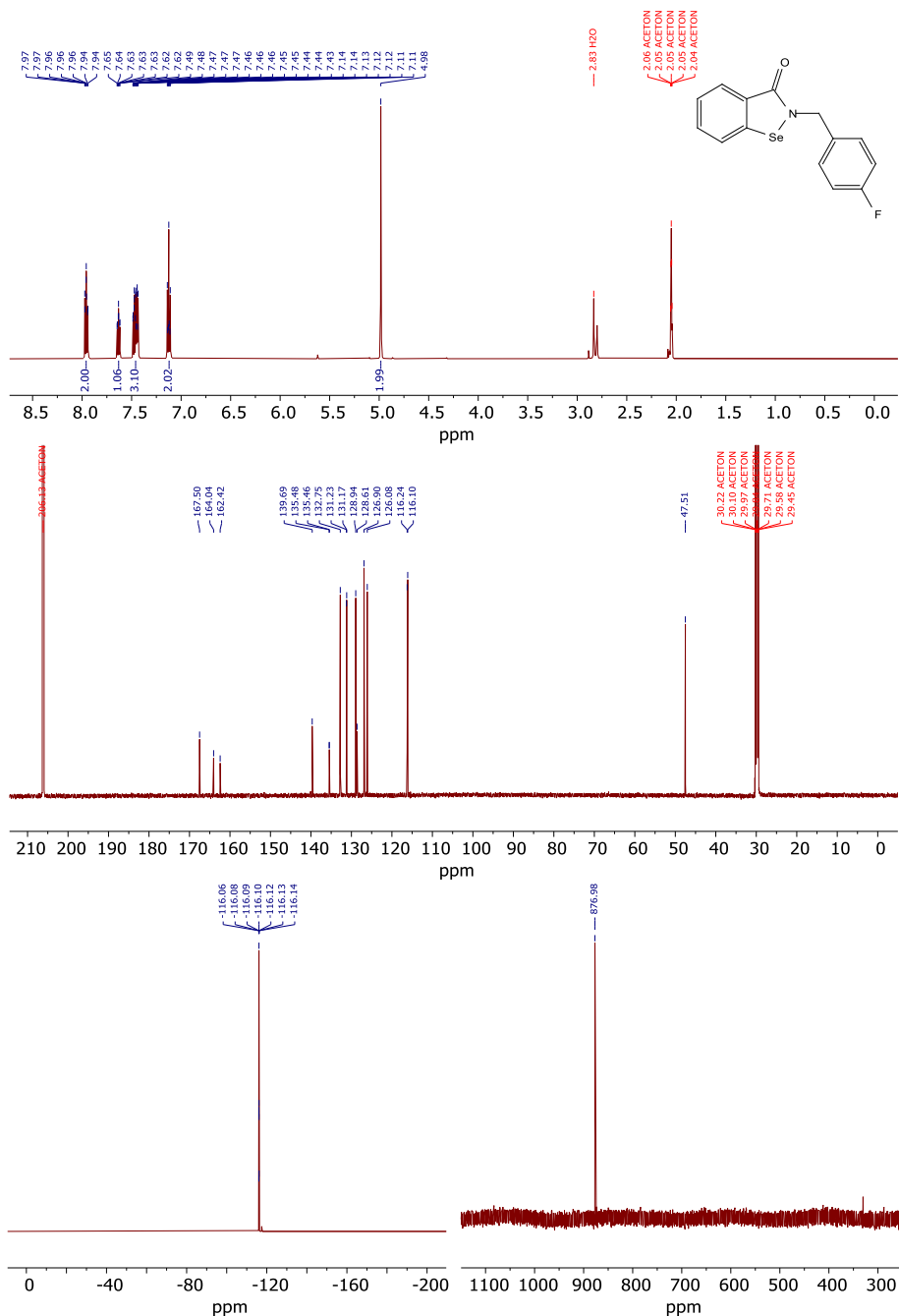
Rysunek 52. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P34 wykonane w  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ .



Rysunek 53. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.5 wykonane w deuterowanym acetonie.

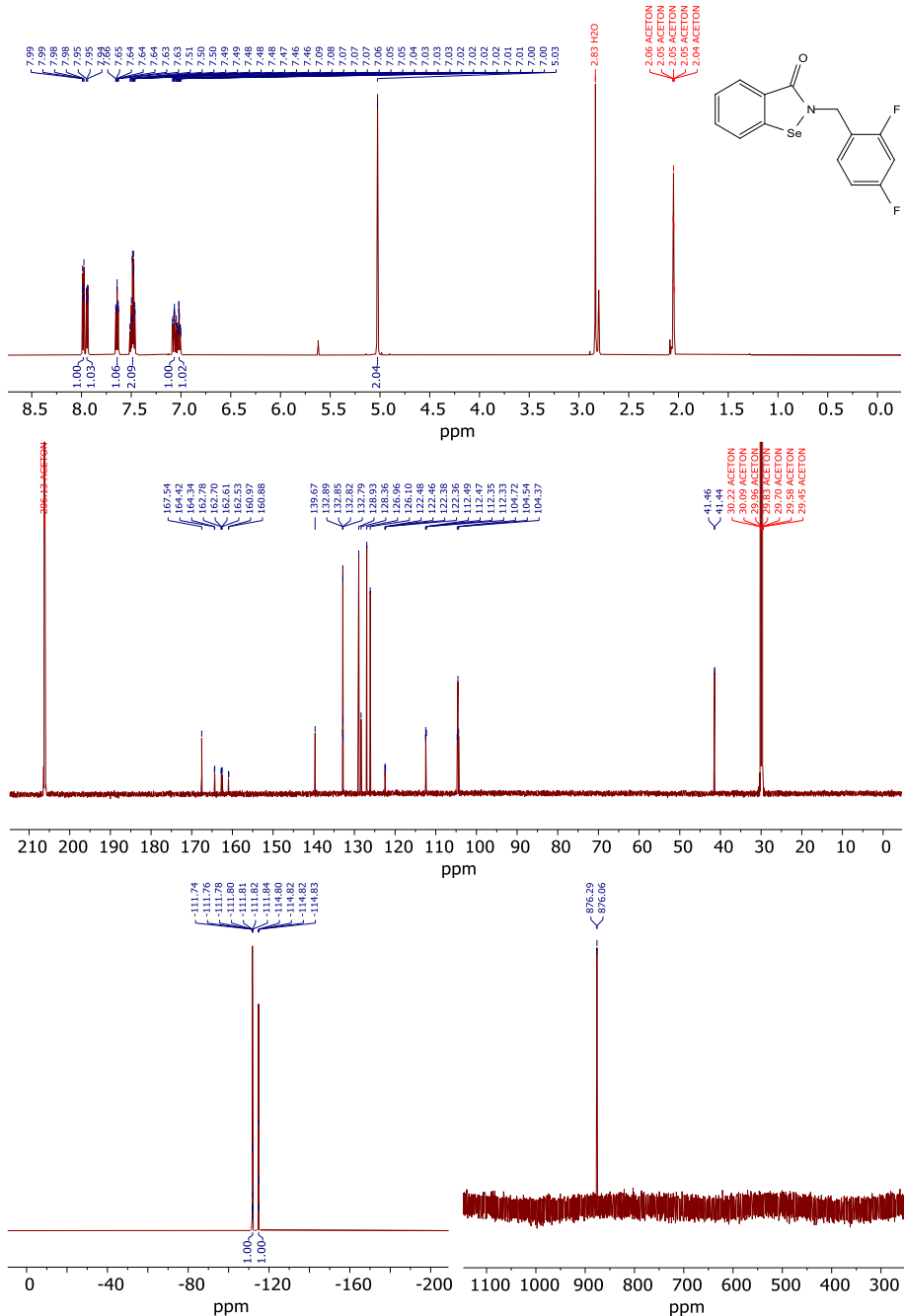


Rysunek 54. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.6 wykonane w  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ .

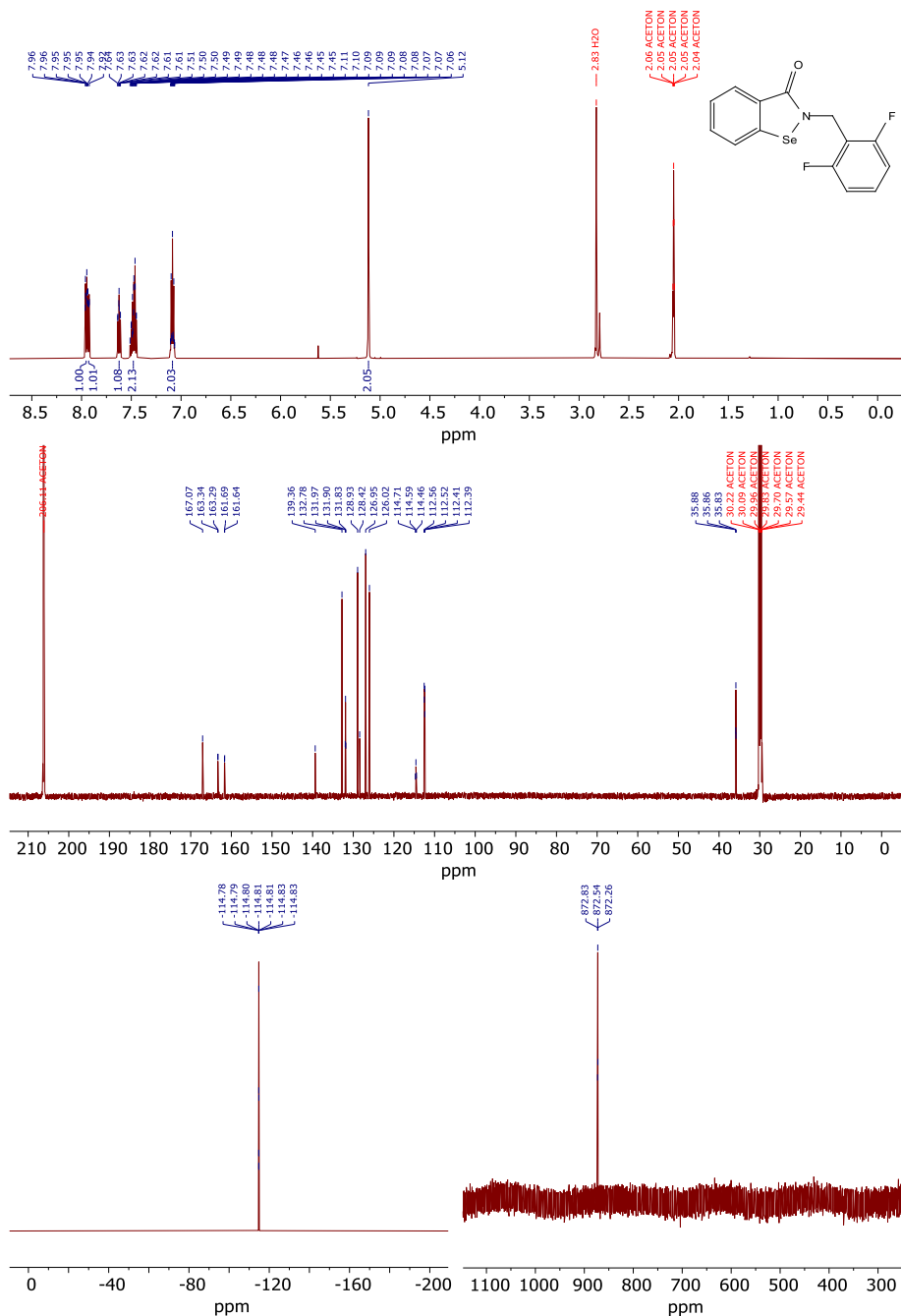


Rysunek 55. Widma <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F i <sup>77</sup>Se NMR związku P3.7 wykonane w deuterowanym acetonie.

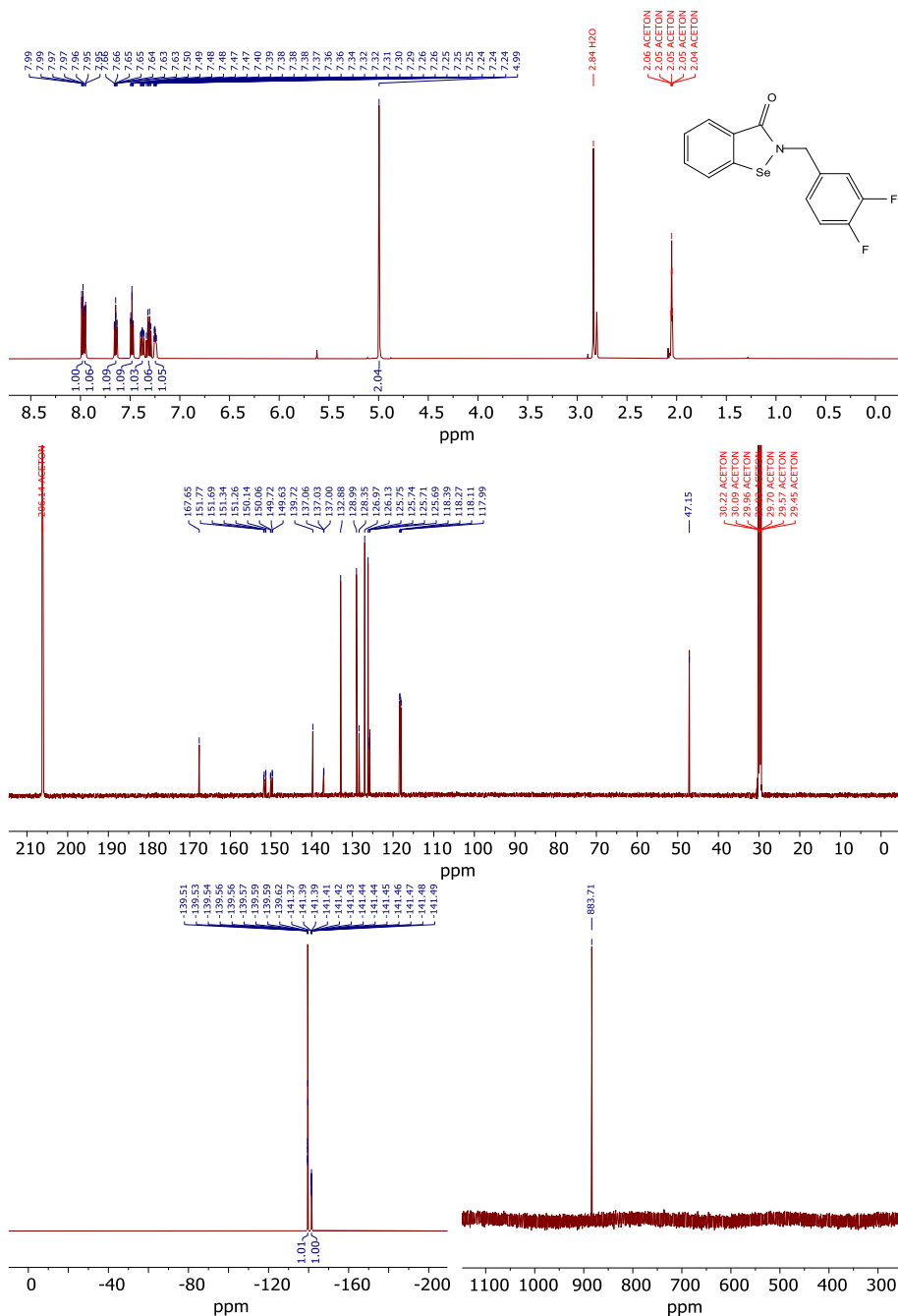




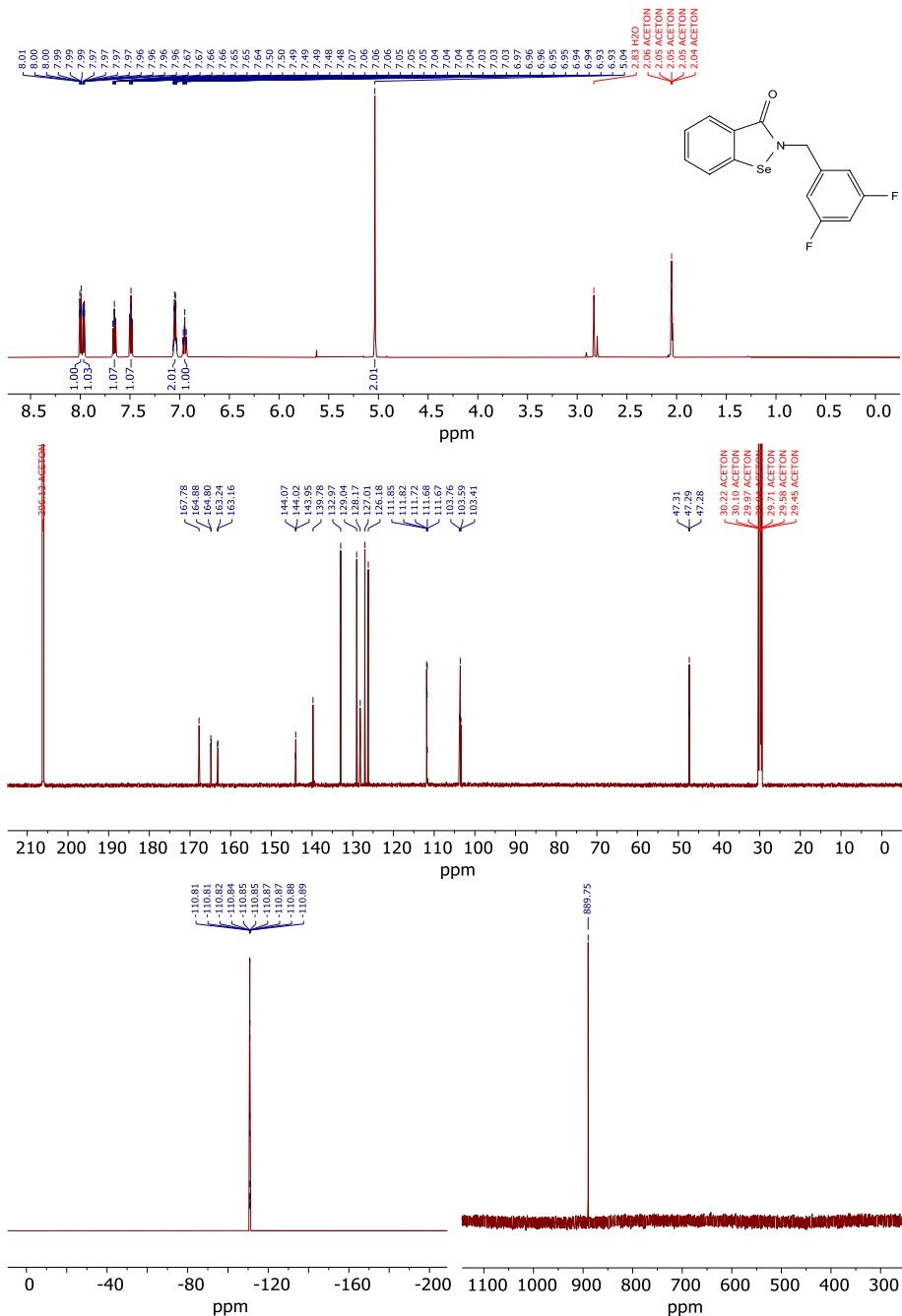
Rysunek 56. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.8 wykonane w deuterowanym acetonie.



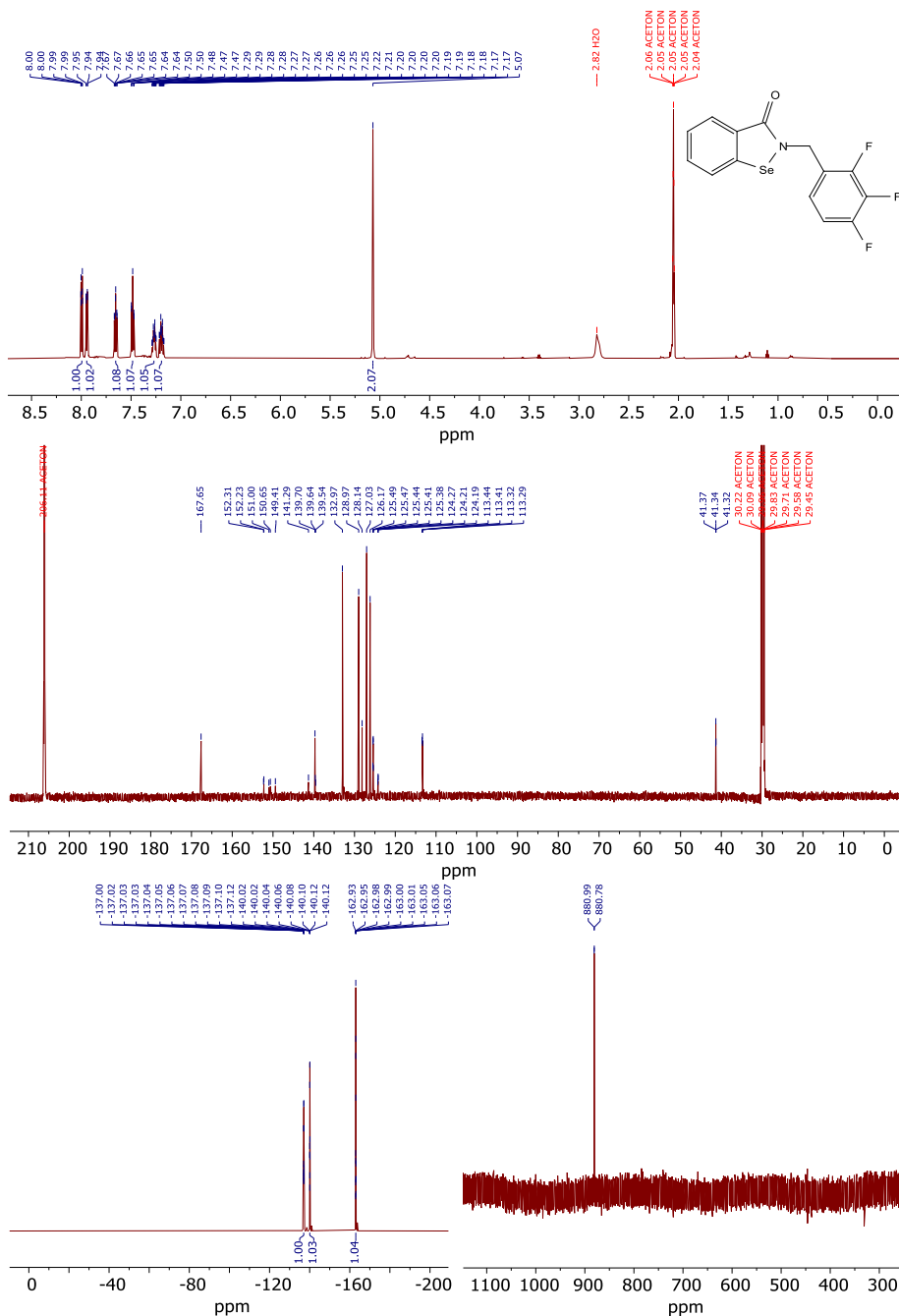
Rysunek 57. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.9 wykonane w deuterowanym acetonie.



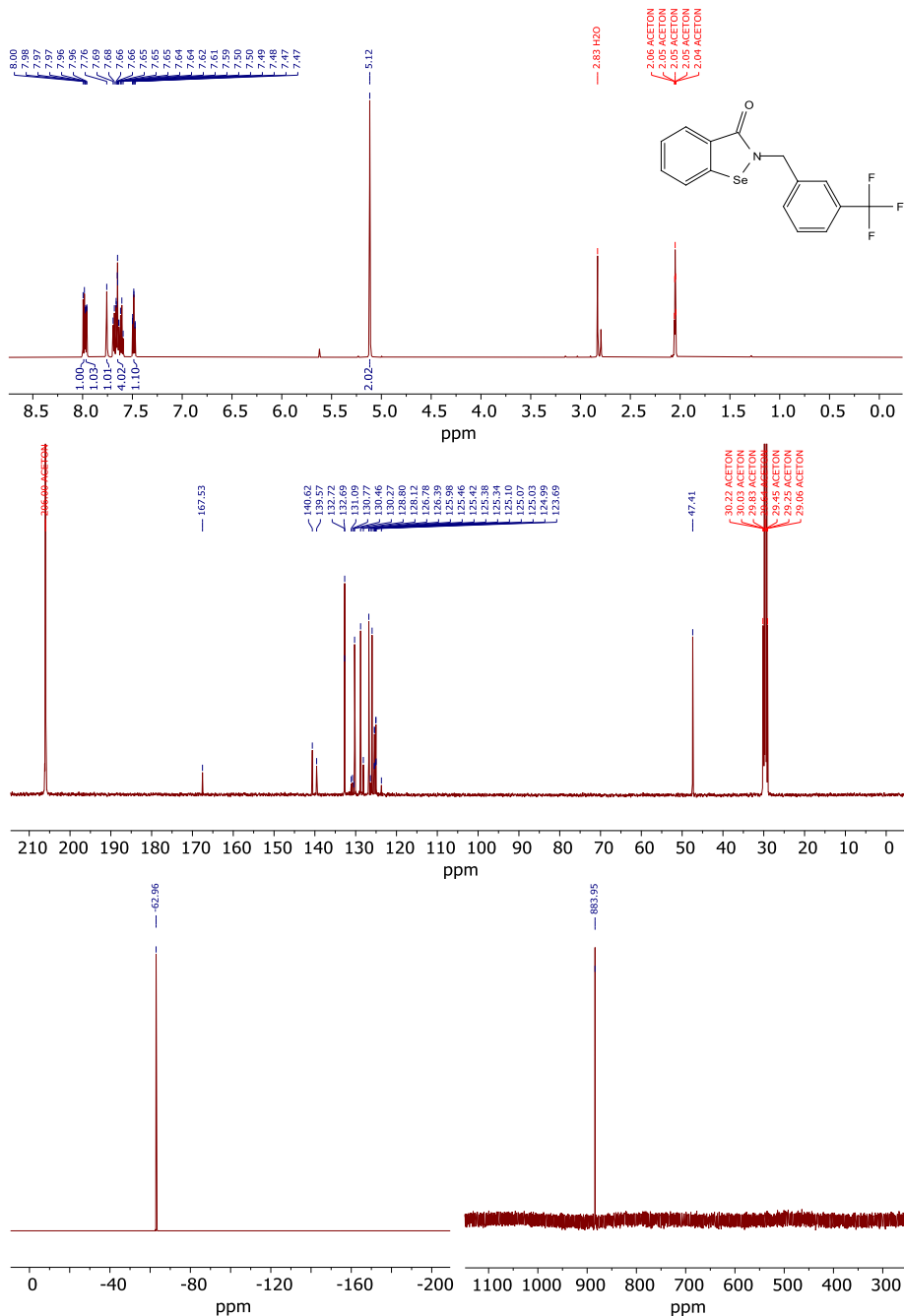
Rysunek 58. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.10 wykonane w deuterowanym acetonie.



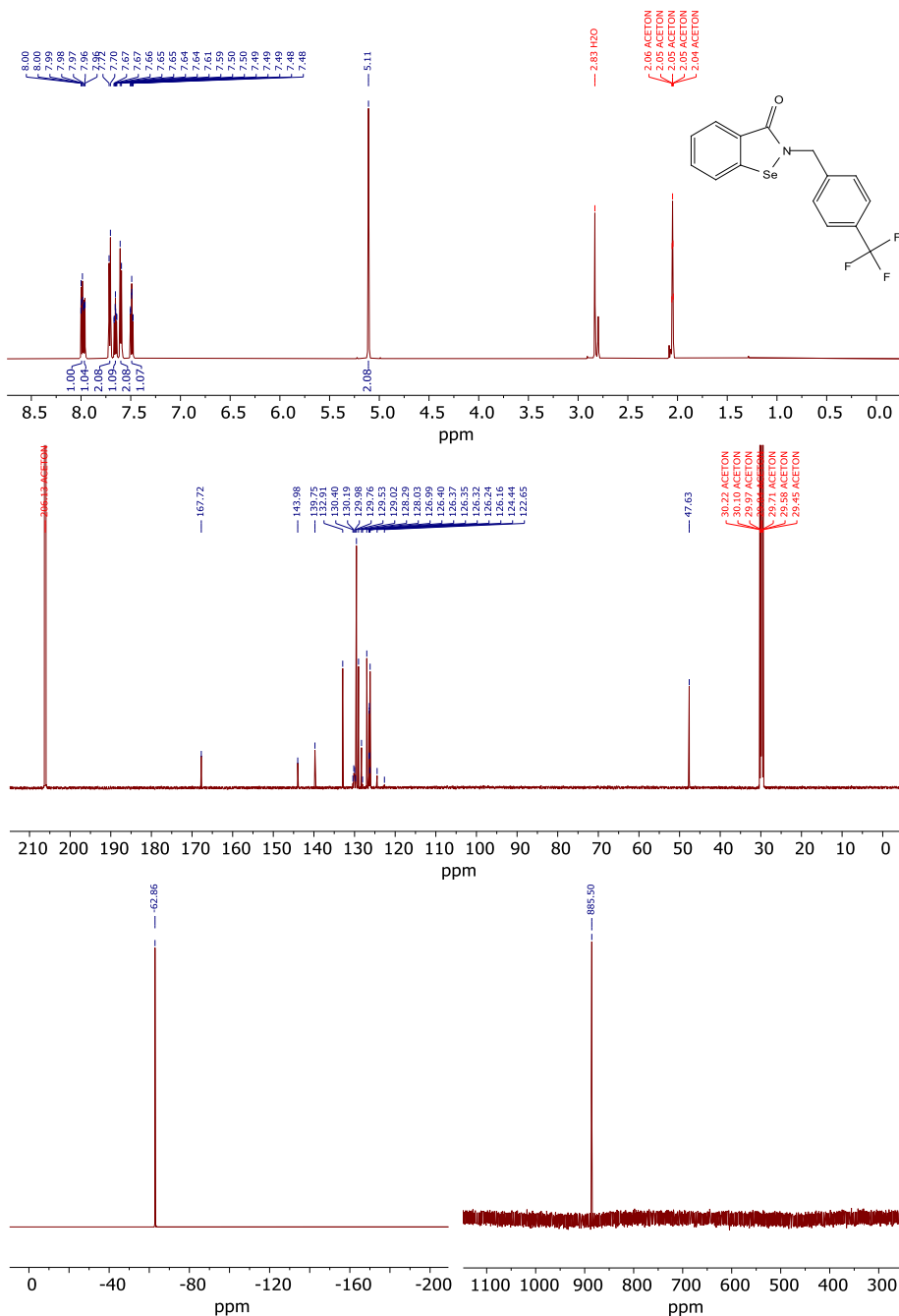
Rysunek 59. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.11 wykonane w deuterowanym acetonie.



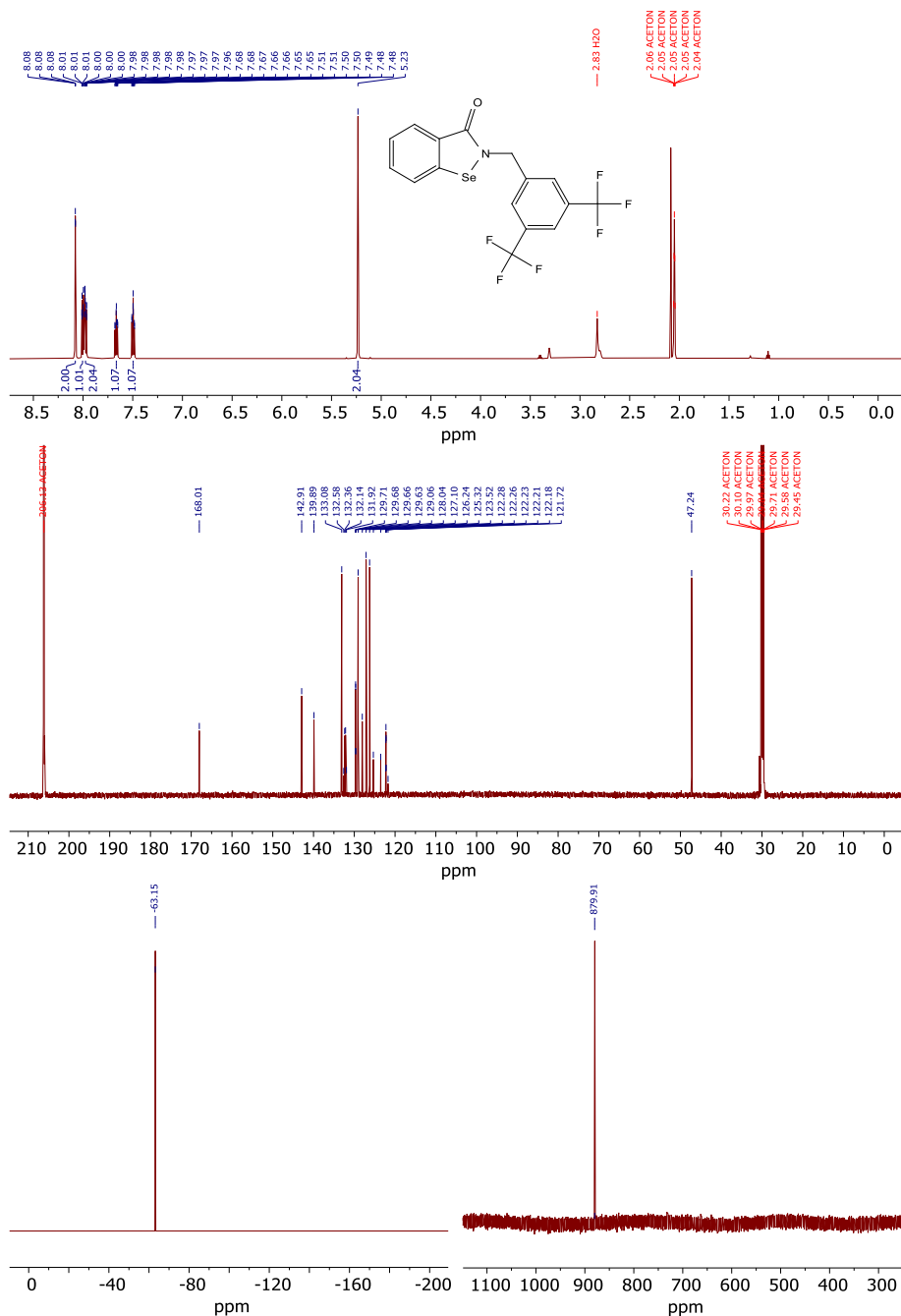
Rysunek 60. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.12 wykonane w deuterowanym acetonie.



Rysunek 61. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.13 wykonane w deuterowanym acetonie.

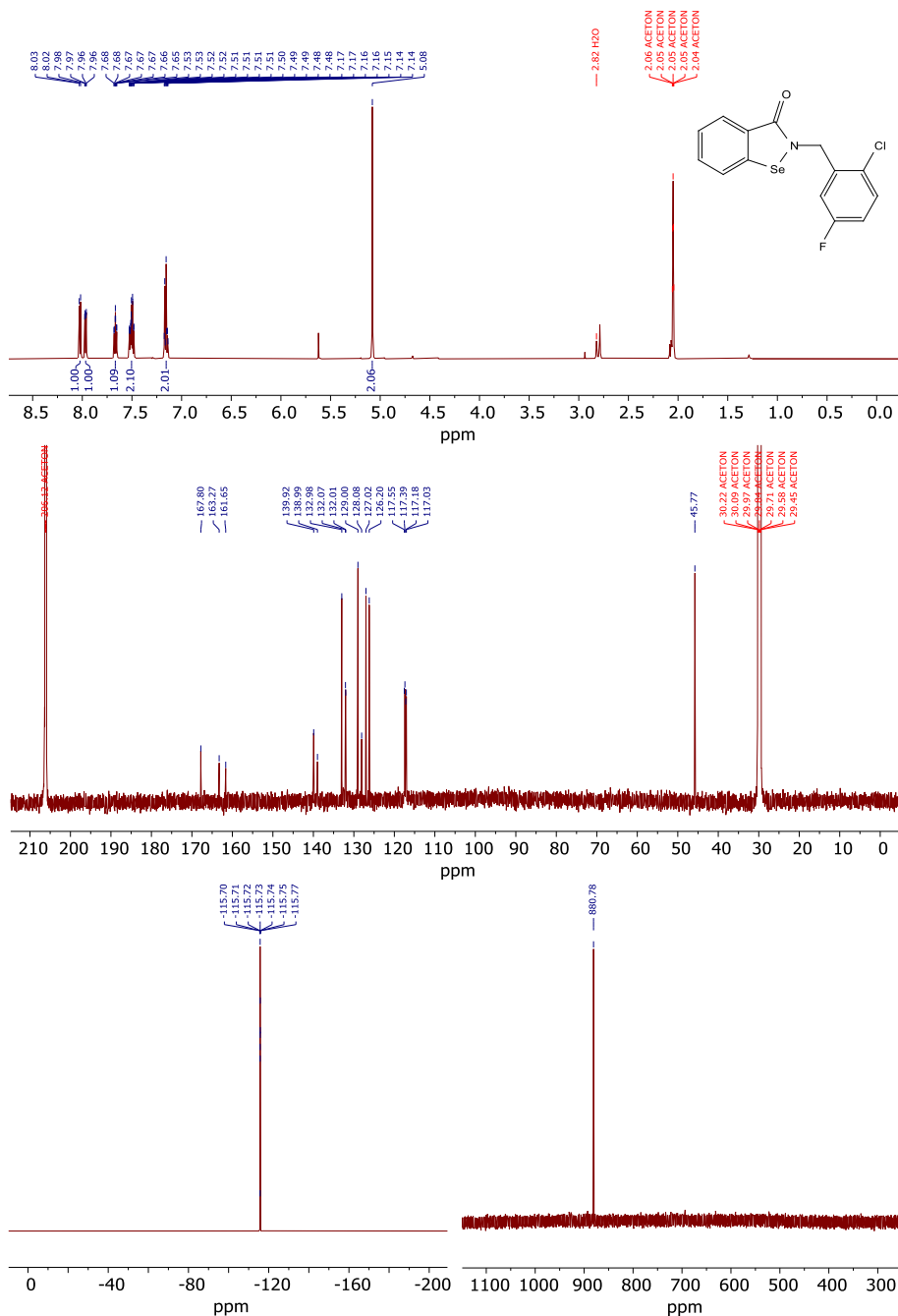


Rysunek 62. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.14 wykonane w deuterowanym acetonie.

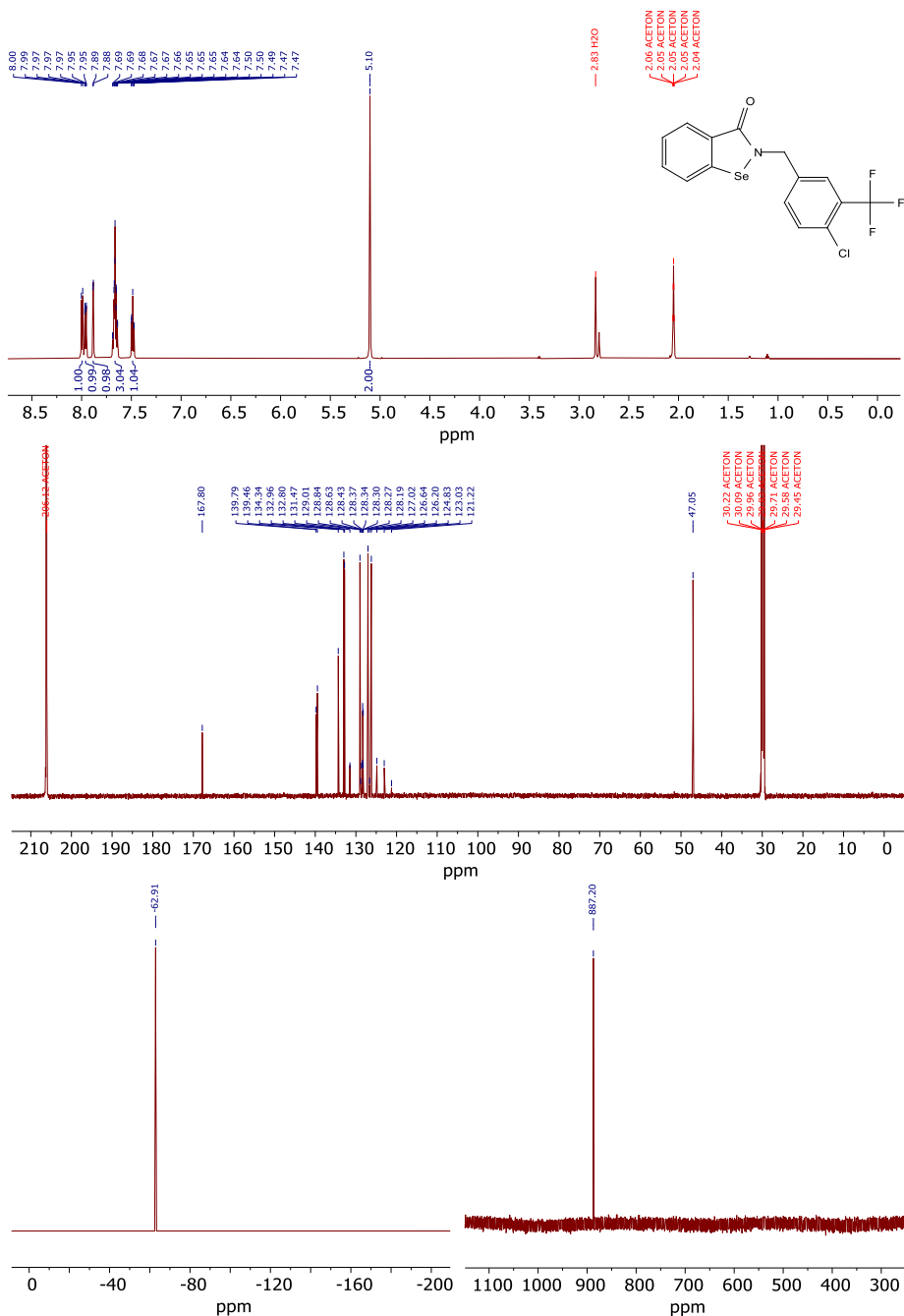


Rysunek 63. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.15 wykonane w deuterowanym acetonie.

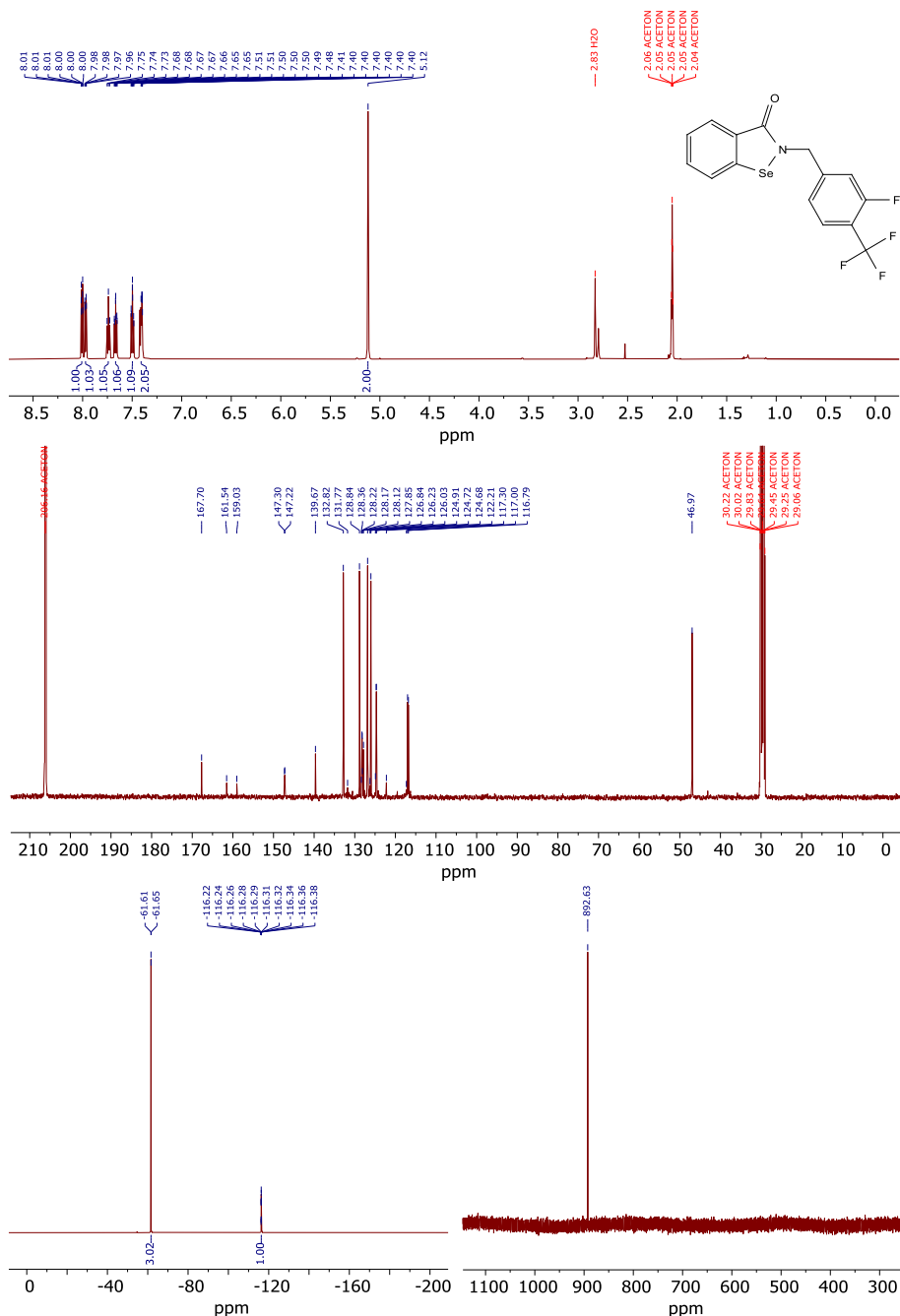




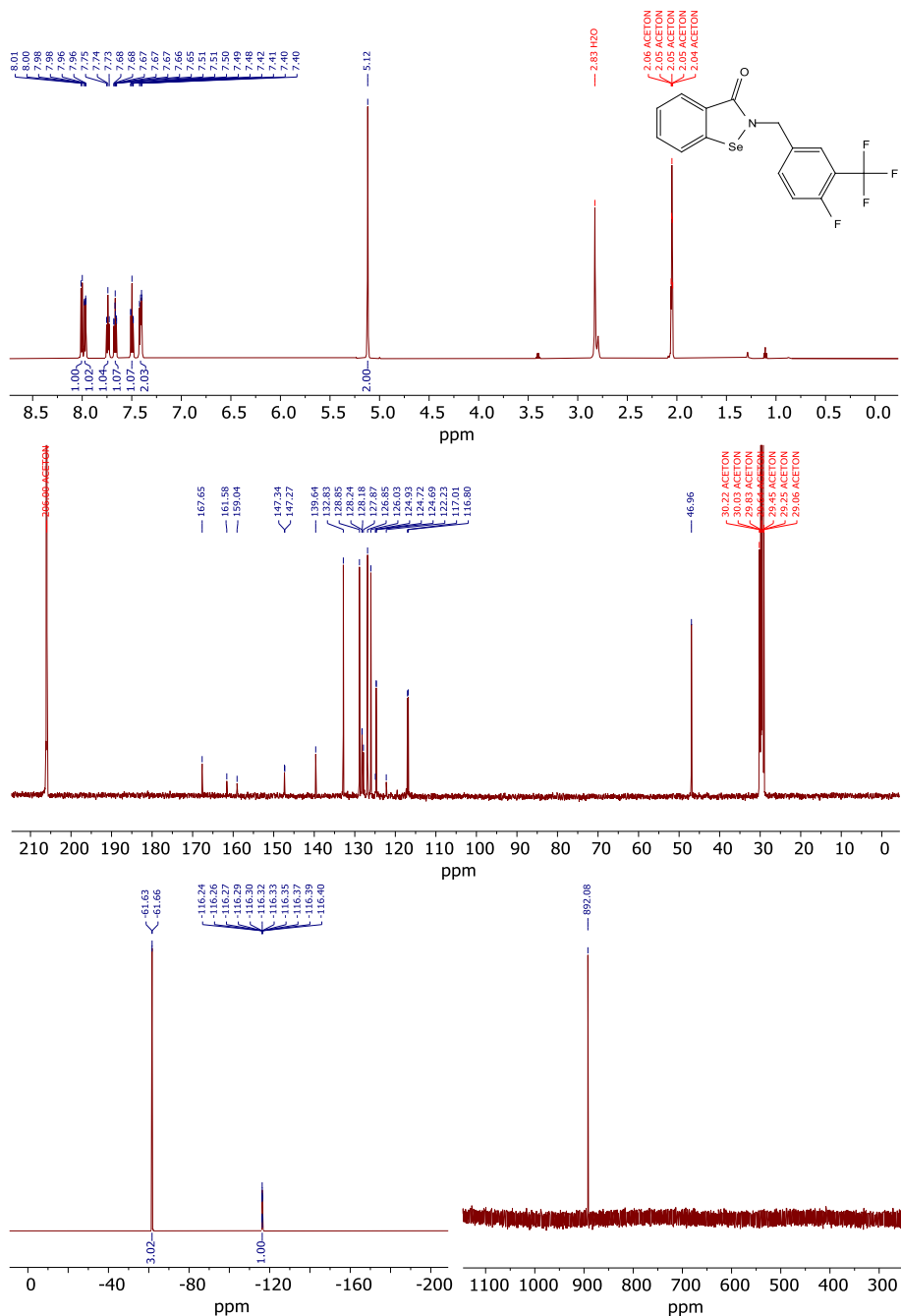
Rysunek 64. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.16 wykonane w deuterowanym acetonie.



Rysunek 65. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.17 wykonane w deuterowanym acetonie.



Rysunek 66. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.18 wykonane w deuterowanym acetonie.



Rysunek 67. Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{77}\text{Se}$  NMR związku P3.19 wykonane w deuterowanym acetonie.