

Ryszard Bugno

**Modyfikacje struktury arylopiperazynowych
i arylosulfonamidowych ligandów receptorów
serotoninowych typu 5-HT_{1A} i 5-HT₇
w poszukiwaniu czynników determinujących
selektywność oddziaływań**

Rozprawa doktorska



**Instytut Farmakologii PAN
Kraków 2009**

Instytut Farmakologii PAN
Zakład Chemii Leków

Ryszard Bugno

Modyfikacje struktury arylopiperazynowych
i arylosulfonamidowych ligandów receptorów
serotoninowych typu 5-HT_{1A} i 5-HT₇ w poszukiwaniu
czynników determinujących selektywność oddziaływań

Rozprawa doktorska

Promotor: doc. dr hab. Andrzej J. Bojarski



Kraków 2009

Pracę pragnę zadedykować mojej Rodzinie

Serdeczne podziękowania pragnę złożyć:

*Panu doc. dr hab. **Andrzejowi J. Bojarskiemu**, mojemu promotorowi, kierownikowi Zakładu Chemii Leków IF PAN za opiekę naukową, poświęcony czas, wsparcie i zaufanie*

oraz szczególnie

*Pani dr **Beacie Duszyńskiej** za szereg cennych uwag i wszelką pomoc w trakcie pisania niniejszej pracy.*

Pragnę również podziękować:

*Paniom dr **Marii Paluchowskiej** i **Anecie Koziół** oraz panu dr **Janowi Boksie** za wartościowe wskazówki w trakcie syntezy związków,*

*Pani **Krystynie Nędzy** za wykonanie badań farmakologicznych związków *in vitro*,*

*Panom dr **Mateuszowi Nowakowi** i mgr **Stefanowi Mordalskiemu** za wykonanie dokowań związków do modelu receptora 5-HT₇,*

*Panu dr **Markowi Żylewskiemu** za wykonanie widm ¹H NMR otrzymanym związkom.*

Praca powstała przy częściowym wsparciu finansowym promotorskiego projektu badawczego MNiSW nr: N405 026 32/1743, pt. „Modyfikacje struktury arylopiperazynowych i arylosulfonamidowych ligandów receptorów serotoninowych 5-HT₇ w poszukiwaniu czynników determinujących selektywność oddziaływań względem podtypu 5-HT_{1A}”.

W pracy wykorzystano oprogramowanie SYBYL 7.0 (Tripos Inc.) i Discovery Studio Client v2.5.0.9164 (Accelrys Software Inc.) dostępne w ramach licencji krajowej (ICM, Warszawa).

Spis treści

Wykaz skrótów	9
1. Wprowadzenie	11
2. Część Teoretyczna	13
2.1. Wstęp.....	13
2.2. Receptory serotoninowe typu 5-HT _{1A} i 5-HT ₇ , ich funkcja i znaczenie terapeutyczne	16
2.3. Przegląd związków wykazujących powinowactwo do 5-HT ₇ R.....	19
2.3.1. Pochodne tryptaminy	19
2.3.2. Pochodne ergoliny	19
2.3.3. Trójcykliczne leki psychotropowe (neuroleptyki, przeciwdepresyjne)	20
2.3.4. Aporfiny.....	22
2.3.5. Pochodne 2-aminotetraliny i 3-aminochromanu	23
2.3.6. Pochodne piperydiny	24
2.3.7. Arylosulfonamidoalkiloaminy i arylosulfonoalkiloaminy	25
2.3.8. Długocząsteczkowe arylopiperydiny, arylopiiperazyny i β-karboliny	28
2.3.9. Pochodne diaminopirydiny, diaminopirymidyny i diaminotriazyny	34
2.3.10. Pochodne amidynomocznika.....	35
2.3.11. Proste arylopiiperazyny	36
2.3.12. Pochodne aminoetylopirolu i aminoetylopirazolu	37
2.3.13. Związki o zróżnicowanej strukturze	38
2.4. Hipotezy farmakoforowe 5-HT ₇ R.....	41
3. Badania własne.....	47
3.1. Pochodne pirolidyny	47
3.1.1. Wstęp.....	47
3.1.2. Synteza	47
3.1.3. Badania powinowactwa <i>in vitro</i>	49
3.1.4. Dyskusja wyników.....	49
3.1.5. Wnioski	51
3.2. Pochodne benzotriazolu	52
3.2.1. Wstęp.....	52
3.2.2. Synteza	52
3.2.3. Badania powinowactwa <i>in vitro</i>	53
3.2.4. Analiza konformacyjna i dyskusja wyników	54
3.2.5. Wnioski	57
3.3. Pochodne arylosulfonylopiperydiny.....	58
3.3.1. Wstęp – związki pilotowe.....	58
3.3.2. Analiza dokowania związków pilotowych do modelu receptora 5-HT ₇	60
3.3.3. Seria benzizoksazolopiperazyny	64
3.3.3.1. Synteza	64
3.3.3.2. Badania powinowactwa <i>in vitro</i> i dyskusja wyników	66
3.3.4. Seria perhydroizochinoliny	67
3.3.4.1. Synteza	68
3.3.4.2. Badania powinowactwa <i>in vitro</i> i dyskusja wyników	70
3.3.5. Modyfikacje terminalnego fragmentu aminowego.....	72
3.3.5.1. Synteza	72
3.3.5.2. Badania powinowactwa <i>in vitro</i> i omówienie wyników	73
3.3.6. Poszerzony profil receptorowy pochodnych arylosulfonylopiperydiny	75
3.3.6.1. Badania powinowactwa.....	75

Wykaz skrótów

5-HT	– 5-hydroksytryptamina, serotonina
5-HTR	– receptory serotoninowe
AR	– pierścień aromatyczny – cecha farmakoforowa
Arg	– arginina
Asp	– kwas asparaginowy
CoMFA	– Analiza porównawcza pól molekularnych (<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>)
DMF	– <i>N,N</i> -dimetyloformamid
EV	– obszary sterycznie zabronione (<i>Excluded Volumes</i>)
GPCR	– receptory sprzężone z białkami G (<i>G-Protein-Coupled Receptors</i>)
HBA	– akceptor wiązania wodorowego (<i>Hydrogen Bond Acceptor</i>) – cecha farmakoforowa
HTS	– badania przesiewowe (<i>High Throughput Screening</i>)
HYD	– region hydrofobowy – cecha farmakoforowa
Ile	– izoleucyna
LCAB	– długołańcuchowe pochodne β -karboliny (<i>Long Chain β-Carbolines</i>)
LCAP	– długołańcuchowe pochodne arylopiiperazyny (<i>Long Chain ArylPiperazines</i>)
Leu	– leucyna
OUN	– Ośrodkowy Układ Nerwowy
Phe	– fenyloalanina
PhP	– fenylopiiperazyna
PHIQ	– perhydroizochinolina
PI	– jon dodatni (<i>Positive Ion</i>) – cecha farmakoforowa
SAR	– zależność pomiędzy strukturą a aktywnością (<i>Structure-Activity Relationship</i>)
Ser	– seryna
THIQ	– 1,2,3,4-tetrahydroizochinolina
Thr	– treonina
TMH	– helisa transmembranowa (<i>Transmembrane Helix</i>)
Trp	– tryptofan
Tyr	– tyrozyna
ZChL	– Zakład Chemii Leków

1. WPROWADZENIE

Głównym celem prowadzonych przeze mnie badań było poszukiwanie strukturalnych uwarunkowań selektywności w grupie arylopiperazynowych i arylosulfonamidowych ligandów receptorów serotoninowych typu 5-HT_{1A} i 5-HT₇ z uwzględnieniem projektowania i syntezy nowych związków chemicznych, wykazujących selektywność oddziaływania – szczególnie w stosunku do receptora 5-HT₇.

Jednym z tematów badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Leków (ZChL) Instytutu Farmakologii PAN są ligandy różnych typów receptorów serotoninowych, m.in. z grupy długołańcuchowych pochodnych arylopiperazyny (LCAP – *Long Chain ArylPiperazine*). O ile zależności pomiędzy strukturą a aktywnością (SAR – *Structure-Activity Relationships*) tego typu połączeń do receptora 5-HT_{1A} (5-HT_{1AR}), jako przedmiot wieloletnich badań, zostały poznane i opisane w stopniu pozwalającym na precyzyjne projektowanie związków o pożądanej aktywności, to odpowiednia wiedza dotycząca wymogów receptora 5-HT₇ (5-HT_{7R}) jest znacznie mniej dostępna. Ponadto, w przypadku związków z klasy LCAP, które wykazują znamienne powinowactwo do 5-HT_{7R}, częstym zjawiskiem jest współwystępowanie aktywności do podtypu 5-HT_{1A}, co utrudnia wykorzystywanie takich substancji jako narzędzia w badaniach farmakologicznych. W tym kontekście, moje prace zostały skoncentrowane na badaniach elementów struktury ligandów 5-HT_{7R} determinujących selektywność oddziaływania względem 5-HT_{1AR}.

Pierwszy rozdział pracy doktorskiej zawiera krótkie omówienie ostatnich wyników badań ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇, które dały podstawę do wytyczenia kierunku badań w doktoracie.

W części teoretycznej, dla pełnego zrozumienia co wnoszą badania własne, zwięźle przedstawiłem znaczenie terapeutyczne ligandów receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇, a następnie w oparciu o dotychczas opublikowaną literaturę (artykuły i patenty) omówiłem grupy ligandów 5-HT_{7R}, ze szczególnym zwróceniem uwagi na selektywność wobec 5-HT_{1AR}. Na koniec, jako podsumowanie, przedstawiłem przegląd opublikowanych modeli farmakoforowych 5-HT_{7R}.

Drugą część pracy doktorskiej – „Badania własne”, rozpoczyna rozdział dotyczący nowych pochodnych piperolidonu (fleksyjnych i liniowo usztywnionych), które otrzymałem dla potwierdzenia hipotezy, że na selektywność oddziaływania pomiędzy receptorami 5-HT_{1A} i 5-HT₇ może wpływać konformacja alkilowego łącznika.

W kolejnym rozdziale przedstawiłem, zsyntetyzowane w ramach poszukiwania nieliniowej konformacji bioaktywnej ligandów 5-HT_{7R}, związki posiadające strukturę „zgiętą”, uzyskaną w wyniku usztywnienia trójmetylenowego łańcucha LCAP 1,3-dipodstawionym pierścieniem cykloheksanowym.

Następnie omówiłem serię pochodnych arylosulfonamidowych, częściowo usztywnionych fragmentem alkilopiperydynowym, które zostały zaprojektowane na podstawie struktur ligandów 5-HT₇R znanych z literatury.

Ostatni rozdział „Badań własnych” obejmuje rezultaty eksperymentów modelowania molekularnego nad hipotezami farmakoforowymi z wykorzystaniem wyników otrzymanych dla ostatniej grupy połączeń.

Najważniejsze wnioski jakie wyciągnąłem z przeprowadzonych badań zostały zebrane w krótkim podsumowaniu.

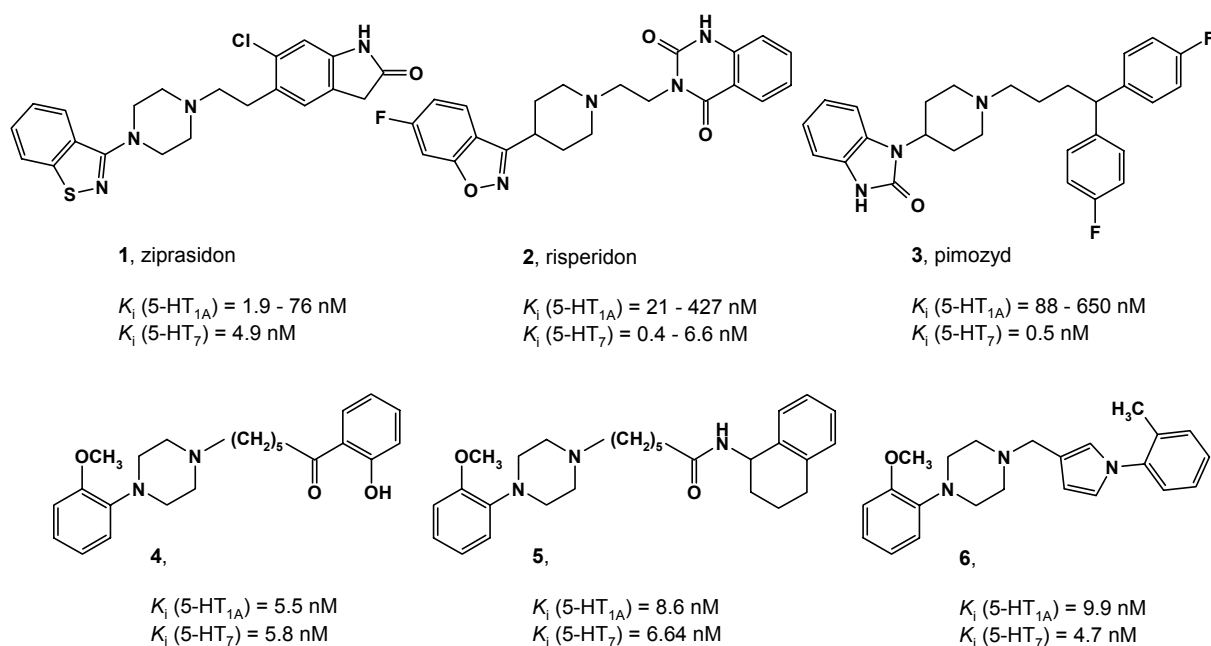
W części eksperymentalnej przedstawiłem metody syntezy wszystkich nowych związków, które otrzymałem w ramach pracy doktorskiej; metodykę badań modelowania molekularnego zastosowanych do konstrukcji modeli farmakoforowych oraz opis procedur testów biochemicznych wykonanych w ZChL dla oznaczenia powinowactwa nowych połączeń.

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Wstęp

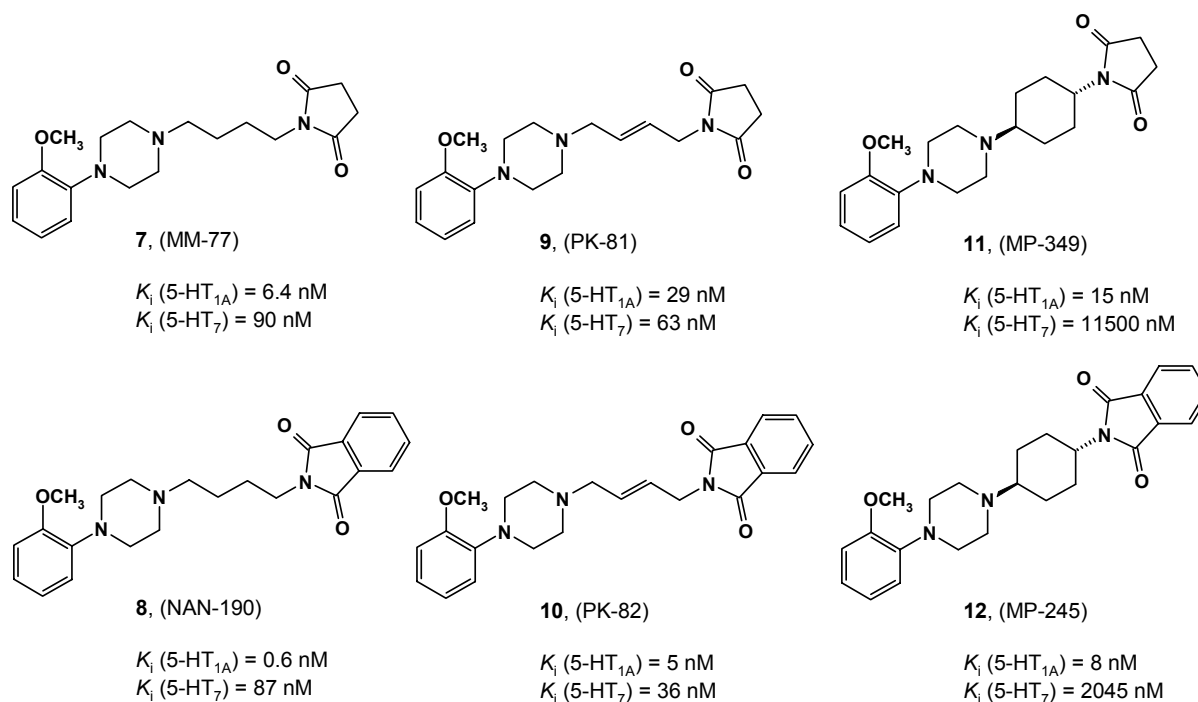
Badania nad ligandami receptorów serotoninowych (5-HT) prowadzone są w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN od wielu lat. Obejmują one modelowanie molekularne, projektowanie i syntezę oraz oznaczenia *in vitro* powinowactwa nowych substancji do różnych typów receptorów 5-HT. Chronologicznie, pierwsze prace z tego tematu były skoncentrowane na zagadnieniach zależności pomiędzy strukturą a aktywnością ligandów receptora 5-HT_{1A} i obejmowały głównie grupę tzw. długołańcuchowych pochodnych arylopiiperazyny (LCAP).

Ostatni spośród zidentyfikowanych do tej pory w rodzinie serotoninowej receptor 5-HT₇ został włączony do badań Zakładu w 2002 roku, a eksperymenty zorientowane na nowy cel biologiczny rozpoczęto od przeprowadzenia przesiewowych testów powinowactwa własnej biblioteki związków, składającej się w znacznej mierze z LCAP. Spodziewano się znaleźć interesujące substancje, ponieważ wkrótce po odkryciu tego receptora pojawiły się prace, w których opisano powinowactwo znanych nieselektywnych ligandów układu serotoninowego. Wśród związków wykazujących wysoką aktywność znalazły się, m.in. pochodne z grupy długołańcuchowych arylopiiperazyn i arylopiperydyn, takie jak ziprasidon (**1**), risperidon (**2**), czy pimozyd (**3**) (rys. 1). Ponadto opublikowane zostały również badania identyfikujące ligandy posiadające mieszany profil receptorowy 5-HT_{1A}/5-HT₇ (**4-6**, rys. 1).¹⁻³



Rysunek 1. Przykładowe związki posiadające mieszany profil receptorowy 5-HT_{1A}/5-HT₇.¹⁻⁴

Pierwsze wyniki otrzymane w naszym Zakładzie pokazały, że związek **7** (MM-77), uważany dotychczas za selektywny ligand receptora 5-HT_{1A}, charakteryzujący się aktywnością przeciwlękową w testach na zwierzętach,⁵ wykazywał równoczesne, znaczące powinowactwo do receptora 5-HT₇.⁶ Natomiast pochodna **11** (MP-349),⁷ będąca jego usztywnionym strukturalnie analogiem (poprzez wprowadzenie 1e,4e-cykloheksanowego pierścienia w miejsce giętkiego łącznika tetrametylenowego), nie wiązała się do tego receptora.⁶ Analogiczne wyniki otrzymano dla pary **8** i **12**, czyli dla związku NAN-190 (znany postsynaptyczny antagonist receptoru 5-HT_{1A})⁸ i jego „sztywnego” analogu MP-245, co wskazywało na istnienie różnicy w geometrii miejsc wiążących podtypów 5-HT_{1A} i 5-HT₇.⁹ Podczas gdy dla tych pierwszych, konformacje liniowo rozciągnięte zdefiniowano jako bioaktywne, to w przypadku receptora 5-HT₇ należało sądzić, iż preferowane powinny być konformacje zgięte. Przypuszczenie to wstępnie zweryfikowano, wykazując, że wymiana łańcucha tetrametylenowego na łącznik *trans*-2-butenowy [związki **9** (PK-81) i **10** (PK-82)] powoduje wzrost powinowactwa do receptorów 5-HT₇ przy jednoczesnym obniżeniu wiązania do podtypu 5-HT_{1A}.⁶



Rysunek 2. Wybrane ligandy receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ zbadane w ZChL.^{6,9}

Powyższe rezultaty stanowią punkt wyjścia dla badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. W pierwszej kolejności zaplanowano potwierdzenie wysuniętej hipotezy, że selektywność 5-HT_{1A}/5-HT₇ może być uwarunkowana konformacją alkilowego łącznika w LCAP. Następnie poszukiwano optymalnego ułożenia grup farmakoforowych dla

silnego i selektywnego oddziaływania z receptorem 5-HT₇. W rezultacie zaprojektowano i zsyntezowano szereg nowych połączeń o zmodyfikowanych strukturalnie grupach farmakoforowych z uwzględnieniem wiedzy wpływającej z dotychczas opublikowanych w literaturze światowej badań SAR, dotyczących selektywnych ligandów 5-HT₇R.

2.2. Receptory serotoninowe typu 5-HT_{1A} i 5-HT₇, ich funkcja i znaczenie terapeutyczne

Zaburzenia w przekaźnictwie serotonergicznym są źródłem wielu schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN), dlatego od wielu lat szereg ośrodków badawczych na świecie prowadzi poszukiwania leków zdolnych przywrócić fizjologiczny stan równowagi 5-HT w mózgu. Do tej pory zidentyfikowano wiele związków chemicznych silnie działających na receptory tego neuroprzekaźnika. Obecnie jako leki stosuje się takie substancje, jak buspiron (lek przeciwłękowy), trazodon i nefazodon (leki przeciwdepresyjne) oraz aripiprazol (atypowy neuroleptyk), a wiele innych jest na etapie badań klinicznych.¹⁰

Do rodziny receptorów serotoninowych zalicza się 15 odrębnych populacji białek wiążących, podzielonych na 7 typów głównych. Klasyfikację rozpoczyna najlepiej poznany podtyp 5-HT_{1A}, a zamyka zidentyfikowany jako ostatni – 5-HT₇. Z wyjątkiem receptora 5-HT₃ (kanał jonowy) – wszystkie pozostałe podtypy (14) należą do tzw. rodziny GPCR, czyli receptorów związanych z białkiem G (*G-Protein Coupled Receptors*).¹¹ Porównanie całościowej sekwencji aminokwasów wszystkich receptorów 5-HT wskazuje, że podobieństwo pomiędzy poszczególnymi białkami jest największe dla podtypów danego receptora (najlepszy wynik dla 5-HT_{5AR} i 5-HT_{5BR} charakteryzuje 75% zgodności), natomiast główne typy nie osiągają 50% homologii. Jak wynika z przedstawionego poniżej zestawienia, podobieństwo w całościowej sekwencji aminokwasów pomiędzy receptorami 5-HT_{1A} i 5-HT₇ jest jednym z najwyższych i sięga 49%.¹¹

Podtyp	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{1D}	5-HT _{1E}	5-HT _{1F}	5-HT _{2A}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	5-HT ₃	5-HT ₄	5-HT _{5A}	r5-HT _{5B}	5-HT ₆	5-HT ₇
5-HT _{1A}	100	53	52	49	53	42	42	45	14	36	48	49	43	49
5-HT _{1B}	43	100	71	56	60	43	39	38	27	39	43	42	39	46
5-HT _{1D}	43	63	100	58	57	41	40	42	44	40	45	43	41	46
5-HT _{1E}	40	48	48	100	66	45	40	43	30	41	46	47	40	48
5-HT _{1F}	42	49	48	57	100	46	42	44	29	44	48	46	42	48
5-HT _{2A}	30	30	29	34	32	100	52	57	0	36	36	35	36	38
5-HT _{2B}	34	27	27	30	29	45	100	53	29	37	37	37	36	37
5-HT _{2C}	32	28	30	32	32	51	42	100	18	39	40	36	37	37
5-HT ₃	14	22	22	10	14	0	18	16	100	21	32	22	29	0
5-HT ₄	29	32	31	32	34	28	29	28	21	100	42	38	35	42
5-HT _{5A}	36	35	34	35	37	27	26	31	22	32	100	75	38	42
r5-HT _{5B}	39	34	33	35	36	27	29	29	22	30	70	100	38	44
5-HT ₆	34	31	32	32	32	27	27	27	24	27	30	31	100	40
5-HT ₇	38	37	38	39	38	28	28	28	0	32	33	34	33	100

Rysunek 3. Homologia 5-HT_{7A}R z innymi receptorami serotoninowymi. Podobieństwo (powyżej przekątnej) – identyczne lub podobne aminokwasy. Homologia (poniżej przekątnej) – tylko identyczne aminokwasy.^{11, 12}

Receptor 5-HT_{1A} został odkryty na początku lat 80.^{13,14} i wiedza na jego temat rozwijała się bardzo szybko dzięki wcześnie zidentyfikowanemu selektywnemu agoniście, 8-OH-DPAT,¹⁵ który – jak się znacznie później okazało – jest również agonistą 5-HT_{7R}.¹⁶ Już w początkowym okresie wykazano przeciwlękowe i antydepresyjne własności ligandów 5-HT_{1A}R.¹⁷⁻¹⁹ Jednym z pierwszych związków badanych w tym kierunku był buspiron (należący do klasy LCAP), który po upływie niespełna dekady został wprowadzony do leczenia jako nowy lek przeciwlękowy. Dzięki niemu wzrosło zainteresowanie 5-HT_{1A}R i jego rolą w leczeniu zaburzeń lękowych, ponieważ w przeciwieństwie do benzodiazepin, lek ten nie wykazywał takich efektów ubocznych jak sedacja, zwiotczenie mięśni czy interakcje z alkoholem.²⁰ Obecnie kilka innych pirymidylopiperazyn, tj.: gepiron, ipsapiron, tandospiron i zalospiron, jest testowanych klinicznie jako potencjalne leki przeciwlękowe i przeciwdepresyjne.²⁰

Ogromna ilość badań farmakologicznych poświęcona ligandom 5-HT_{1A}R pozwoliła na ustalenie, że poza wyżej wspomnianymi własnościami wykazują one wpływ, m.in. na rozwój połączeń nerwowych, chronią pobudzone komórki nerwowe przed degeneracją i apoptozą, uczestniczą w regulacji ciśnienia krwi, pobierania pokarmu, temperatury, konsolidacji pamięci. Ponadto, przedstawiono dowody na rolę 5-HT_{1A}R w poważnych chorobach neurologicznych, jak schizofrenia, zespół Touretta, choroba Huntingtona.²¹

Badania najmłodszego członka rodziny receptorów serotoninowych – 5-HT_{7R} – chociaż intensywnie rozwijane w wielu ośrodkach naukowych, nie są jeszcze na tak zaawansowanym etapie jak w przypadku 5-HT_{1A}R. Przez wiele lat brak specyficznie działających związków narzędziowych hamował postęp wiedzy o funkcji receptorów 5-HT₇ w OUN, a testy farmakologiczne prowadzono, używając nioselektywnych substancji w obecności tzw. czynników maskujących. Zidentyfikowane w ostatnich latach nowe ligandy o polepszonej selektywności, takie jak SB-269970 (**64**, rys. 10), znacznie usprawniły dalsze badania.¹⁶

Dotychczas opublikowane wyniki dostarczyły wstępnych dowodów na powiązanie 5-HT_{7R} z depresją, lękiem, zaburzeniami nastroju,^{12,22-24} migreną,^{25,26} nauką i pamięcią,^{27,28} nocycępcją,^{29,30} regulacją rytmów okołodobowych,³¹⁻³³ epilepsją,³⁴⁻³⁷ termoregulacją,³⁸⁻⁴¹ aktywnością motoryczną układu pokarmowego,^{42,43} odruchami sercowo-naczyniowymi,^{44,45} stanami zapalnymi,⁴⁶⁻⁴⁹ procesami wydzielania hormonu luteinizującego (LH)⁵⁰ (tab. 1).

Porównując własności receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ (tab. 1), można zauważyć, że chociaż wykazują one zróżnicowanie w sposobie aktywacji, ich lokalizacja w mózgu częściowo się pokrywa. Świadczy to o ich funkcjonalnym powiązaniu w OUN oraz o podobnym działaniu terapeutycznym ligandów (lęk, depresja, pamięć, termoregulacja).

Ponadto jak już wcześniej wspomniano, istnieje wiele „wspólnych ligandów”, m.in. z grupy LACP i arylopiperydyn, jak ziprasidon (**1**), risperidon (**2**), pimozyd (**3**), co z kolei wskazuje na analogie w obrębie kieszeni wiążących obu tych receptorów.

Tabela 1. Porównanie własności receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇.^{11, 21, 51, 52}

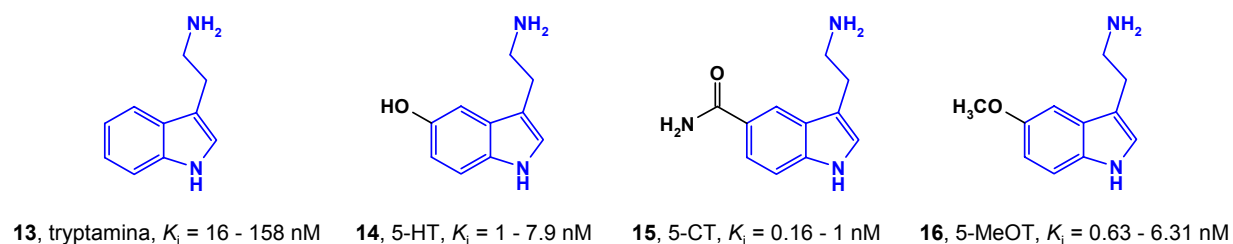
Cecha	5-HT _{1A} R	5-HT ₇ R
Lokalizacja na chromosomie	5q11.2-q13	10q23.3-q24.4
Ilość aminokwasów (receptory h – człowieka, m – myszy, r – szczura)	5-HT _{1A} : h421, m421, r422	5-HT _{7a} : h445, m448, r448 5-HT _{7b} : h432, r435 5-HT _{7c} : r470 5-HT _{7d} : h479
Dystrybucja w OUN	struktury limbiczne (hipokamp, przegroda boczna), korowe (kora zakrętu obręczy i śródwęchowa), jądra szwu (grzbietowe i pośrodkowe), jądra podstawne i mózdzek	wzgórze, podwzgórze, niektóre rejony kory, hipokamp, jądra, nadskrzyżowaniowe podwzgórze, prążkowie, pień mózgu, opuszka węchowa, guzek węchowy, jądro ogoniaste i mózdzek
Dystrybucja poza OUN	tkanki limfoidalne, jelita, nerki, mięśnie	tkanki limfoidalne, jelita, nerki, mięśnie gładkie naczyń krwionośnych, żołądek, nadnercza, serce
Lokalizacja na neuronach	pre- i postsynaptyczna	postsynaptyczna
Sposób i efekt aktywacji	sprzężony ujemnie z cyklazą adenylową przez białko Gi/Go (zmniejszenie poziomu komórkowego cAMP)	sprzężony pozytywnie z cyklazą adenylową przez białko G _s (zwiększenie poziomu komórkowego cAMP)
Radioligandy	[³ H]-8-OH-DPAT, [³ H]-WAY100635	[¹²⁵ I]-LSD, [³ H]-SB 269970, [³ H]-5-CT, [³ H]-5-HT
Potencjalne i potwierdzone terapeutyczne zastosowanie	depresja, lęk i stres, rozwój połączeń nerwowych, ochrona pobudzonych komórek nerwowych przed degeneracją i apoptozą, schizofrenia, regulacja ciśnienia krwi, pobierania pokarmu, temperatury, konsolidacja pamięci, zespół Touretta, choroba Huntingtona ²¹	depresja, lęk, zaburzenia nastroju, ^{12, 22-24} rytmy okołodobowe, ³¹⁻³³ epilepsja, ³⁴⁻³⁷ termoregulacja, ³⁸⁻⁴¹ schizofrenia, ⁵³ migrena, ^{25, 26} wydzielanie hormonu LH, ⁵⁰ stany zapalne, ⁴⁶⁻⁴⁹ nocycepcja, ^{29, 30} nauka i pamięć, ^{27, 28} odruchy sercowo-naczyniowe, ^{44, 45} aktywność motoryczna układu pokarmowego, ^{42, 43} zaburzenia układu moczowego ⁵⁴⁻⁵⁶

2.3. Przegląd związków wykazujących powinowactwo do 5-HT₇R

2.3.1. Pochodne tryptaminy

Wkrótce po odkryciu 5-HT₇R rozpoczęto intensywne poszukiwania związków wykazujących aktywność w stosunku do tego typu receptora. Pochodne tryptaminy (**13**) zostały zbadane jako jedne z pierwszych, potwierdzając przypuszczenia, że część z tych nieselektywnych ligandów posiada własności agonistyczne względem 5-HT₇R.⁵⁷ Początkowo, właśnie wysokoaktywne pochodne tryptaminy, tj.: 5-HT (**14**), 5-CT (**15**), 5-MeOT (**16**) stosowane jako związki narzędziowe, odgrywały ważną rolę w zdobywaniu wiedzy o tym receptorze.

Generalnie, w tej grupie połączeń najwyższe powinowactwo wykazywały związki, które cechowała obecność akceptora wiązania wodorowego w pozycji C-5 układu indolu oraz brak podstawnika w pozycji C-2 (**14–16**).

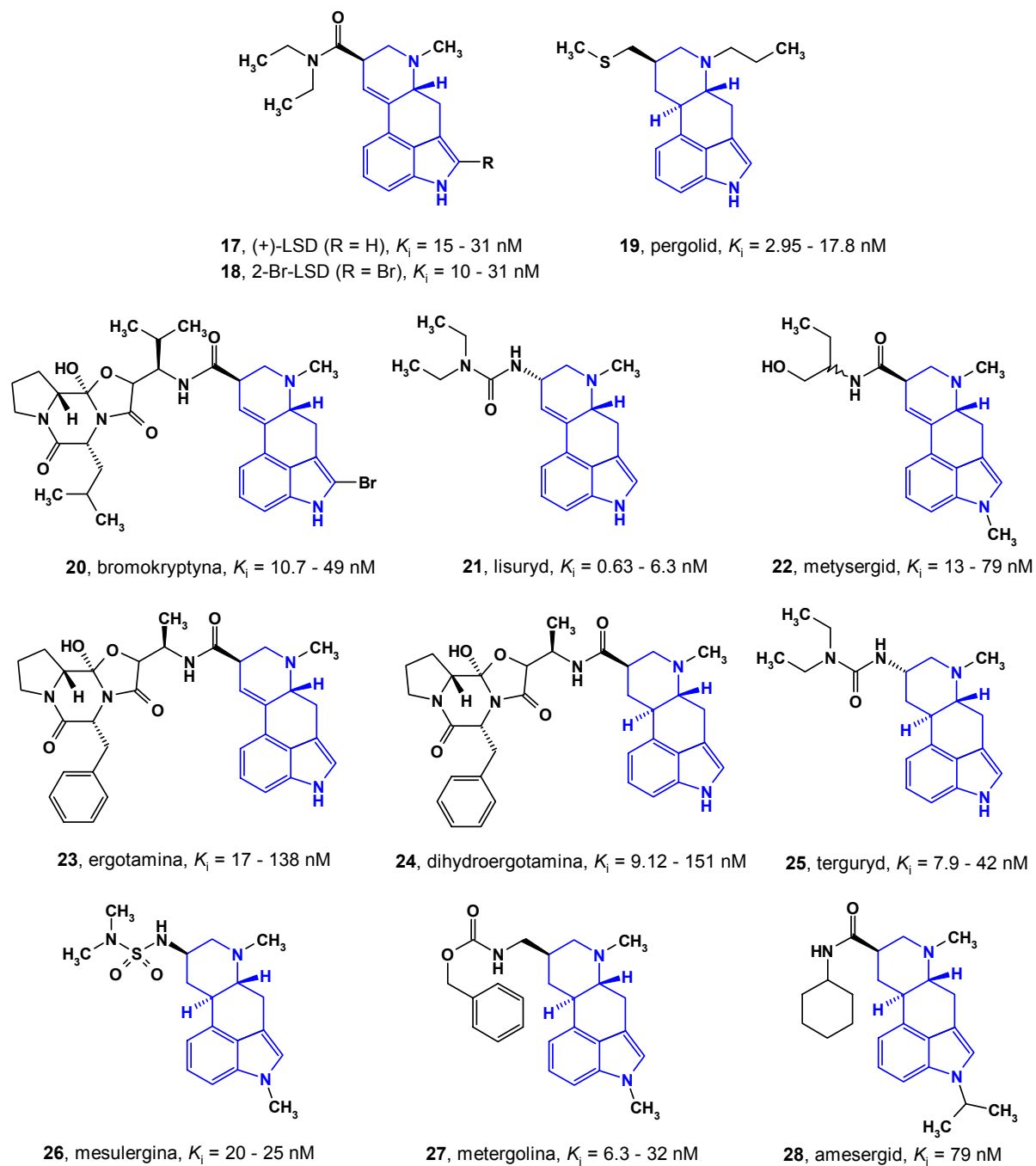


Rysunek 4. Pochodne tryptaminy.¹⁶

2.3.2. Pochodne ergoliny

Do najwcześniej poznanych, nieselektywnych antagonistów 5-HT₇R należy obszerna grupa pochodnych ergoliny. Niektóre z nich pojawiły się w lecznictwie, zanim odkryto 5-HT₇R, np.: lisuryd (**21**) – agonista receptorów dopaminergicznych D₂ stosowany w leczeniu choroby Parkinsona, czy dihydroergotamina (**24**) używana jako lek w profilaktycznym leczeniu migreny.¹⁰

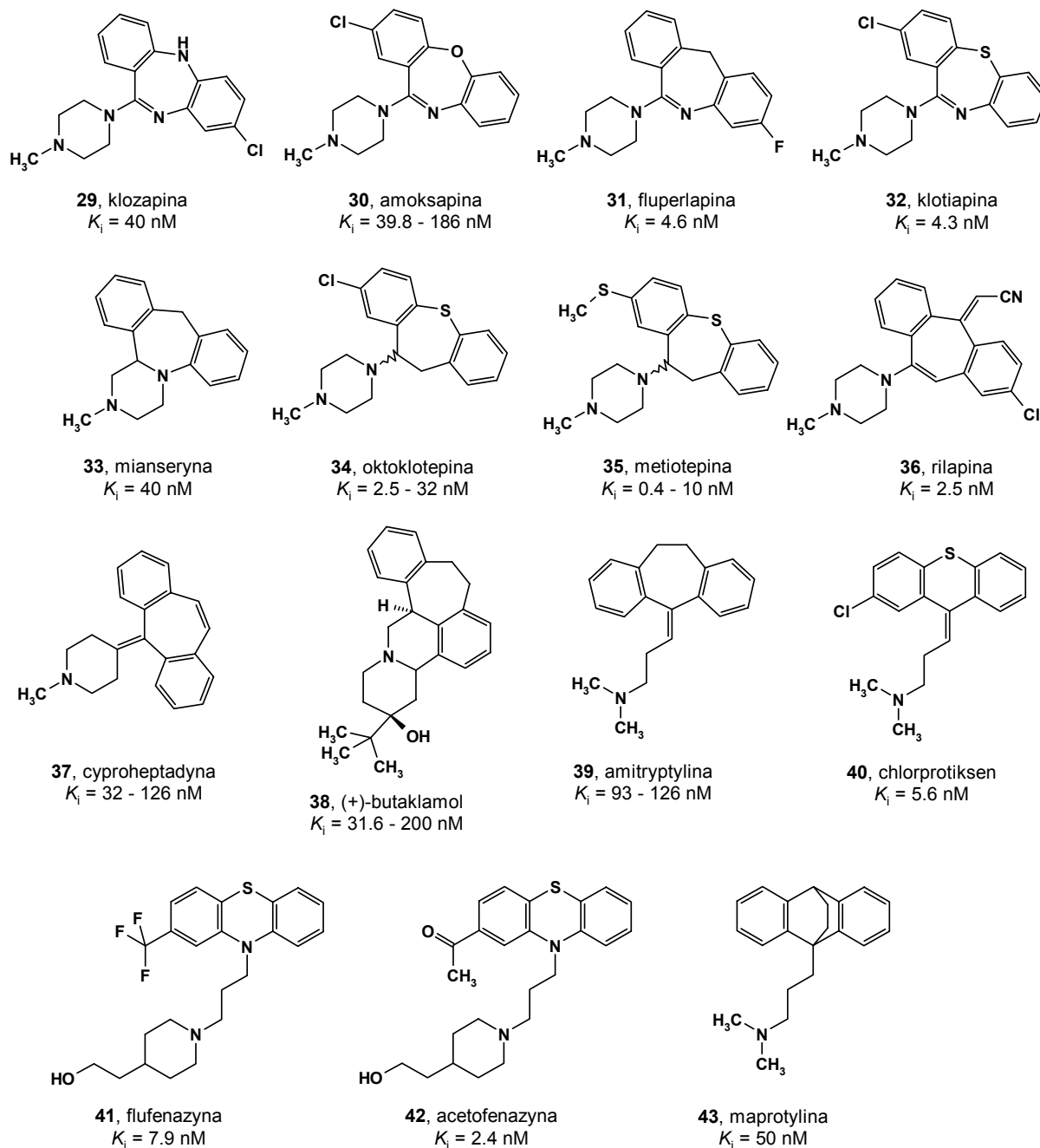
Analizując struktury pochodnych ergoliny (**17–28**) o wysokim powinowactwo do 5-HT₇R, można zauważyć, że ani stereochemia szkieletu ergoliny, ani rozbudowane podstawniki w sześciowęglowym pierścieniu heterocyklicznym nie wpływają zasadniczo na poziom ich aktywności. Mimo że większość tych połączeń jest antagonistami 5-HT₇R, zaobserwowano, że w przypadku (+)-LSD (**17**) w badaniach farmakologicznych wykazywał on charakterystyczną dla agonistów stymulację tworzenia cAMP.⁵⁸

Rysunek 5. Pochodne ergoliny.^{16,4}

2.3.3. Trójcykliczne leki psychotropowe (neuroleptyki, przeciwdepresyjne)

Znaczną grupę nieselektywnych antagonistów 5-HT₇R tworzą związki, których szkielet opiera się na trzech skondensowanych pierścieniach. Część z nich to typowe i atypowe neuroleptyki będące pochodnymi dibenzoazepiny (**29–33**), dibenzotiepiny (**34, 35**), dibenzocykloheptatrienu (**36, 37**), dibenzocykloheptadienu (**38, 39**), tioksantenu (**40**), fenotiazyny (**41, 42**) i dibenzocykloheksadienu (**43**). Wspólną cechą tych związków jest nieplanarność układu trzech pierścieni cząsteczki. Ponadto, odległość między zasadowym

atomem azotu piperazyny lub piperydyny i szkieletem aromatycznym w większości przypadków odpowiada długości trójmetylenowego łańcucha alkilowego. Można też zauważyć, że obecność elektronoakceptorowych podstawników (Cl, F) w aromatycznych pierścieniach trójcyklicznego szkieletu cząsteczki wpływa korzystnie na aktywność do 5-HT₇R. Kilka z nich, jak metiopetyna (**35**) czy cyproheptadyna (**37**) cechuje znaczne powinowactwo również do 5-HT_{1A}R.⁴

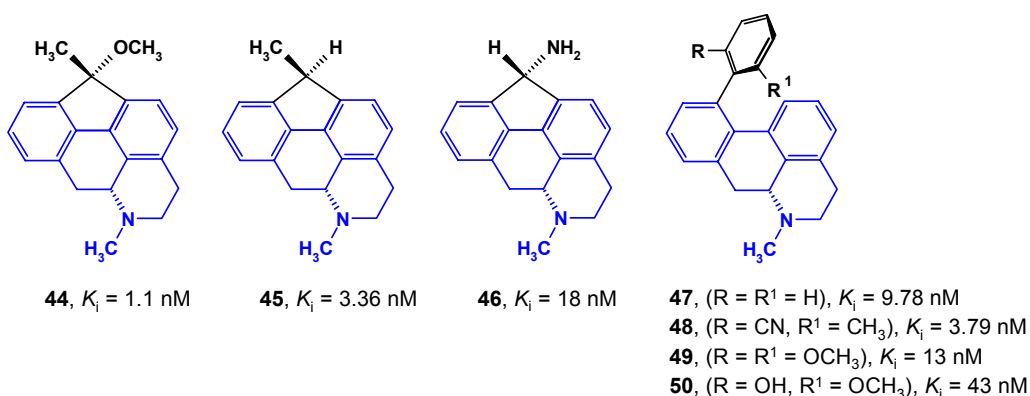


Rysunek 6. Trójcykliczne leki psychotropowe.^{4, 16, 59}

2.3.4. Aporfiny

Pochodne aporfiny to grupa znanych ligandów receptorów dopaminowych, wśród których znajdują się również połączenia wykazujące powinowactwo do receptorów serotoninowych.^{60,61} Badania SAR prowadzone na Uniwersytecie w Uppsali pokazały, że wskutek wprowadzenia w pozycję C-11 układu aporfiny sterycznego podstawnika następowało przesunięcie selektywności z receptorów dopaminowych na serotoninowe.⁶² W serii pochodnych (*R*)-1,11-metylenoporfiny modyfikacje w zakresie typu podstawnika, jak i stereochemii miejsca jego podstawienia, doprowadziły do uzyskania ligandów (np. **44**, **45**) o zróżnicowanym profilu receptorowym 5-HT₇/5-HT_{1A}/D_{2A}. Wśród otrzymanych związków najwyższą selektywność do 5-HT₇R posiadał związek **46**, który jednocześnie wykazywał umiarkowane powinowactwo do 5-HT_{1A}R. Interesujący jest fakt, że ligand **47** z niepodstawioną grupą fenylową w pozycji C-11 układu aporfiny charakteryzował się mieszanym profilem receptorowym 5-HT₇/5-HT_{1A},⁶² zaś jego analogi z podstawnikami w grupie fenylovej **48–50** wykazywały wysokie powinowactwo tylko do 5-HT₇R.⁶³ Zahamowana swobodna rotacja grupy fenylovej powodowała, że stabilne atropoizomery pochodnych **48** i **50** cechowała farmakologiczna stereoselektywność, tj. wyższą selektywność do 5-HT₇R posiadały izomery o konformacji 6*aR*,*aR*.⁶³

Sztywna struktura pochodnych aporfiny oraz zróżnicowanie zarówno pod względem selektywności, jak i aktywności wewnętrznej (agoniści i antagoniści 5-HT₇R) sprawiają, że tego typu związki były wykorzystywane jako narzędzia w badaniach modelowania molekularnego.^{64–66}



Rysunek 7. Aporfiny.^{16, 63, 67, 68}

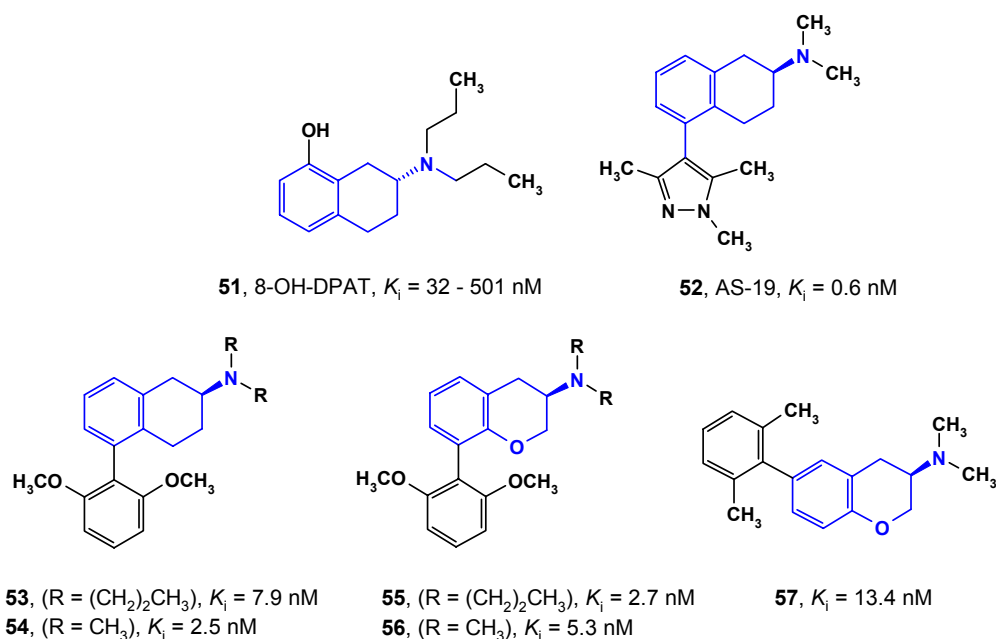
2.3.5. Pochodne 2-aminotetraliny i 3-aminochromanu

Ligandy tej grupy cechuje zróżnicowany profil aktywności wewnętrznej oraz selektywności. Pod względem budowy chemicznej można je uznać za fleksyjne analogi aporfin (rys. 7). Jedną ze znanych od dawna 2-aminotetralin jest 8-OH-DPAT (**51**), która jak już wspomniano uważana była za selektywnego agonistę 5-HT_{1A}R, a dopiero w późniejszych badaniach odkryto, że jest ona jednocześnie częściowym agonistą 5-HT₇R.^{69, 70}

Pochodne (S)-dimetyloaminotetraliny zostały opublikowane jako nowa klasa ligandów 5-HT₇R w 2002 roku.⁷¹ Intensywne badania wyłoniły kilka ligandów wykazujących bardzo wysokie – porównywalne do 5-CT – powinowactwo do 5-HT₇R (rys. 8) oraz umiarkowaną selektywność względem 5-HT_{1A}R. Związki te, podobnie jak pochodne tryptofanu, nie posiadają akceptora wiązania wodorowego w układzie skondensowanych pierścieni i można przypuszczać, że brak ten jest rekompensowany wpływem podstawnika aryłowego. Co ciekawe, niewielkie modyfikacje w obrębie tego fragmentu zmieniają aktywność związku od pełnego agonisty do antagonisty.⁷²

W 2008 roku zostało opublikowane zgłoszenie patentowe Laboratorios Del Dr. Esteve S.A. dotyczące zastosowania agonisty z tej grupy połączeń, związku AS-19 (**52**) w terapii bólu.⁷³ Dalsze badania *in vivo* wykazały, że AS-19 usprawniał konsolidację pamięci i odwracał amnezję wywołaną skopolaminą i dizocylpiną. Obecnie związek ten znajduje się w ofercie handlowej firmy Tocris Bioscience.

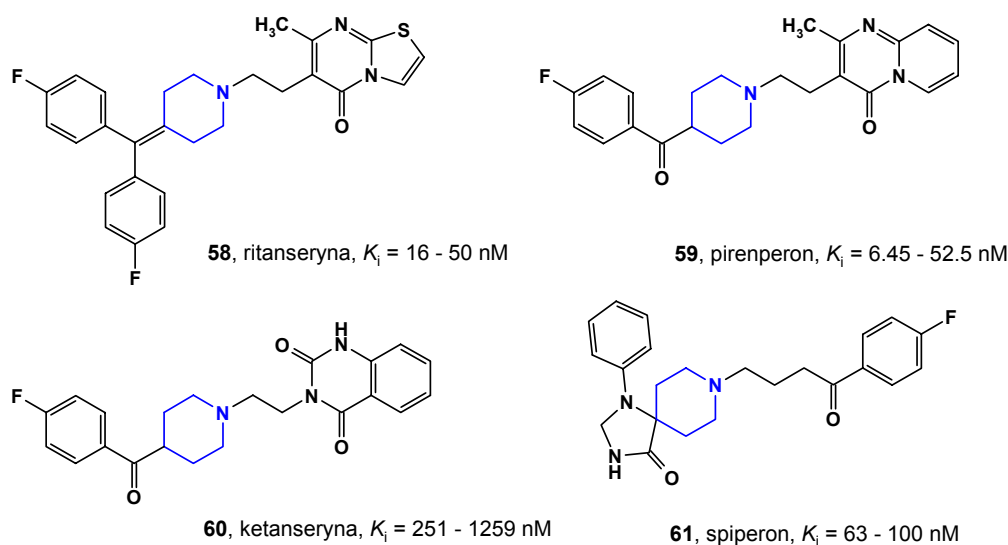
Grupa pochodnych 2-aminotetraliny i 3-aminochromanu (**53–56**), badana przez Holmberga i wsp., to związki różnorodne pod względem aktywności wewnętrznej i selektywności.^{72, 74} Struktury z podstawnikami 2,6-dimetoksyłowymi w pierścieniu aryłowym wykazywały wyższą selektywność do 5-HT₇R. Skrócenie długości podstawników *N*-alkilowych z propylowego do metylowego (rys. 8) powodowało również wzrost selektywności, i co ciekawe, także zmianę aktywności wewnętrznej [pełny agonista (**53**, **55**) → antagonistą lub częściowy agonista (**54**, **56**)]. Sugeruje to, że obecność podstawnika propylowego w kieszeni wiążącej receptora może być konieczna do aktywacji. Ponadto oddziaływanie tych ligandów z 5-HT₇R charakteryzowało się stereospecyficznością: pochodne (*R*)-chromanu (**55**) były bardziej preferowane niż ich stereoizomery (*S*) ($K_i = 364$ nM dla izomeru *S* związku **55**). W serii 6-aryłopodstawionych pochodnych 3-aminochromanu, najwyższą aktywność wykazywał związek **57** z podstawnikiem 2,6-dimetylofenyłowym – nieselektywny względem 5-HT_{1A}R – częściowy agonista 5-HT₇R. Natomiast jego analog bez grup metylowych był całkowicie pozbawiony powinowactwa do 5-HT₇R ($K_i > 1000$ nM).⁷⁴



Rysunek 8. Pochodne 2-aminotetraliny i 2-aminochromanu.^{16, 72-74}

2.3.6. Pochodne piperydyny

Kolejną grupę nieselektywnych antagonistów tworzą związki o różnorodnej, fleksyjnej strukturze (grupy farmakoforowe są połączone 2–4 metylenowym łańcuchem). Wśród nich znajdują się znane ligandy i leki będące antagonistami 5-HT₂R, jak np.: ritanseryna o działaniu przeciwdepresyjnym i przeciwłękowym, czy spiperon – stosowany w leczeniu schizofrenii (rys. 9).¹⁶ Wysokość oznaczonego dla tych połączeń powinowactwa do 5-HT₇R jest zróżnicowana, od najsłabszych ligandów, jak ketanseryna (**60**) – do obdarzonych znaczną aktywnością, np. pirenperon (**59**) lub ritanseryna (**58**). Ligandy **58** i **59** charakteryzują się również znaczną selektywnością wobec 5-HT_{1A}R.



Rysunek 9. Pochodne piperydyny.^{16,4}

2.3.7. Arylosulfonamidoalkiloaminy i arylosulfonoalkiloaminy

To obszerna i intensywnie badana klasa ligandów, obejmująca pierwsze, selektywne ligandy 5-HT₇R. W badaniach funkcjonalnych związki tej grupy wykazywały najczęściej efekt hamujący aktywność receptora. Zsyntezowana w ramach niniejszej pracy seria pochodnych arylosulfonamidowych (rozd. 3.3) została zaprojektowana między innymi z wykorzystaniem opublikowanych wyników analiz SAR dotyczących tej grupy ligandów.

Pierwszego selektywnego antagonistę 5-HT₇R (**62**) zidentyfikowano w 1997 r. w badaniach przesiewowych (HTS – *High Throughput Screening*) biblioteki związków GlaxoSmithKline.^{75,76} Uzyskana tą drogą „struktura wiodąca”, po licznych modyfikacjach, stała się prekursorem klasy selektywnych ligandów 5-HT₇R. W badaniach funkcjonalnych związki o najwyższym powinowactwie: SB-258719 (**63**) i SB-269970 (**64**) wykazywały aktywność antagonistyczną.⁷⁷⁻⁷⁹ Jednakże późniejsze eksperymenty, w których zastosowano linie komórkowe z ekspresją ludzkiego 5-HT₇R pokazały, że wykazują one cechy odwrotnych agonistów.⁸⁰ Oba połączenia znajdują się obecnie w ofercie handlowej firmy Tocris Bioscience. Mimo wysokiej selektywności do 5-HT₇R, wyznaczony dla SB-269970 (**64**) w testach *in vivo* bardzo krótki okres półtrwania znacznie ograniczał jego zastosowanie, tak w badaniach na zwierzętach, jak i jako potencjalnego leku. Dlatego też w celu poprawienia profilu farmakokinetycznego przeprowadzono szereg dalszych modyfikacji strukturalnych, uzyskując m.in. kilka obiecujących związków, jak SB-258741 (**65**) czy SB-656104 (**66**).⁸¹

Pojawienie się nowych, selektywnych ligandów zainicjowało szybki rozwój tej klasy ligandów, czego dowodzą liczne publikacje i patenty. W 2004 r. Vermeulen i wsp. opublikowali badania nowych arylosulfonamidowych pochodnych 2-metoksyfenylopiperyliny i 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (THIQ), zachowujących się w testach farmakologicznych jak odwrotni agoniści.⁶⁵ Wśród tych połączeń *N*-etylo-podstawione sulfonamidy (**68–70**) okazały się szczególnie aktywnymi związkami. Na podstawie tej serii został opracowany model farmakoforowy dla odwrotnych agonistów 5-HT₇R (omówiony w rozdz. 2.4).⁶⁵

Obszerna grupa pochodnych THIQ o podobnej strukturze została przedstawiona w 4 patentach Jover i wsp. jako antagoniści 5-HT₇R.⁸²⁻⁸⁴ Chociaż w pierwszych trzech zgłoszeniach pokazano struktury ponad 400 związków, dane dotyczące powinowactwa do 5-HT₇R ujawniono tylko dla kilkunastu ligandów, wśród których najniższą wartość IC₅₀ wykazywał związek **72**. Generalnie, najwyższe powinowactwo posiadały związki z czterowęglowym łańcuchem metylenowym łączącym THIQ z ugrupowaniem sulfonamidowym (**71**, **72**). Czwarty wniosek patentowy obejmował 78 związków.⁸⁵ Wartości IC₅₀ do 5-HT₇R ujawniono tylko dla ośmiu pochodnych z łącznikiem 4-metyleno-1-piperydylowym. W tej krótkiej serii najwyższe powinowactwo do 5-HT₇R cechowało związki

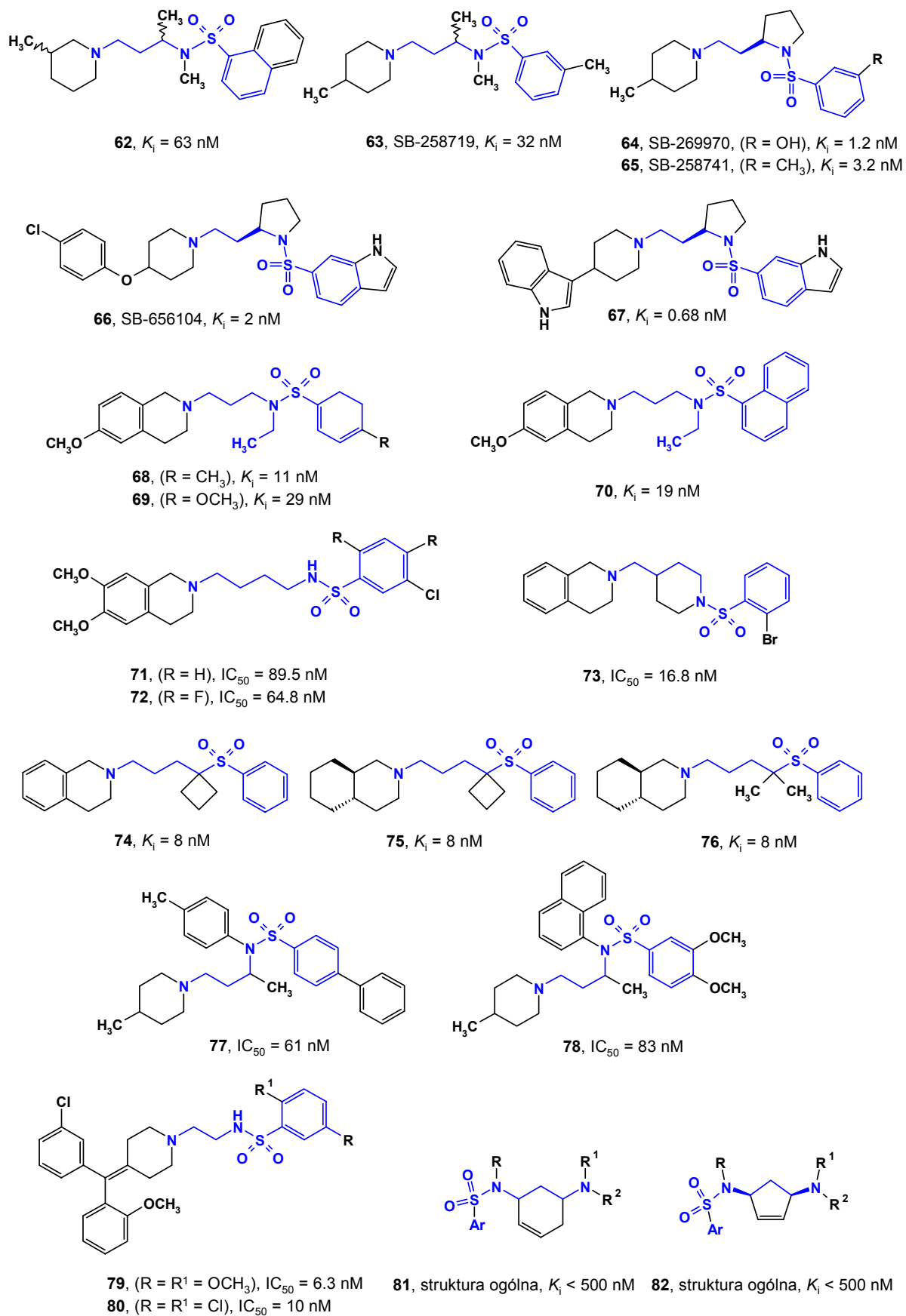
73. Selektywność patentowanych związków testowano względem bardzo szerokiego spektrum celów biologicznych, jak różne receptory, kanały jonowe i transportery neuroprzekaźników.

Jedno ze zgłoszeń patentowych firmy Merck & Co. z 2006 r. dotyczy odkrycia nowych arylosulfonoalkilamin, wykazujących powinowactwo do 5-HT₇R i ich zastosowania w leczeniu i/lub zapobieganiu zaburzeniom OUN.⁸⁶ Opisane pochodne charakteryzowała porównywalnie wysoka aktywność i selektywność względem innych receptorów, przy czym dane o powinowactwie i selektywności zostały opublikowane dwa lata później.⁸⁷ Badania SAR serii pochodnych cyklobutyli wykazały, że obecność aromatycznego fragmentu (grupa fenylova, THIQ) w pobliżu zasadowego atomu azotu powodowała znaczny wzrost powinowactwa (**74**, **111–114**), przy obniżeniu selektywności. W ramach dalszej optymalizacji struktury (głównie celem zwiększenia selektywności) trafnym posunięciem okazało się zastąpienie fragmentu THIQ niearomatyczną (4a*S*,8a*S*)-dekahydroizochinoliną (**75**) oraz otworzenie pierścienia cyklobutylowego (**76**). Wszystkie testowane ligandy wykazywały cechy antagonistów 5-HT₇R z wyjątkiem związku **76**, który był częściowym agonistą.⁸⁷

Seria antagonistów (np.: **77**, **78**) – analogów SB-258719 (**63**), została opublikowana w 2006 r. przez grupę Lattmann i wsp., a rok wcześniej była przedmiotem zgłoszenia patentowego jako ligandy 5-HT₇R o potencjalnym zastosowaniu w depresji.^{22,88} Wstępne badania przesiewowe pozwoliły zidentyfikować związki, które wykazywały znaczne powinowactwo do 5-HT₇R. Najlepsze wyniki otrzymano, gdy grupa metylowa w SB-258719 (**63**) została zastąpiona ugrupowaniem aromatycznym. Związki **77** i **78** wykazywały działanie antydepresyjne w modelach zwierzęcych choroby.²²

Interesująca grupa ligandów z fragmentem 4-benzylidenopiperidynowym (analogi ritanseryny **58**) została opatentowana przez firmę Ajinomoto Co. Wśród przedstawionych ponad 60 struktur powinowactwo do 5-HT₇R ujawniono dla 20 związków. Najwyższą aktywność zaobserwowano dla arylosulfonamidowych pochodnych **78** i **80** z podstawnikami: 2-OCH₃ i 3-Cl w grupach fenylowych. Niestety, dane dotyczące selektywności oraz aktywności wewnętrznej prezentowanych związków nie zostały przedstawione.³⁷

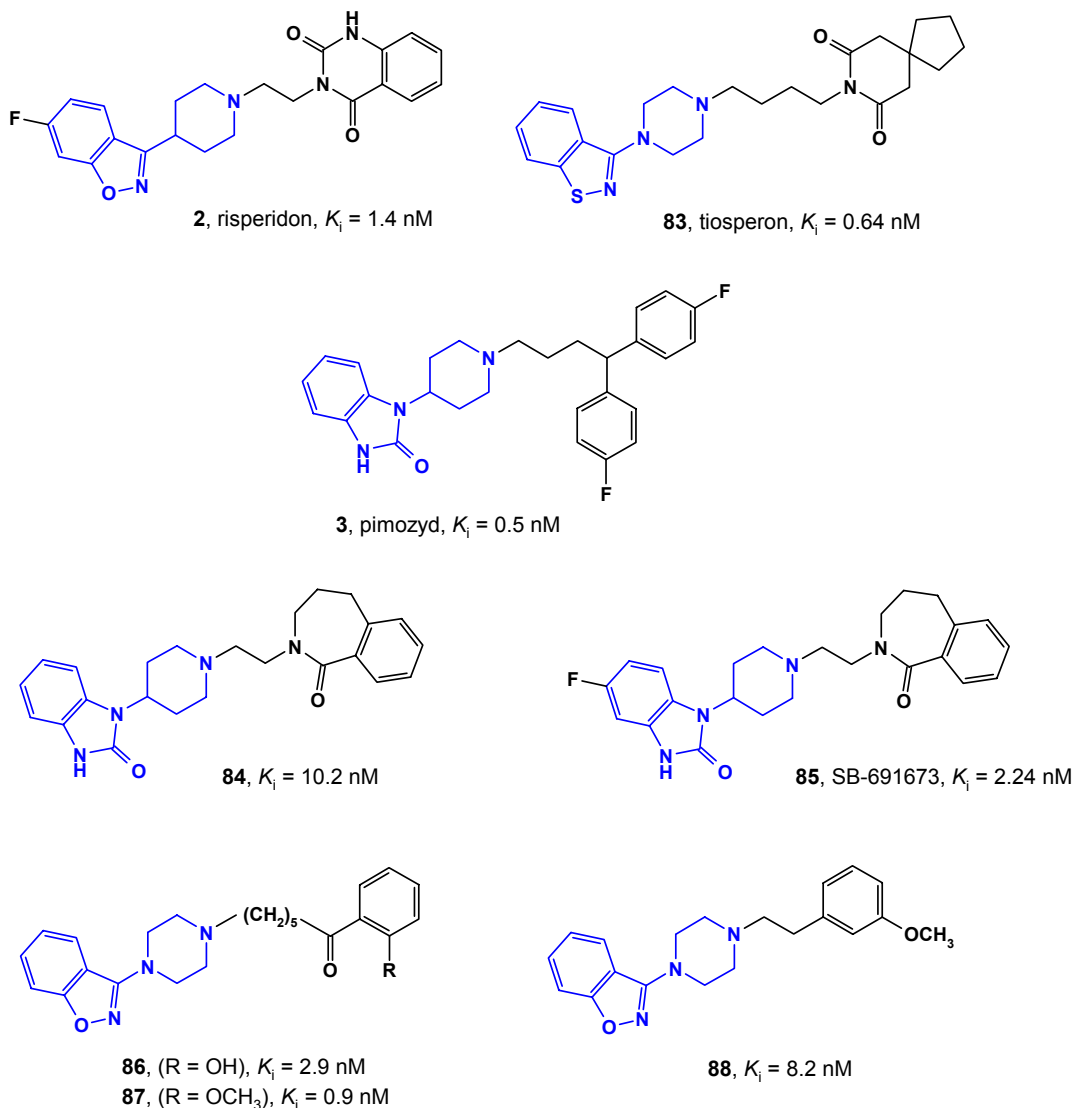
Podobnie, bardzo ograniczone dane o aktywności zawiera zgłoszenie patentowe Merck Sharp & Dohme Ltd. dotyczące selektywnych antagonistów – pochodnych arylosulfonamidowych o ogólnej strukturze chemicznej **81** i **82**. W opisanej serii 38 ligandów 5-HT₇R znaleziono struktury selektywne względem receptorów serotoninowych (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}) i dopaminowych (D₂).⁸⁹



Rysunek 10. Arylsulfonamidoalkiloaminy i arylosulfonoalkiloaminy.^{16, 22, 37, 65, 82-89}

2.3.8. Długołańcuchowe arylopiperydyny, arylopiperazyny i β -karboliny

To bardzo liczna i zróżnicowana pod względem budowy chemicznej grupa związków. Wśród najwcześniej zidentyfikowanych antagonistów 5-HT₇R znajdują się znane ligandy receptorów 5-HT₂ i D₂ wykazujące działanie antypsychotyczne, jak risperidon (**2**), tiosperon (**83**), pimozyd (**3**). Niektóre elementy struktury tych związków, jak np.: 3-piperidyn-4-ylo-benzo[d]izoksazol czy 1-piperidyn-4-ylo-1,3-dihydrobenzoimidazol-2-on zostały wykorzystane w późniejszych poszukiwaniach selektywnych ligandów 5-HT₇R.^{90,91}



Rysunek 11a. Długołańcuchowe arylopiperydyny i arylopiperazyny.^{2, 3, 16, 91}

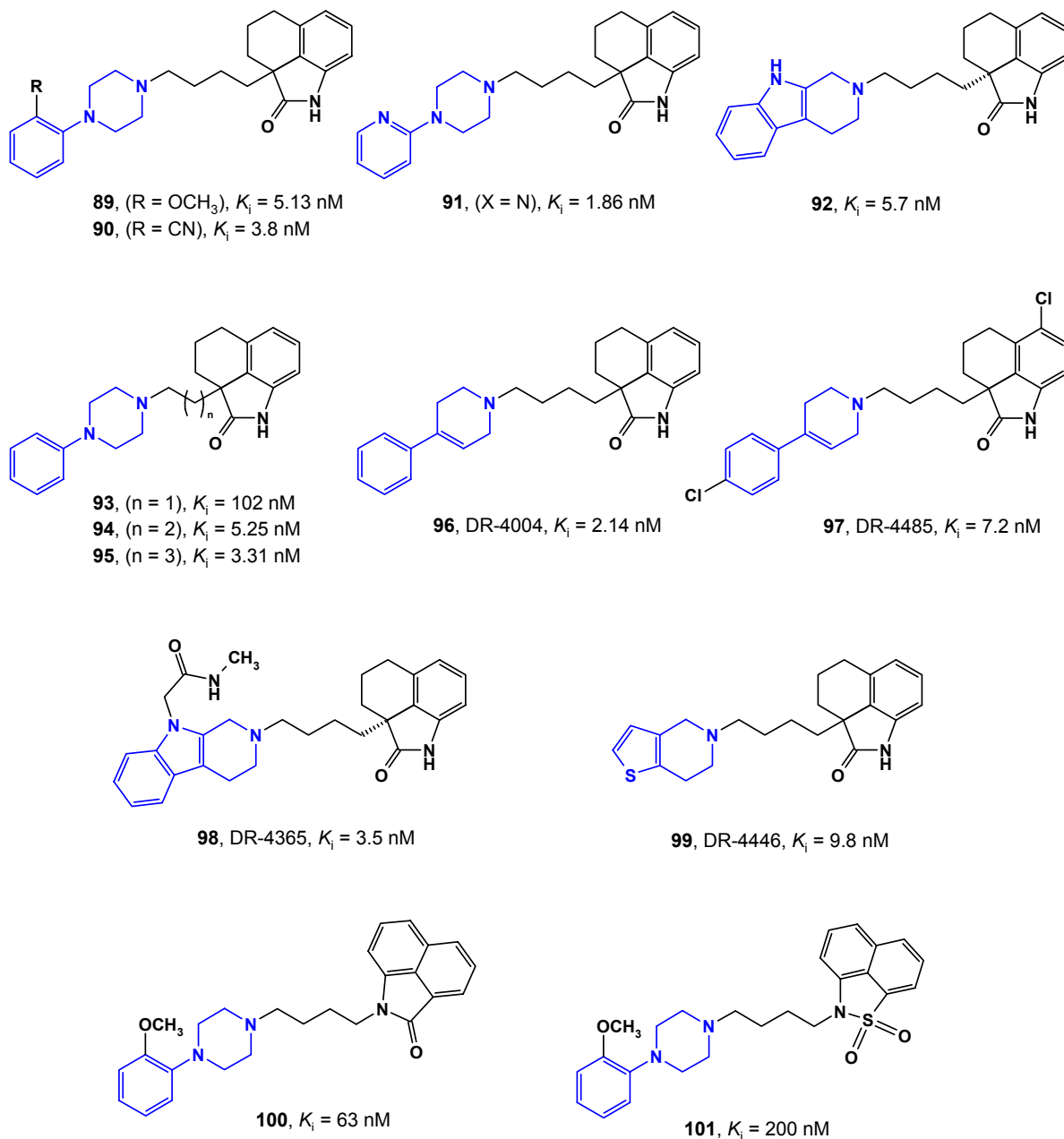
Jak widać z przedstawionych na rysunku struktur (np. **83**, **86–88**), związki te, należąc do klasy LCAPs, nawiązują strukturalnie do ligandów 5-HT_{1A}R, wobec czego często posiadają powinowactwo również do tego receptora. Jedynie pochodne z fragmentem 3-(1-piperazynylo)-1,2-benzioksazolowym wykazują selektywność 5-HT₇R/5-HT_{1A}R, ale

w tym wypadku charakteryzuje je także wysokie powinowactwo do 5-HT_{2A}R (analogia strukturalna do risperidonu **2**) oraz dodatkowo, w przypadku związków z podstawnikiem metoksylowym w grupie fenylowej, do receptora dopaminowego D₄ i adrenergicznego α_1 . W testach funkcjonalnych omawiane związki wykazują cechy agonistów 5-HT₇R.^{2,3}

Obok zidentyfikowanej pochodnej sulfonamidowej (**62**), w bibliotece związków GlaxoSmithKline znaleziono także selektywnego odwrotnego agonistę **84** o całkiem odmiennej strukturze chemicznej. Grupa 1-(piperydyn-4-ylo)-1,3-dihydrobenzoimidazol-2-onu w związku **84** to element struktury, który występuje również w niektórych lekach antypsychotycznych [benperidol, pimozyd (**3**)].⁹¹ Dalsza optymalizacja tego związku doprowadziła do odkrycia znanej pochodnej fluorowej – SB-691673 (**85**).

Tetrahydrobenzindole jako grupa ligandów 5-HT₇R wywodzi się z badań przesiewowych biblioteki związków Meiji Seika Kaisha Ltd.^{92,93} Wyselekcjonowane pierwsze pochodne wykazywały powinowactwo, zarówno do 5-HT₇R, jak i 5-HT₂R. W wyniku dalszych modyfikacji ich struktur, tj. zastosowania różnych układów aryloaminowych, m.in. 1-pirydyn-2-ylopiperazyny, β -karboliny (**89–92**), czy zmiany długości łańcucha alkilowego (**93–95**), otrzymano szereg nowych ligandów; w tym także znanego selektywnego antagonistę DR-4004 (**96**). Kolejne badania SAR zaowocowały syntezą nowych połączeń o ulepszonym profilu farmakokinetycznym, jak DR-4485 (**97**), DR-4365 (**98**) i DR-4446 (**99**).^{94–99} Dla związków o podobnej strukturze zarejestrowane zostało zgłoszenie patentowe przez GlaxoSmithKline.¹⁰⁰

Nowe pochodne naftolaktamu (**100**) i naftosultamu (**101**) o zbliżonej do tetrahydrobenzindoli strukturze, aczkolwiek znacznie mniej aktywne, zostały zsyntetyzowane w celu weryfikacji hipotezy farmakoforowej dla antagonistów 5-HT₇R, zaproponowanej przez Lopez-Rodriguez i wsp. (omówionej w rozdz. 2.4).^{64,101}



Rysunek 11b. Długołańcuchowe arylopiperidyny, arylopiperazyny i β -karboliny.¹⁶

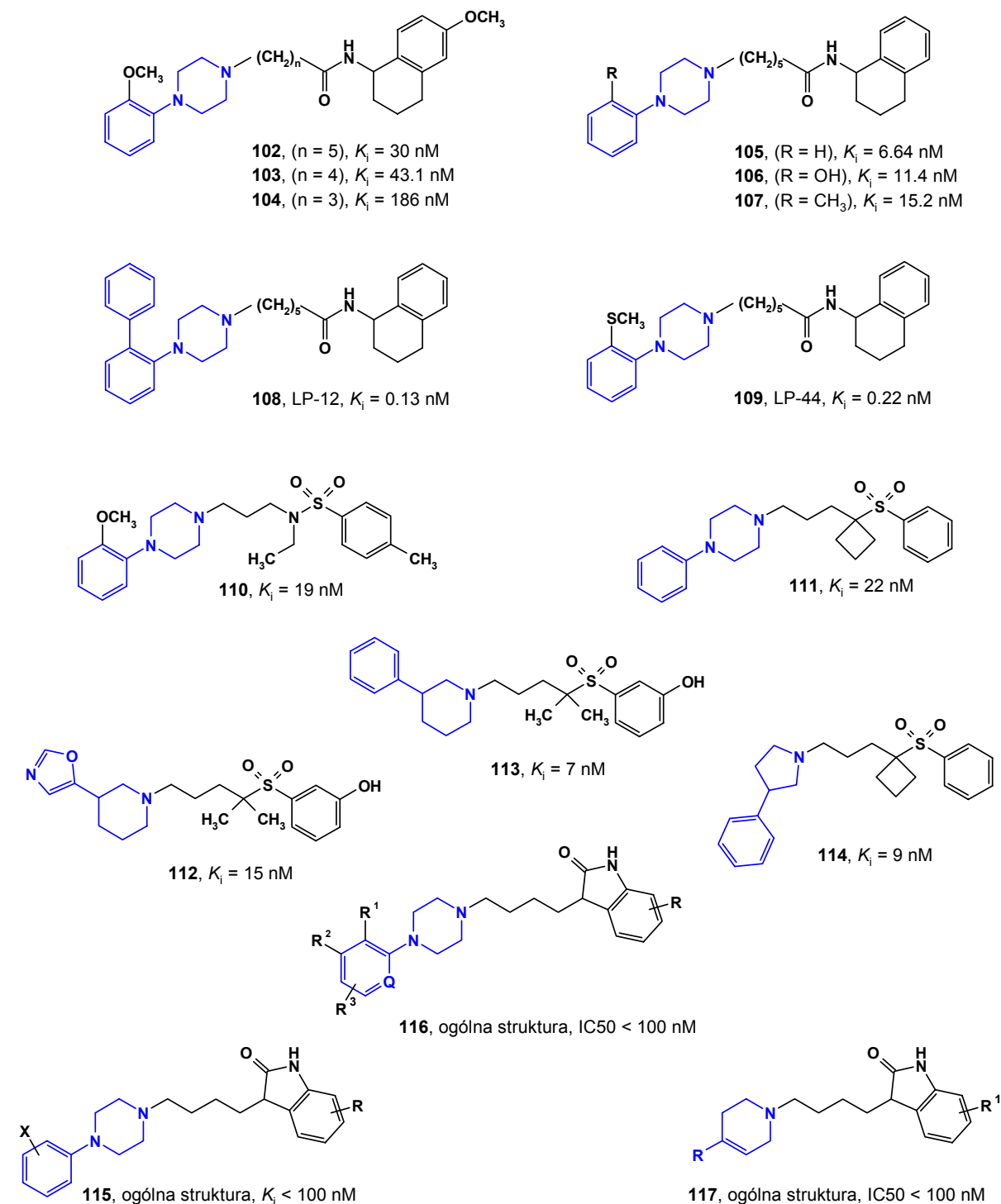
Kolejną grupą związków badaną w kierunku powinowactwa do 5-HT₇R były długołańcuchowe pochodne 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny, otrzymane wcześniej jako ligandy 5-HT_{1A}R. Modyfikując sposób i typ podstawienia w pierścieniu aromatycznym układu arylopiperazynowego, długość łańcucha oraz strukturę terminalnego fragmentu amidowego zidentyfikowano nową klasę ligandów 5-HT₇R (**102–107**).⁹⁰ Na podstawie badań tej grupy połączeń wykazano, że do uzyskania wysokiego powinowactwa preferowany jest niepodstawiony układ 1,2,3,4-tetrahydronaftalenu, łańcuch alkilowy składający się z pięciu grup metylenowych oraz podstawienie w położeniu *orto* pierścienia aromatycznego. Rodzaj podstawników w tym ostatnim fragmencie decydował także o profilu aktywności

funkcjonalnej. Generalnie zauważono, że ligandy z grupami typu OH (**106**), NHCH₃ zachowywały się jak antagoniści, natomiast z CH₃ (**107**), Ph (**108**), SCH₃ (**109**), CH(CH₃)₂, N(CH₃)₂ jak agoniści. Niestety, większość otrzymanych ligandów tej serii cechował brak, bądź tylko niewielki stopień selektywności wobec 5-HT_{1A}R.⁹⁰ Dwa związki: LP-12 (**108**) i PL-44 (**109**) zidentyfikowane jako selektywni agoniści 5-HT₇R względem receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} obecnie znajdują się ofercie firmy Tocris Bioscience.

Do grupy długołańcuchowych arylopiiperazyn zaliczyć można również ligandy, które w miejscu amidowego fragmentu w LCAPs posiadają grupę sulfonamidową lub sulfonową **110–114**. Arylosulfonamidowe połączenia typu **110**, obok omówionych wcześniej pochodnych THIQ (**67–69**), zostały opublikowane jako nowa seria odwrotnych agonistów w 2004 r.⁶⁵ przez Vermeulena i wsp. wraz z opracowanym na ich podstawie modelem farmakoforowym. W tej serii ligandów szczególnie silne hamowanie podstawowej aktywności cykazy adenylowej wykazywały *N*-etylo-podstawione sulfonamidy (**110**).

Podobnie, równolegle do omówionych już pochodnych THIQ (**74–76**), opublikowano serię arylosulfonoalkiloamin (**112–114**) – pochodnych arylopiiperazyny i arylopiperydyny.⁸⁷ Wyniki rozszerzonych badań receptorowych (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{1B}, D₂, α₁, hERG), przedstawionych dla kilku związków z różnymi podstawnikami w pozycji C-3 piperydyny, wskazały, że największą preferencją 5-HT₇R charakteryzowała się struktura **112** z fragmentem 3-oksazolopiperidynowym.

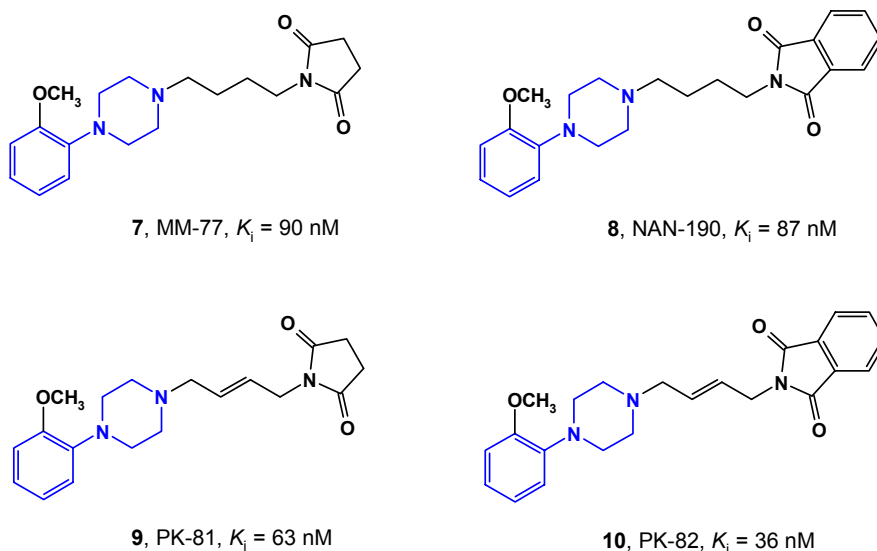
Nowe piiperazynowe lub piiperidynowe pochodne oksindolu zostały opatentowane jako ligandy 5-HT₇R o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu zaburzeń OUN lub chorób sercowo-naczyniowych przez Volk i wsp. z Egis Gyogyszergyar Pharmaceuticals.^{102–104} Pod względem struktury chemicznej przedstawiona seria związków (**115–117**) nawiązywała do wcześniej wspomnianych połączeń opracowanych w firmie Meiji Seika Kaisha Ltd. (**89–99**). Jak wynika z treści patentów modyfikowana była długość łańcucha polimetylenowego (**116–118**), lecz pokazane zostały tylko struktury pochodnych *n*-butylowych. Ponadto ujawniono jedynie część danych biologicznych, nie podając jednak żadnych informacji dotyczących profilu aktywności funkcjonalnej. W pierwszym wniosku patentowym przedstawiono 13 związków o ogólnym wzorze **115** jako ligandy 5-HT₇R.¹⁰² Niektóre z prezentowanych struktur były także ligandami α₁ adrenoceptorów i inhibitorami wychwytu zwrotnego 5-HT. Związki o ogólnym wzorze **116**, opisane w drugim wniosku patentowym, wykazywały mieszany profil receptorowy 5-HT₇/α₁.¹⁰³ Przedmiotem trzeciego wniosku było 10 ligandów o ogólnej strukturze **117**, dwa z nich (R = 4-CIPh i R¹ = H oraz R = 3-CF₃Ph i R¹ = 5F) hamowały wychwyt zwrotny 5-HT.^{104, 105}



Rysunek 11c. Długołańcuchowe arylopiperidyny i arylopiperazyny.^{65, 87, 90, 102-104}

Długołańcuchowe pochodne arylopiperazyny to także jeden z tematów badań Zakładu Chemii Leków IF PAN, który rozwijano pod kątem poszukiwania nowych związków wykazujących aktywność do różnych receptorów serotoninowych. Pierwsze ligandy 5-HT₇R zostały zidentyfikowane na drodze testów przesiewowych własnej biblioteki związków i jak można się było spodziewać, były to przeważnie zsyntezowane już wcześniej ligandy 5-HT_{1A}R, m.in. związek MM-77 (**7**) [K_i (5-HT_{1A}) = 6,4 nM].⁶ Równocześnie znaczące

powinowactwo do 5-HT₇R wyznaczono w naszym laboratorium dla związku NAN-190 (**8**), będącego znanym postsynaptycznym antagonistą 5-HT_{1A}R.⁸ Ponieważ usztywnione liniowo analogi tych połączeń, tj. pochodne **11** (MP-349) i **12** (MP-245) były całkowicie pozbawione aktywności do 5-HT₇R dalsze badania zostały ukierunkowane na modyfikacje struktury łącznika polimetylenowego. W tym celu zsyntetyzowano nowe połączenia zawierające łańcuch 2-butenylowy w konformacji *cis* lub *trans*. Najwyższe powinowactwo do 5-HT₇R uzyskano dla pochodnych z łańcuchem *trans*-2-butenylowym **9**, przy czym nadal widoczna była preferencja wiązania do 5-HT_{1A}R [K_i (5-HT_{1A}) = 29 nM] i **10** [K_i (5-HT_{1A}) = 5 nM].⁶ W rezultacie kolejnych modyfikacji struktury MM-77 otrzymano nowe serie analogów 1-arylo-4-(4-sukcynimidobutylo)piperazyny^{9,106} oraz ich pochodne z fragmentem 1-(*m*-trifluorometylofenylo)piperazyny,¹⁰⁷ wśród których znaleziono aktywne ligandy 5-HT₇R wykazujące jednak porównywalnie wysokie powinowactwo do 5-HT_{1A}R oraz także do α_1 -adrenoceptorów.



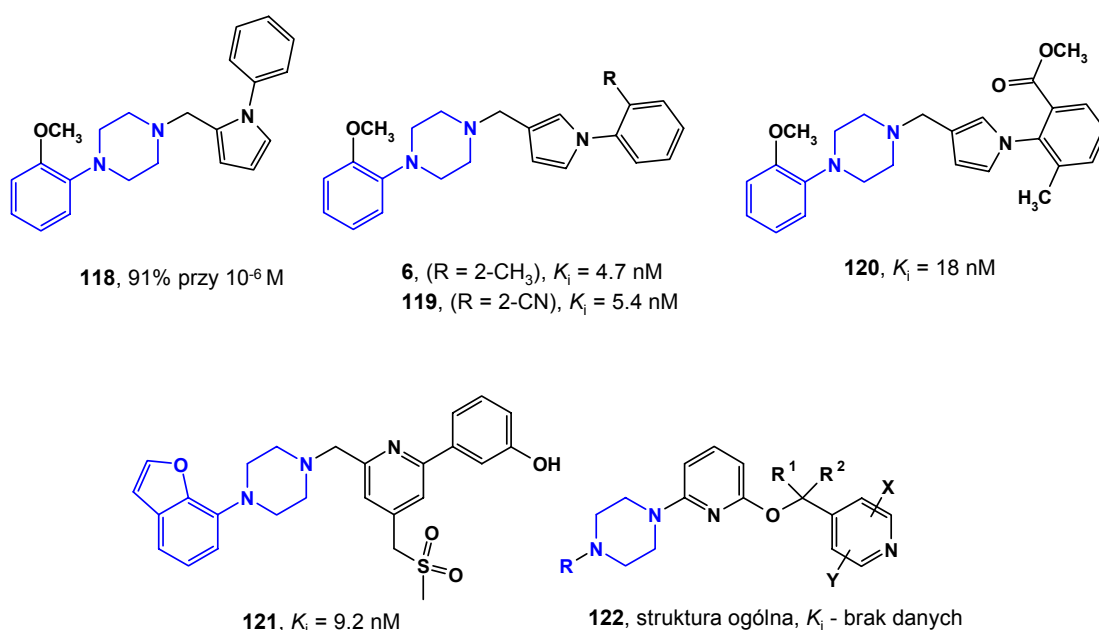
Rysunek 11d. Długołańcuchowe arylopiperazyny badane w ZChL.⁶

Do grupy arylopiperazynowych ligandów 5-HT₇R typu LCAPs można zaliczyć również związki z aromatycznym pierścieniem wbudowanym w łańcuch alkilowy, jak np. pirol (**6**, **119**, **120**) i pirydyna (**121**, **122**).

Pochodne fenylopirolu jako ligandy 5-HT₇R zostały odkryte przez Lepailleur i wsp. w wyniku wirtualnego przeszukiwania własnej biblioteki związków.^{1,108} Najbardziej aktywna struktura **118** poddana wielu modyfikacjom w celu poprawy powinowactwa do 5-HT₇R doprowadziła do otrzymania 3-podstawionych arylopirolu: **6**, **119**, **120**. W badaniach funkcjonalnych związki **121** i **122** zachowywały się jak antagoniści, natomiast **120** – jak

częściowy agonista. Niestety, połączenia **6**, **119**, **120**, okazały się również aktywnymi ligandami 5-HT_{1A}. W oparciu o uzyskane wyniki przeprowadzono optymalizację modelu farmakoforowego 5-HT₇R oraz badania modelowania molekularnego dotyczące selektywności 5-HT₇/5-HT_{1A} (przedstawione w rozdz. 2.4).¹⁰⁸

Seria arylopiperazyn z pierścieniem pirydyny wbudowanym w łańcuch alkiłowy zostały opublikowane w zgłoszeniu patentowym Shionogi & Co. dotyczącym identyfikacji agonistów 5-HT₇R.¹⁰⁹ Najwyższe powinowactwo w przedstawionej serii posiadał związek **121**. Pochodne 4-(2-pirydylo)piperazyny (**122**) były przedmiotem badań firmy Pfizer jako aktywne i selektywne ligandów 5-HT₇R (częściowi agoniści) o działaniu modulującym rytm okołodobowe.¹¹⁰



Rysunek 11e. Pochodne długołańcuchowych arylopiperazyn.^{1, 108-110}

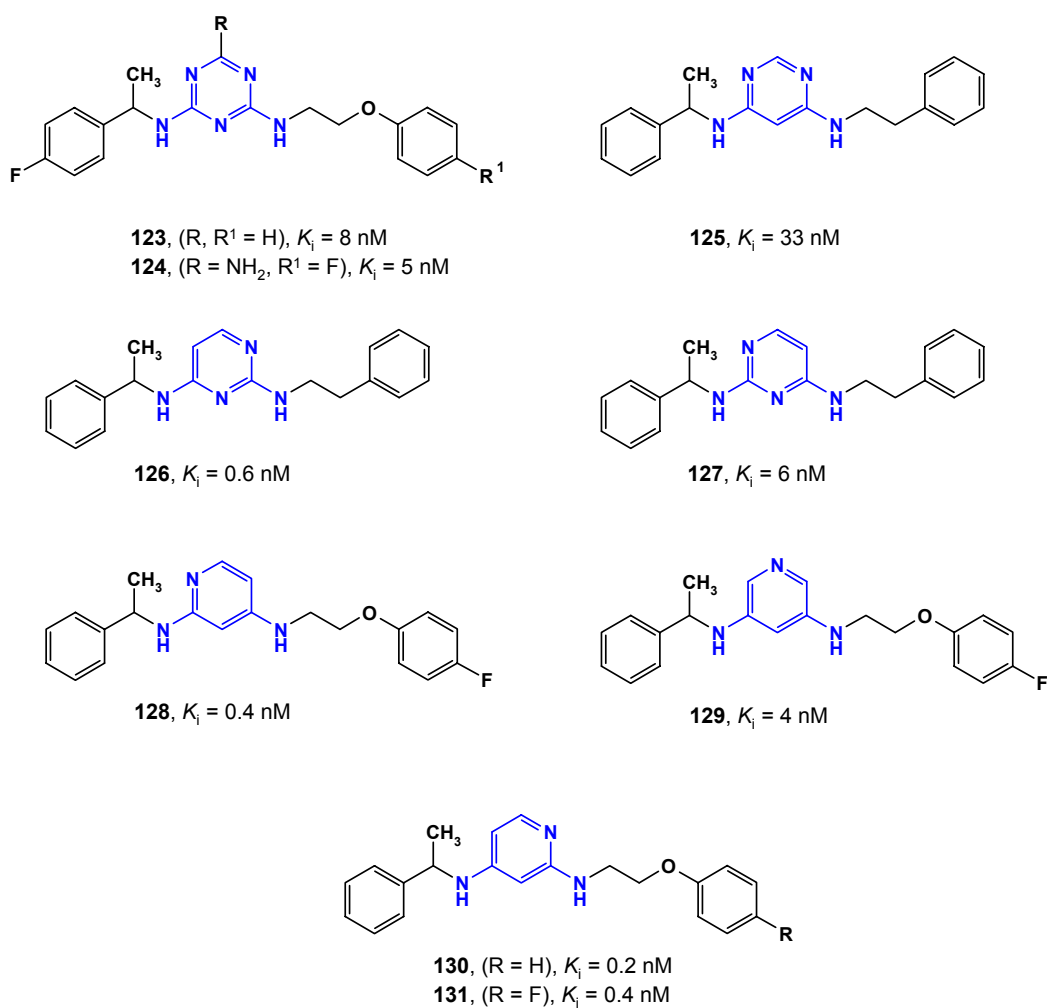
2.3.9. Pochodne diaminopirydyny, diaminopirymidyny i diaminotriazyny

Licząca 80 związków seria pochodnych diaminotriazyny, diaminopirydyny i diaminopirymidyny (m.in. **123–131**) została opisana w zgłoszeniu patentowym firmy Bristol - Myers Squibb w 2001 r. jako nowi antagoniści 5-HT₇R o potencjalnym zastosowaniu w terapii chorób OUN i oczu.¹¹¹ Trzy lata później opublikowano dwa artykuły, prezentujące rezultaty badań SAR tych klas ligandów.^{112, 113}

Pochodne diaminotriazyny (**123**, **124**) wykazywały stereoselektywność farmakologiczną (najwyższe powinowactwo do 5-HT₇R obserwowano w przypadku izomerów

S) i selektywność wobec receptorów adrenergicznych α_1 , dopaminowych D_{2L} oraz serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT₆ i częściowo wobec 5-HT_{2C}, a także transportera 5-HT.¹¹²

W drugiej grupie związków – pochodnych diaminopirymidyny i diaminopirydyny (**125–131**) – zbadano wpływ rozmieszczenia atomów azotu w pierścieniu aromatycznym na powinowactwo do 5-HT₇R. Związki tej klasy ligandów wykazywały selektywność wobec receptorów 5-HT_{1A} i D_{2L}, transportera 5-HT, natomiast z reguły nie były selektywne wobec α_1 -adrenoreceptorów i 5-HT_{2C}.¹¹³

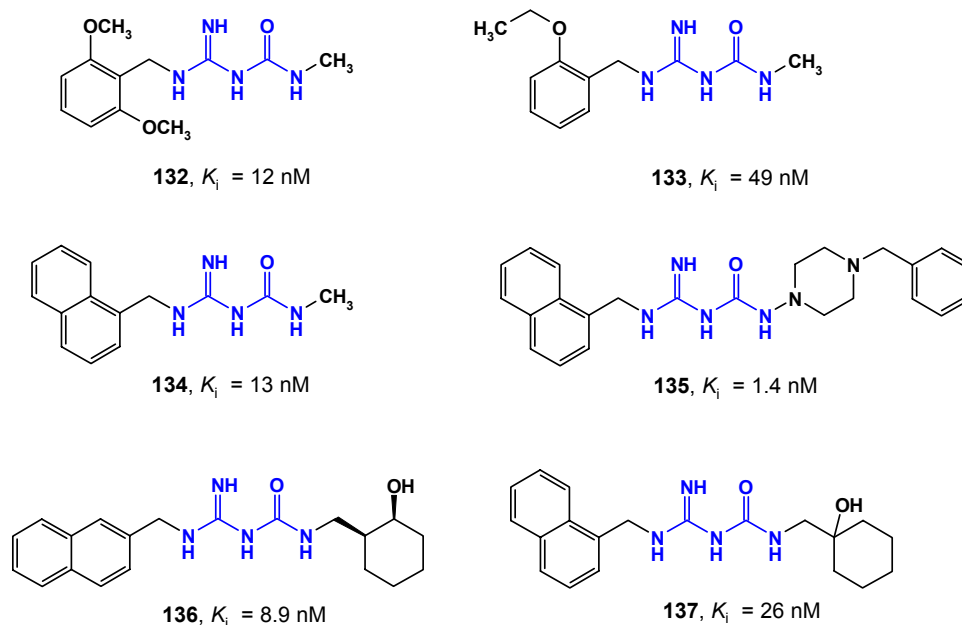


Rysunek 12. Pochodne diaminopirydyny, diaminopirymidyny i diaminotriazyny.^{111–113}

2.3.10. Pochodne amidynomocznika

W 2002 r. opublikowane zostało przez firmę Warner-Lambert Company zgłoszenie patentowe dotyczące pochodnych amidynomocznika (**132–137**).¹¹⁴ Wśród 89 związków

znalazły się zarówno selektywne ligandy 5-HT₇R (m.in. **132**, **133**), jak i wykazujące mieszany profil receptorowy: 5-HT₇/5-HT_{2A} (**134**, **135**) i 5-HT₇/5-HT_{2A}/5-HT_{1A} (**136**, **137**).



Rysunek 13. Pochodne amidynomocznika.¹¹⁴

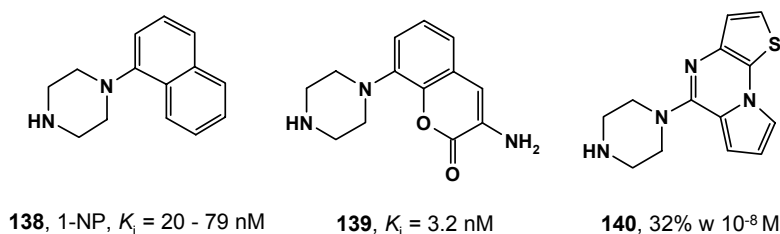
2.3.11. Proste arylopiperazyny

W skład tej grupy wchodzi ligandy o zbliżonej strukturze, które można uznać za analogi 1-naftylopiperazyny (**138**), wykazujące w badaniach funkcjonalnych cechy agonistów. Sama struktura 1-NP (**138**) może być rozważana jako uproszczony i usztywniony analog pochodnych tryptofanu i mimo że nie posiada ona akceptora wiązania wodorowego, wykazuje znaczne powinowactwo do 5-HT₇R.^{57, 115}

W 2005 r. został opublikowany patent firmy Solvay Pharmaceuticals B.V., dotyczący zastosowania pochodnych 1-(2H-1-benzopirano-2-on-8-yl)piperazyny w leczeniu zaburzeń ruchu.³⁶ Co ciekawe, znaleziony nieselektywny agonista 5-HT_{1A}R i 5-HT₇R oraz antagonist 5-HT_{1D}R – związek **139** – w teście aktywności antyepileptycznej był bardziej aktywny niż selektywne ligandy.¹¹⁶ Bazując na rezultatach innych testów *in vivo* dla specyficznych agonistów 5-HT_{1A}R, zasugerowano, że mechanizm działania **139** raczej nie jest związany z receptorem 5-HT_{1A}. Profil receptorowy związku **139** wyznaczony względem ok. 100 receptorów i kanałów jonowych wskazał na jego wysokie powinowactwo do 5-HT_{1B}R ($K_i = 2,0$ nM), 5-HT_{1D}R ($K_i = 13$ nM) i 5-HT₇R ($K_i = 3,2$ nM).¹¹⁶ Na podstawie dalszych badań wykazano, że aktywność antyepileptyczna związku **139** była częściowo antagonizowana w obecności selektywnego agonisty 5-HT_{1D}R (sumatriptan), ale także selektywnego antagonisty 5-HT₇R [SB-258741 (**65**)]. Zdaniem autorów taki profil farmakologiczny związku

139 świadczy o tym, że jest on kandydatem na nowy lek antyepileptyczny o zredukowanych skutkach ubocznych, który będzie skuteczny także w terapii pacjentów opornych na dotychczas stosowane leki.¹¹⁶

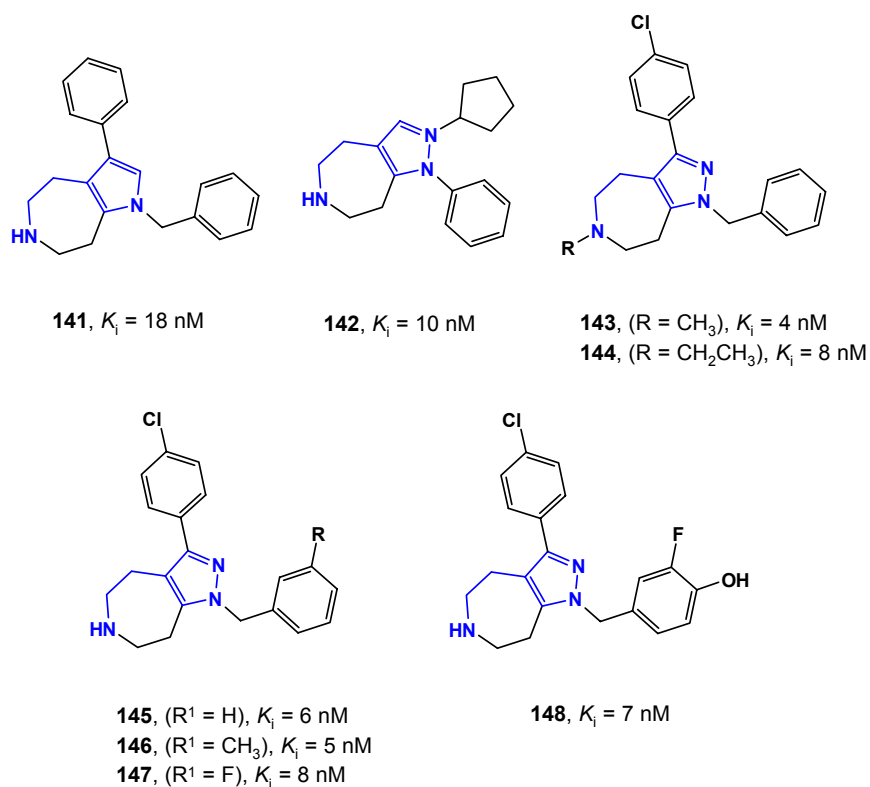
Do grupy prostych pochodnych arylopiiperazyny można zaliczyć także związek **140**, wcześniej oznaczony jako częściowy agonista 5-HT₃R. Do odkrycia jego aktywności do 5-HT₇R przyczyniły się obserwacje Rault i wsp. dotyczące analogii między modelami farmakoforowymi obu receptorów.¹¹⁷ W oparciu o tę strukturę i model farmakoforowy dla selektywnych antagonistów została zaprojektowana nowa seria związków (**143**, **144**), która została przedstawiona w rozdziale opisującym związki o zróżnicowanej strukturze (rozdz. 2.3.13).¹¹⁷



Rysunek 14. Proste arylopiiperazyny.^{36,57,115-117}

2.3.12. Pochodne aminoetylopirolu i aminoetylopirazolu

Firma Janssen Pharmaceutica zgłosiła wniosek patentowy dotyczący związków reprezentowanych ogólnymi wzorami **141–148**, wśród których znalazły się ligandy wykazujące cechy antagonistów 5-HT₇R.¹¹⁸ Autorzy przedstawili ponad 300 struktur, z których prawie 100 wykazuje wysokie powinowactwo do 5-HT₇R ($K_i < 10$ nM). Znaczna część opisanych związków jest selektywnymi ligandami 5-HT₇R lub posiada mieszany profil receptorowy 5-HT₂/5-HT₇. Dane, które ujawniono dotyczą wysokości powinowactwa do kilku typów receptorów serotoninowych (5-HT₇, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} i 5-HT_{2C}) i pozwalają zauważyć, że selektywne ligandy 5-HT₇R posiadają szkielet 1,4,5,6,7,8- lub 2,4,5,6,7,8-heksahydro-1,2,6-triaza-azulenu (**142–148**). Najwyższą selektywność wykazują pochodne z grupą 4-chlorofenylową w pozycji C-3 pierścienia pirazolu; wprowadzenie podstawników do grupy fenylometrylowej (**146–148**) lub metylowanie azotu w pierścieniu azepinowym (**143**) podwyższa selektywność do 5-HT₇R, przy czym sama wysokość powinowactwa do tego receptora nie ulega zmianie.¹¹⁸



Rysunek 15. Pochodne aminoetylopirolu i aminoetylopirazolu.¹¹⁸

2.3.13. Związki o zróżnicowanej strukturze

Oprócz ligandów 5-HT₇R opisanych powyżej, zidentyfikowano także inne związki wykazujące wysokie powinowactwo do tego receptora, których ze względu na zróżnicowaną budowę chemiczną nie można zaklasyfikować do żadnej z wyodrębnionych grup.

Badania HTS biblioteki firmy Merck¹¹⁹ wyłoniły pochodną tiazolu **149** jako aktywny ligand 5-HT₇R. W wyniku dalszej optymalizacji struktury otrzymano kilka wysokoaktywnych częściowych agonistów 5-HT₇R a badania SAR pokazały, że najkorzystniejsze jest usytuowanie podstawnika układu tiazolu w pozycji C-4, natomiast zastąpienie fragmentu tiazolowego pierścieniem pirydynowym (**150**) powoduje znaczny spadek selektywności względem 5-HT_{1A}R. W 2008 r. Laboratorios Del Dr. Esteve S.A. opublikowało zgłoszenie patentowe dotyczące zastosowania, m.in. częściowego agonisty MSD-5a (tj. związku **150**) w terapii bólu.⁷³

Seria trójcyklicznych związków typu **151**, **152** została zaprojektowana na podstawie modelu farmakoforowego zdefiniowanego przez Rault i wsp., który wygenerowano w oparciu o struktury selektywnych antagonistów 5-HT₇R (rozd. 2.4).¹¹⁷ W budowie tych związków istnieje strukturalne podobieństwo do liganda **140** o mieszanym profilu receptorowym 5-HT₇/5-HT₃. Autorzy zmodyfikowali jego strukturę, zastępując fragment

piperazynowy fleksyjnym łańcuchem łączącym układ trójcykliczny z ugrupowaniem aminowym i otrzymali połączenia o większej selektywności względem 5-HT₃R i 5-HT₄R.¹¹⁷

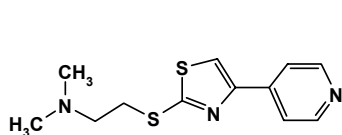
W 2002 r. firma Warner-Lambert Company opublikowała zgłoszenie patentowe dotyczące 55 pochodnych aminoalkilopirolidyny badanych jako ligandy 5-HT₇R.¹²⁰ Wśród tych związków znalazły się zarówno selektywne ligandy 5-HT₇R (m.in. **153**), jak i wykazujące mieszany profil receptorowy: 5-HT₇/5-HT₆/5-HT_{2A}.

W rezultacie systematycznych badań SAR pochodnych *N*-etyloindolu, firmie NPS Pharmaceuticals Inc. udało się otrzymać kilka selektywnych ligandów 5-HT₇R.¹²¹ Najbardziej aktywny związek **154** posiadał brom w pozycji C-6 układu indolu a jako terminalny fragment aminowy – dekahydropirydo[1,2-*d*][1,4]diazepinę. W badaniach radioizotopowych wykazywał on selektywność wobec szerokiego spektrum receptorów (serotoninowych, muskarynowych i dopaminowych).

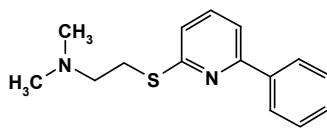
Powstanie serii pochodnych (4,5-dihydroimidazol-2-ilo)bifenyloaminy (analogi związku **155**) również zostało zainicjowane badaniami HTS biblioteki związków koncernu farmaceutycznego Pfizer. Ligandy tej nowej klasy agonistów 5-HT₇R wykazywały jednocześnie powinowactwo do receptorów adrenergicznych α_1 i α_2 , co w badaniach *in vitro* po dożylnym podaniu u szczurów było przyczyną wystąpienia nadciśnienia.¹²² Zastosowane w tej serii podstawniki w pozycji *meta* wolnego pierścienia fenylowego powodowały obniżenie powinowactwa do 5-HT₇R, natomiast zastąpienie tego pierścienia grupą tiofenylową przyczyniało się do wzrostu powinowactwa do receptora α_2 -adrenergicznego.

Pochodne aminoetylobifenyłu (**156**) pod względem budowy chemicznej to fleksyjne analogi ligandów z grupy 2-aminotetralin (rozdz. 2.3.5). Ligandy tej krótkiej serii wykazują selektywność względem 5-HT_{1A}R oraz zróżnicowanie profilu funkcjonalnego: związek **156** jest częściowym agonistą, natomiast **157** – antagonistą 5-HT₇R.¹²³

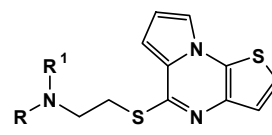
Nowe pochodne chinoliny (analogi **158**) zostały opatentowane przez firmę Pfizer jako agoniści lub częściowi agoniści 5-HT₇R o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu zaburzeń OUN i regulacji rytmów okołodobowych.¹²⁴ W badaniach receptorowych (40 związków) wykazywały szeroki zakres wartości powinowactwa K_i (3,5–5000 nM), jednakże konkretną wartość powinowactwa ujawniono tylko dla jednego liganda (**158**). Ponadto, przedstawiono wyniki testów farmakologicznych potwierdzające własności antydepresyjne związków, będących przedmiotem tego patentu. Nie zostały opisane dane dotyczące selektywności prezentowanych związków.¹²⁴



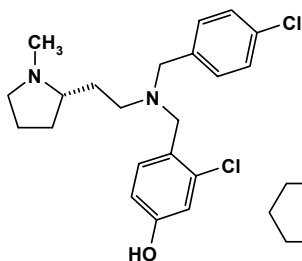
149, $K_i = 27$ nM



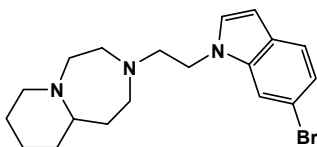
150, MSD-5a, $K_i = 0.6$ nM



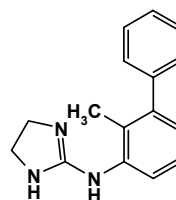
151, (R = R¹ = H), $K_i = 0.89$ nM
 152, (R = R¹ = CH₃), $K_i = 5.6$ nM



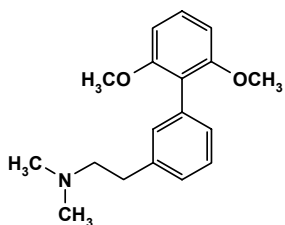
153, $K_i = 0.91$ nM



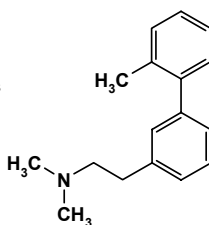
154, $K_i = 3$ nM



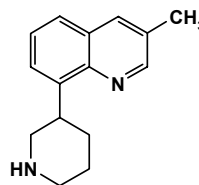
155, $K_i = 16.2$ nM



156, $K_i = 8.6$ nM



157, $K_i = 7.6$ nM



158, $K_i = 7.6$ nM

Rysunek 16. Związki o zróżnicowanej strukturze. ^{117, 119-124}

2.4. Hipotezy farmakoforowe 5-HT₇R

Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (*IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry*) podaje oficjalną definicję farmakoforu jako zbiór sterycznych i elektronowych cech, które są niezbędne do zapewnienia optymalnych supramolekularnych oddziaływań ze specyficznym celem biologicznym dla wywołania bądź zablokowania jego odpowiedzi biologicznej.¹²⁵ Wielu autorów upraszcza jednak tę definicję, określając farmakofor jako model relacji przestrzennej między elementami wspólnymi dla wszystkich aktywnych ligandów danego receptora. Te „elementy wspólne”, tzw. ugrupowania farmakoforowe, to np.: dodatnio lub ujemnie naładowane grupy, donory i akceptory wiązań wodorowych, pierścienie aromatyczne i fragmenty hydrofobowe.

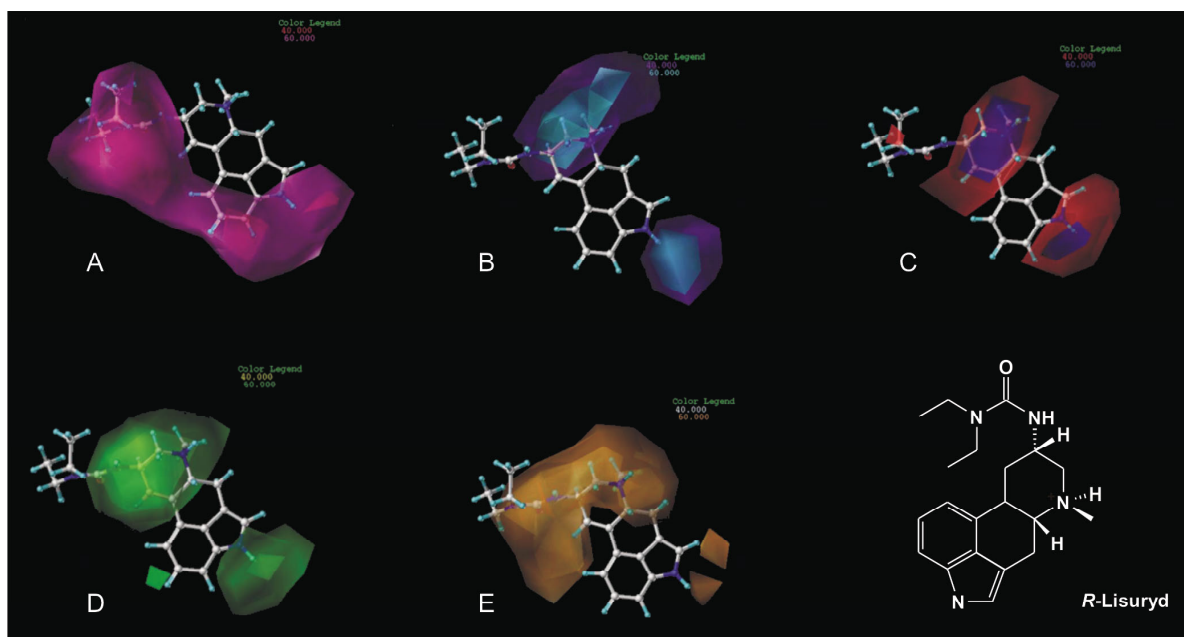
Tworzenie farmakoforu może być początkowym etapem projektowania substancji biologicznie czynnych (potencjalnie leków), w którym wykorzystywane są informacje tylko o ligandach (tzw. *ligand-based approach*) lub też dodatkowo o strukturze miejsca wiążącego receptora (tzw. *structure-based approach*). W optymalnej sytuacji używa się do tego celu bezpośrednich danych eksperymentalnych (tj. krystalograficznej struktury docelowego białka lub jego kompleksu z ligandem), najczęściej jednak są to teoretyczne, czyli wygenerowane komputerowo modele receptora lub przynajmniej jego domeny wiążącej.¹²⁶

Pierwszy model farmakoforowy receptora 5-HT₇ został opublikowany w 2000 r. przez Lopez-Rodriguez i wsp.¹⁰¹ W wyniku analizy serii 30 związków wybranych z literatury (selektywnych i nieselektywnych antagonistów), m.in.: **17** (2-Br-LSD), **22** (metysergid), **26** (mesulergina), **27** (metergolina), **29** (klozapina), **35** (metiotepina), **37** (cyproheptadyna), **33** (mianseryna), **61** (spiperon), **58** (ritanseryna), **62**, **63** (SB-258719), **65** (SB-258741), **90–91**, **93–96** (DR-4004) zdefiniowano przestrzenne rozmieszczenie elementów strukturalnych ważnych dla działania antagonistycznego względem receptora 5-HT₇. Były to: zasadowy atom azotu (PI), pierścień aromatyczny (AR), akceptor wiązania wodorowego (HBA) i region hydrofobowy (HYD) (rys. 18 A).¹⁰¹ Współczynnik korelacji pomiędzy przewidzianym i wyznaczonym powinowactwem (pK_i) wynosił $r^2 = 0,921$.

Efekt dalszej optymalizacji tej hipotezy, w oparciu o serię 38 związków poszerzoną o nowych antagonistów 5-HT₇R [m.in. związki **48–50** i **64** (SB-269970)], było otrzymanie pięcioelementowego modelu, charakteryzującego się równie dobrą przewidywalnością powinowactwa ($r^2 = 0,912$).⁶⁴ Nowy farmakofor definiował relacje przestrzenne pomiędzy ugrupowaniami odpowiadającymi PI, HBA i trzem regionom HYD, przy czym żaden z tych ostatnich nie pokrywał się z poprzednią domeną A. Został on wykorzystany do zaprojektowania i zsyntetyzowania nowych pochodnych naftolaktamu i naftosultamu (m.in.

związki **100**, **101**) i w opinii autorów otrzymane rezultaty (wartości powinowactwa pK_i w zakresie od 7,2 do poniżej 5) potwierdzały jego skuteczność.

Pierwszą próbę objaśnienia specyfiki oddziaływań agonistów z 5-HT₇R podjął Wilcox i wsp., przeprowadzając analizę 3D QSAR (*Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships*) metodą CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*).¹²⁷ Użyto dwóch standardowych typów pól: sterycznego i elektrostatycznego, a jako struktur szablonowych – usztywnioną strukturę (*R*)-lisurydu i najniższą energetyczną konformację fleksyjnej 5-metoksytryptaminy. Rezultaty badań, przedstawione na mapach konturowych, pokazały występowanie sterycznie uprzywilejowanych obszarów oraz usytuowanie regionu faworyzującego ładunek dodatni, znajdujący się w pobliżu pierścieni fragmentu indolowego. Ponadto, używając tych samych struktur modelowych, wykonano dodatkowo analizę CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Index Analysis*), w której określono, oprócz rozkładu pól sterycznych i elektrostatycznych, udział własności hydrofobowych oraz donorowo-akceptorowych wiązania wodorowego. Mapy konturowe końcowego sześciokomponentowego modelu ($q^2 = 0,856$) przedstawiono na rysunku poniżej.



Rysunek 17. Mapy konturowe CoMSIA. A: Miejsca o własnościach akceptorowych: preferowane – purpurowy; niepreferowane – czerwony (60:40); B: donorowych: preferowane – turkusowy; niepreferowane – fioletowy (60:40); C: elektrostatycznych: preferowane – niebieski; niepreferowane – czerwony (60:40); D: sterycznych: preferowane – zielony; niepreferowane – żółty (60:40); E: hydrofobowych: preferowane – pomarańczowy; niepreferowane – biały (60:40).¹²⁷

Testowana seria 17 związków zawierała jednocześnie agonistów i antagonistów, tak więc mimo początkowych intencji autorów, otrzymane przez nich rezultaty odnoszą się głównie do wymogów receptora 5-HT₇ niezbędnych do osiągnięcia wysokiego powinowactwa

i raczej nie można ich definiować jako warunków do uzyskania specyficznej aktywności funkcjonalnej.

Kolejny model, opracowany przez Vermeulena i wsp., bazował na 20 agonistach 5-HT₇R, należących do różnych klas chemicznych: indoloalkiloamin, arylopiperyzyn, 2-aminotetralin, jak np. związki: **52** (AS-19) i **155**.¹²⁸ Procedury zastosowanego programu Apollo (*Automated Pharmacophore Location through Ligand Overlap*) umożliwiły, zamiast bezpośredniego dopasowywania odpowiednich grup funkcyjnych związków, nakładanie punktów symulujących miejsca oddziaływania z odpowiednimi resztami aminokwasowymi w kieszeni wiążącej receptora.¹²⁹ Tak więc, zdefiniowano odległości między grupami farmakoforowymi: tj. regionem PI, domeną HBA i dwiema domenami HYD (reprezentującymi aromatyczne pierścienie) (rys. 18 C) i przeprowadzono standardową analizę CoMFA, a wygenerowane pola mapowano na miejsce wiążące agonistów w modelu 5-HT₇R. W ten sposób danym grupom farmakoforowym przypisano aminokwasy: Asp3.32 (ulożony na trzeciej transmembranowej helisie – TMH3) odpowiadał PI, Thr5.43 (TMH5) – HBA, a grupa aromatycznych reszt aminokwasowych z TMH6 – regionowi HYD.

Ostatnie badania, z wykorzystaniem linii komórkowych z ekspresją ludzkich 5-HT₇R wykazujących aktywność konstytucyjną wskazują, że niektóre z ligandów, początkowo rozpoznanych jako antagoniści 5-HT₇R, wykazują cechy tzw. odwrotnych agonistów.^{31, 130, 131} Dlatego też Vermeulen i wsp. opracowaną wcześniej strategię wykorzystali do otrzymania nowego modelu farmakoforowego (rys. 18 D) opartego wyłącznie na związkach, u których wykryto ten typ aktywności wewnętrznej, tj. metiotepinie (**35**), SB-269970 (**64**), SB-258741 (**65**) oraz połączeniach **50**, **68–70**, **110**.⁶⁵

Nowy farmakofor dla odwrotnych agonistów wykazywał podobieństwo do modelu Lopez-Rodriguez⁶⁴ (z wyjątkiem posiadania dodatkowej domeny HYD4 pochodzącej od aromatycznego podstawnika grupy sulfonamidowej) oraz do wcześniejszego modelu dla agonistów, różniąc się tylko obecnością dwóch domen HYD2 i HYD3. Nałożenie map konturowych, otrzymanych w analizie CoMFA, wskazało te same aminokwasy co poprzednio w miejscu wiążącym agonistów, natomiast dodatkowym regionom HYD2 i HYD3 przypisano oddziaływania z łańcuchami bocznymi Ile3.29, Phe7.38 i Leu7.39.

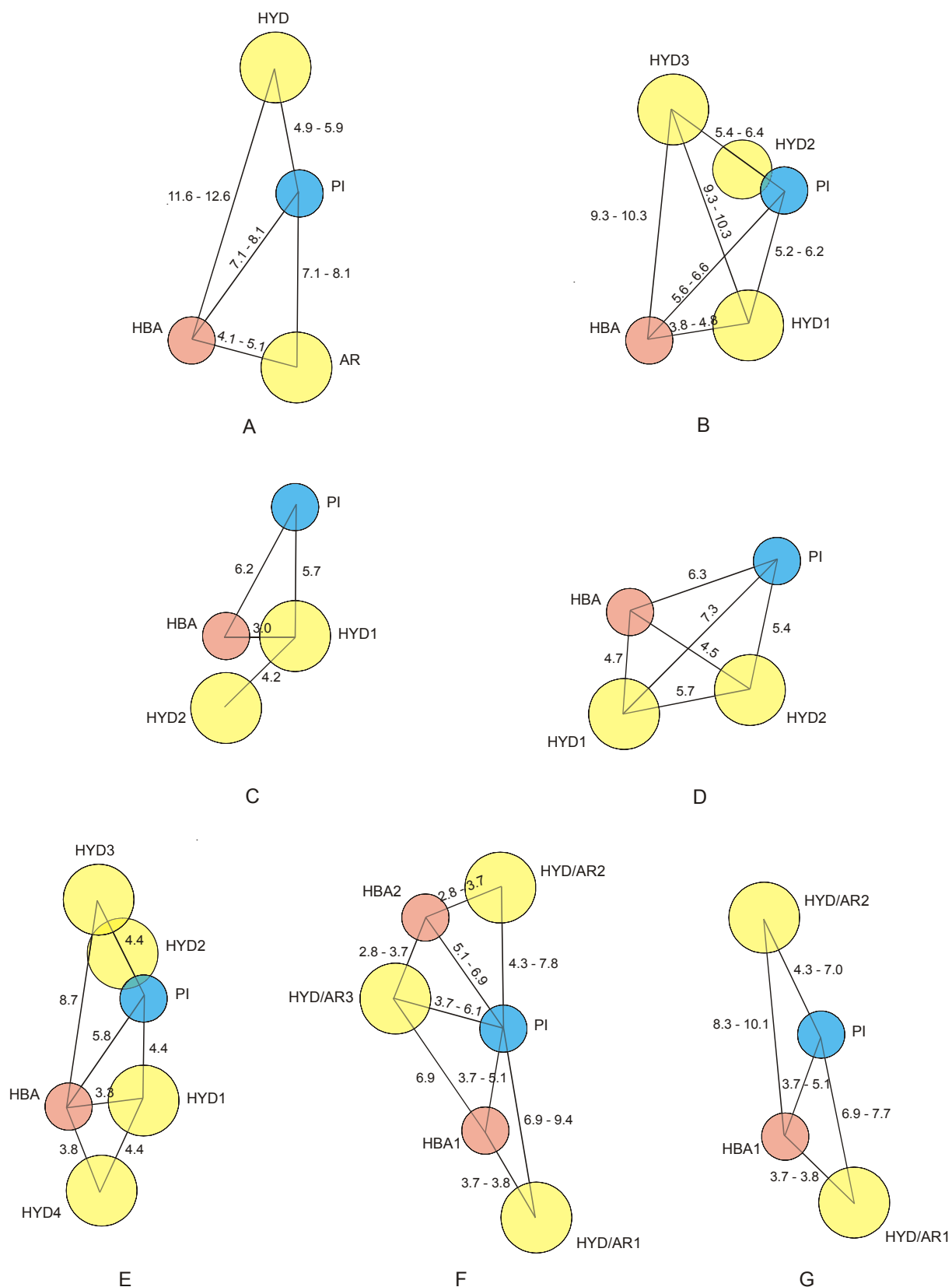
Wykorzystując pakiet oprogramowania Catalyst, Rault i wsp. opracowali model farmakoforowy z myślą o projektowaniu nowych, selektywnych antagonistów 5-HT₇R. Został on oparty na strukturze 5 znanych ligandów: SB-258719 (**63**), SB-258741 (**65**), DR-4004 (**96**), DR-4446 (**99**) i związku **48**.¹¹⁷ Analizując zdefiniowane domeny modelu, można zauważyć analogię do obu zaproponowanych przez Lopez-Rodriguez i wsp.^{101,64} hipotez (rys. 18 A i B) oraz duże podobieństwo do modelu odwrotnych agonistów Vermeulena

(rys. 18 D).⁶⁵ Farmakofor Rault i wsp. został z powodzeniem wykorzystany do projektowania nowych antagonistów 5-HT₇R (np. **119**), a także w badaniach selektywności względem 5-HT_{1A}R.¹⁰⁸ Wykazano, że nieselektywny ligand 5-HT₇R/5-HT_{1A}R **119** dobrze dopasowuje się do obu modeli, adoptując jednak różne konformacje: zgiętą (5-HT₇R) i rozciągniętą (5-HT_{1A}R).¹⁰⁸

Wyniki otrzymane przez Rault i wsp. były zgodne z opublikowanymi wcześniej rezultatami pierwszych prac realizowanych w Zakładzie Chemii Leków IF PAN nad poszukiwaniem nowych ligandów 5-HT₇R.⁶ Kontynuując ten temat, prowadzone w ZChL badania zostały rozszerzone o analizę bezpośrednich oddziaływań szerokiej grupy ligandów z modelem receptora 5-HT₇. Były one reprezentantami sześciu klas antagonistów, tj. ergoliny [**18** (2-Br-LSD), **23** (ergotamina), **27** (metergolina), **28** (amesergid)], aporfiny (**44–47**), trójcyklicznych związków psychotropowych [**29** (klozapina), **33** (mianseryna), **39** (amitryptylina), **43** (maprotylina)], LCAP/LCBC [**84**, **85** (SB-691673), **92**, **96** (DR-4004), **98** (DR-4365), **99** (DR-4446), **106**] arylosulfonamidoalkiloaminy [**63** (SB-258719), **64** (SB-269970), **65** (SB-258741), **66** (SB-656104), **67**], diaminopirydyny, diaminotriazyny i aminotetraliny (**54**, **123**, **124**, **128–131**).⁶⁶ Wszystkie wybrane ligandy zostały automatycznie zadokowane do populacji konformacyjnej receptora, a najlepsze kompleksy ligand-receptor dostarczyły informacji na temat sposobu wiązania poszczególnych klas ligandów oraz stanowiły bazę dla dwóch nowych hipotez farmakoforowych. Otrzymane rezultaty pokazały, że pochodne ergoliny, aporfiny i trójcyklicznych związków psychotropowych zawsze dokowały się w kieszeni receptora utworzonej przez helisy transmembranowe (TMH) 4–6, gdzie – oprócz głównego wiązania jonowego z Asp3.32 – obserwowano specyficzne oddziaływania z Phe6.52, Phe6.51, Trp6.48 i Ser5.42. Ligandy z fragmentem arylopiperydynowym, arylopiperazynowym lub β-karbolinowym zajmowały tę samą kieszeń, podczas gdy terminalna część amidowa/imidowa tych związków sięgała do drugiej, uformowanej przez TMH7-3 (tj. helisy 7, 2 i 3) kieszeni i oddziaływała z Phe3.28, Arg7.36 i Tyr7.43. Podobną orientację cząsteczek zaobserwowano dla selektywnych antagonistów z grupą arylosulfonamidoalkiloaminową, tj. część sulfonamidowa została ulokowana w drugiej kieszeni (TMH7-3).

Jak wspomniano, w oparciu o wyniki dokowania wygenerowano dwa farmakofory: pierwszy – określający najistotniejsze cechy strukturalne konieczne dla wysokiego powinowactwa do 5-HT₇R i drugi – definiujący selektywność wobec tego podtypu receptora (rys. 18 F, G).

Hipoteza powinowactwa definiowała sześć elementów farmakoforowych w strukturze liganda, tj. protonowany atom azotu (*positive ion* – PI), trzy regiony hydrofobowe/aromatyczne (HYD/AR1-3) i dwa akceptory wiązań wodorowych (HBA 1,2).



Rysunek 18. Schematyczne przedstawienie modeli farmakoforowych 5-HT₇R (odległości pomiędzy cechami podano w angstromach); A i B – dla antagonistów (Lopez-Rodriguez i wsp.),^{64,101} C – dla agonistów (Vermeulen i wsp.),¹²⁸ D – dla selektywnych antagonistów (Rault i wsp.),¹¹⁷ E – dla odwrotnych agonistów (Vermeulen i wsp.),⁶⁵ F – hipoteza „powinowactwo” i G – hipoteza „selektywność” dla antagonistów (Kołaczkowski i wsp.).⁶⁶

Odpowiednie ułożenie przestrzenne co najmniej trzech z tych cech to warunek konieczny dla uzyskania powinowactwa do 5-HT₇R. Dwa elementy muszą mieć ściśle określoną naturę, tj. PI (jon dodatni) i jeden z układów aromatycznych (AR), natomiast trzeci to albo akceptor wiązań wodorowych (HBA), względnie inny układ hydrofobowy/aromatyczny (HBA/AR). Każdy z wymienionych fragmentów farmakoforowych powinien oddziaływać z odpowiadającym mu elementem receptora: PI poprzez mostek solny z Asp3.32, AR1 wiązaniem typu CH- π lub π - π z Phe3.28 i/lub typu jon- π z Arg7.36, AR2 i AR3 z Phe6.52 i Phe6.51, HBA1 i HBA2 wiązaniem wodorowym z odpowiednio Tyr7.43 i Ser5.42, natomiast HYD4 i HYD5 z niespecyficznymi regionami hydrofobowymi w strukturze liganda.

Hipoteza selektywności została oparta na analizie wyników dokowania selektywnych ligandów i definiuje 3 elementy farmakoforowe. Dwa z nich są wspólne dla wszystkich selektywnych antagonistów, tj. kation – PI i pierścień aromatyczny AR1, który tworzy silne specyficzne oddziaływania z aminokwasami kieszeni receptora pomiędzy helisami 7-3 (kieszeń II, szczególnie Phe3.28 i Arg7.36). Trzecim elementem farmakoforowym niezbędnym dla selektywności może być HBA1 – akceptor wiązania wodorowego położony w sąsiedztwie Tyr7.43 lub układ hydrofobowy alifatyczny lub aromatyczny – HYD/AR2, penetrujący kieszeń pomiędzy helisami 3-6 (kieszeń I), ale jego oddziaływania nie mogą zdominować oddziaływań układu AR1. Podsumowując, model ten podkreśla kluczową rolę geometrii fragmentu aromatycznego (AR1) oraz akceptora wiązania wodorowego (HBA1), oddziałujących z łańcuchami bocznymi aminokwasów kieszeni TMH7-3, a szczególnie Arg7.36 dla uzyskania selektywności względem innych receptorów monoaminowych należących do GPCR. Odtworzony model selektywności został zweryfikowany w oparciu o wyniki dla nowych pochodnych arylosulfonamidowych w rozdziale 3.4.2.

3. BADANIA WŁASNE

3.1. Pochodne pirolidyny

3.1.1. Wstęp

W wyniku badań prowadzonych w ZChL nad ligandami należącymi do klasy LCAP, sformułowana została hipoteza określająca liniowo rozciągniętą konformację jako odpowiadającą bioaktywnej dla ligandów 5-HT_{1A}R.^{7, 132} Dodatkowe badania aktywności wewnętrznej związków pozwoliły na jej uszczegółowienie poprzez zdefiniowanie elementów strukturalnych determinujących blokadę lub pobudzenie receptora 5-HT_{1A}R.⁹ Na ich podstawie można było zaobserwować, że aktywność antagonistyczną wykazują najczęściej związki, które oprócz liniowej geometrii, posiadają podstawnik metoksylowy w położeniu *orto* pierścienia fenylowego arylopiiperazyny. Natomiast w grupie agonistów tolerowany jest zarówno brak podstawników, jak i inne rodzaje grup funkcyjnych oraz miejsca ich podstawienia w obrębie tego pierścienia.⁹

Wśród pochodnych użytych do weryfikacji tej hipotezy¹⁰⁶ znalazły się zsyntezowane przeze mnie związki, które można było wykorzystać w równoległych badaniach SAR do 5-HT₇R i selektywności oddziaływań 5-HT_{1A}R/5-HT₇R.

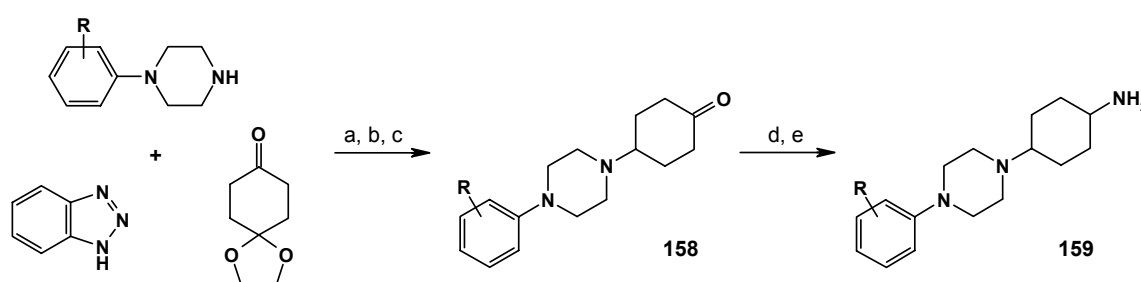
Wyniki, tzw. testów przesiewowych bazy związków ZChL w kierunku powinowactwa do 5-HT₇R, a następnie modyfikacje łącznika alkilowego w LCAP⁶ wykazały, że o ile konformacje liniowe należą do rozpoznawanych jako bioaktywne dla 5-HT_{1A}R, to w kieszeni wiążącej 5-HT₇R preferowane powinny być konformacje zgięte ligandów.

W celu potwierdzenia uniwersalności tego założenia zbadano szereg par związków (fleksyjny – usztywniony), będących analogami otrzymanych wcześniej ligandów: MM-77 i MP349 oraz NAN-190 i MP-245 (rys. 2, str. 14). Seria 16 pochodnych zawierała połączenia, w których zastosowano 4 różne układy arylopiiperazyny: fenylopiiperazynę (PhP), *orto*-metoksy-fenylopiiperazynę (*o*-OMe-PhP), *meta*-chloro-fenylopiiperazynę (*m*-Cl-PhP) i *meta*-trifluorometylo-fenylopiiperazynę (*m*-CF₃-PhP). Dodatkowo usunięto jedną grupę karbonylową z terminalnego fragmentu amidowego, co pozwoliło przeanalizować również wpływ tej modyfikacji na obserwowane powinowactwo do obu typów receptorów.

3.1.2. Synteza

Wszystkie metody wykorzystane do otrzymywania docelowych pochodnych pirolidyny przedstawiono na schematach 1 i 2. Wyjściowe 4-(4-arylopiiperazyn-1-yl)butyloaminy otrzymano w oparciu o procedury opisane przez Glennona i wsp.,⁸ natomiast ich sztywne analogi – 4-(4-arylopiiperazyn-1-yl)cykloheksyloaminy otrzymano według metody

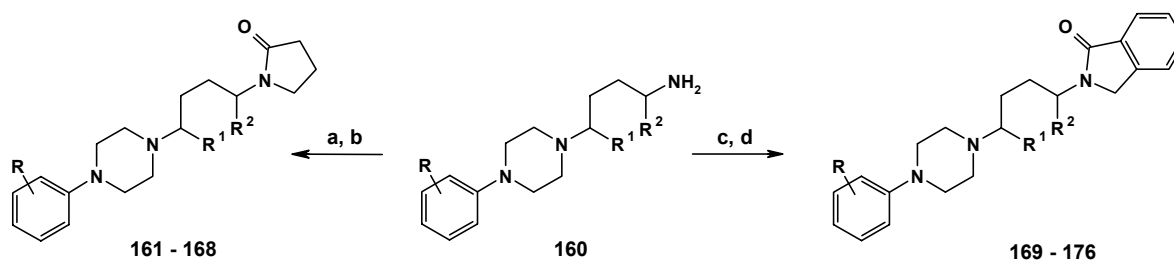
opracowanej w naszym laboratorium (schemat 1).^{9,132} Pierwszym etapem w syntezie związków o usztywnionej liniowo strukturze było uzyskanie kluczowych amin wyjściowych **159**. Ketony **158** otrzymano na drodze kondensacji benzotriazolu, aminy (odpowiedniej pochodnej fenylopiperazyny) i ketalu monoetylenowego 1,4-cykloheksanodionu, a następnie redukcji otrzymanego adduktu i hydrolizy ugrupowania ketalowego. Uzyskane w ten sposób ketony **158**, w wyniku reakcji z hydroksyloaminą tworzyły oksymy, które bezpośrednio zredukowano metalicznym sodem w butanolu do docelowych amin. W przypadku pochodnych 1-(3-trifluorometylofenylo)piperazyny, ze względu na niską wydajność reakcji redukcji przy pomocy sodu, zastosowano inną metodę, w której jako reduktor posłużył gazowy wodór pod ciśnieniem 2 atm. w obecności katalizatora Adamsa w środowisku kwaśnym (schemat 1).



Schemat 1. (a): benzen, temp. wrzenia, 2h; (b): NaBH₄, THF, temp. wrzenia, 3h; (c): HCl, H₂O, aceton, 20°C, 16h; (d): NH₂OH·HCl, Na₂CO₃, MeOH, 20°C, 5h; (e): Na, *n*-BuOH, temp. wrzenia, 6h lub H₂/PtO₂, MeOH, CH₃COOH (lod.), 2 atm., 50°C, 16h.

Pięciocłonowe laktamy **161–168** otrzymano w dwuetapowym procesie; najpierw prowadzono reakcję chlorków kwasu 4-chloromasłowego z odpowiednimi aminami, a następnie powstałe amidy poddano cyklizacji redukcyjnej, używając NaH w suchym THF.¹³³

Syntezę serii związków **169–176** rozpoczęto od reakcji bezwodnika ftalimidowego z odpowiednimi aminami (**160**) we wrzącym ksylenie. Następnie jedną z grup karbonylowych w otrzymanych pochodnych ftalimidowych zredukowano za pomocą pyłu cynkowego w lodowatym kwasie octowym w oparciu o metodę opisaną przez Brewstera i wsp.¹³⁴ Strukturę zsyntetyzowanych związków potwierdzono na podstawie widm ¹H NMR; ponadto dla soli docelowych związków końcowych wykonano analizę elementarną.



Schemat 2. (a): Cl(CH₂)₃COCl, CHCl₃/20%K₂CO₃, temp. pokojowa, 3h; (b): NaH, THF, temp. wrzenia, 6h; (c): bezwodnik ftalowy, ksylen, temp. wrzenia, 5h; (d) Zn, AcOH, temp. wrzenia, 1h.

3.1.3. Badania powinowactwa *in vitro*

Dla otrzymanych związków określono powinowactwo do serotoninowych receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ (tab. 2). Wartości stałych K_i do wybranych receptorów wyznaczono w oparciu o standardowe metody wypierania przez badany związek specyficznego radioliganda: [³H]-OH-DPAT (5-HT_{1A}) oraz [³H]-5-CT (5-HT₇) z homogenatu tkankowego szczura (hipokampu lub podwzgórza). Wartości K_i wyliczono jako średnią z trzech niezależnych eksperymentów, stosując stężenia badanej substancji w zakresie 10⁻¹⁰–10⁻³ M. Współczynnik selektywności wiązania wyliczono z równania: $S_{7/1A} = K_i(5-HT_7)/K_i(5-HT_{1A})$.

3.1.4. Dyskusja wyników

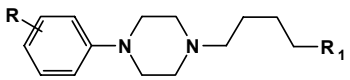
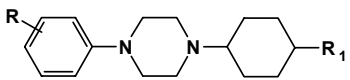
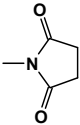
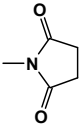
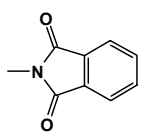
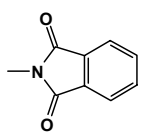
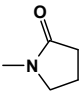
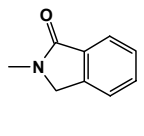
Otrzymane związki, zarówno fleksyjne jak i ich sztywne odpowiedniki, posiadały wysokie powinowactwo do 5-HT_{1A}R (0,7–74 nM). Ciekawe, że zastąpienie fleksyjnego łańcucha tetrametylenowego sztywnym układem cykloheksylowym powodowało kilku- do kilkunastokrotne obniżenie aktywności tylko u obu wyjściowych par (**7/11** i **8/12**) oraz analogów **171/172**. We wszystkich pozostałych przypadkach wyższe powinowactwo do 5-HT_{1A}R zostało wyznaczone dla pochodnych usztywnionych.

Porównanie wartości stałych wiązania K_i pochodnych *o*-OMe-PhP daje możliwość prześledzenia wpływu redukcji jednej grupy karbonylowej. Generalnie, z wyjątkiem związku **164**, posiadającego wyższą aktywność od swojego analogu MP-349 (**11**), modyfikacja ta prowadziła do obniżenia powinowactwa do 5-HT_{1A}R.

Analizując znaczenie podstawienia w pierścieniu fenylowym fragmentu arylopiperazynowego dla powinowactwa do 5-HT_{1A}R, można zauważyć, że pochodne PhP posiadają wyższe wartości K_i (czyli cechują się niższą aktywnością) od połączeń zawierających podstawniki w układzie arylowym. Przy czym dla łańcuchowych pochodnych brak jest wyraźnej preferencji wśród zastosowanych podstawionych układów arylowych. Natomiast w przypadku analogów usztywnionych, ten korzystny wpływ jest bardziej widoczny dla związków posiadających podstawniki w położeniu *meta* pierścienia fenyłowego, a połączenia **166**, **168**, **174** i **176** są najaktywniejszymi z otrzymanych ligandów 5-HT_{1A}R.

W odniesieniu do 5-HT₇R, niestety tylko wyjściowe pochodne łańcuchowe **7** (MM-77), **8** (NAN-190) charakteryzowała znamienna aktywność; redukcja grupy karbonylowej powodowała znaczące obniżenie powinowactwa (K_i od 380 do 650 nM) związków: **163**, **165**, **167**, **171**, **173** i **175**, a pochodne PhP były nieaktywne. Dodatkowo, usztywnienie łańcucha doprowadziło do całkowitej utraty powinowactwa do 5-HT₇R pozostałych pochodnych.

Tabela 2. Struktura, powinowactwo i selektywność 5-HT₇R/5-HT_{1A}R otrzymanych fleksyjnych (struktura A) i usztywnionych (B) pochodnych piperolidyny.

		 A		 B			
Związek	Struktura	R	R ₁	K _i [nM]		S _{7/1A}	
				5-HT _{1A}	5-HT ₇		
7 (MM-77)	A	<i>o</i> -OCH ₃		6,4	90	14	
11 (MP-349)	B	<i>o</i> -OCH ₃		15	11500	767	
8 (NAN-190)	A	<i>o</i> -OCH ₃		0,55	87	158	
12 (MP-245)	B	<i>o</i> -OCH ₃		8	2045	256	
161 (RB-91)	A	H		74	10000	135	
162 (RB-106)	B	H		36	>10000	277	
163 (RB-61)	A	<i>o</i> -OCH ₃		22	420	19	
164 (RB-99)	B	<i>o</i> -OCH ₃		4	>10000	>2500	
165 (RB-63)	A	<i>m</i> -Cl		26	500	19	
166 (RB-114)	B	<i>m</i> -Cl		0,7	>10000	>14285	
167 (RB-97)	A	<i>m</i> -CF ₃		16	380	23.7	
168 (RB-101)	B	<i>m</i> -CF ₃		1,9	>10000	5263	
169 (RB-94)	A	H		72	7200	100	
170 (RB-104)	B	H		30	>10000	>333	
171 (RB-82)	A	<i>o</i> -OCH ₃		11	600	54	
172 (RB-95)	B	<i>o</i> -OCH ₃		28	1600	57	
173 (RB-89)	A	<i>m</i> -Cl		27	540	20	
174 (RB-111)	B	<i>m</i> -Cl		6,7	>10000	>1492	
175 (RB-92)	A	<i>m</i> -CF ₃		13	650	50	
176 (RB-102)	B	<i>m</i> -CF ₃		4,4	>10000	>2272	

3.1.5. Wnioski

Otrzymane wyniki potwierdziły preferencję liniowo rozciągniętej (odpowiadającej bioaktywnej) konformacji LCAP przez 5-HT_{1A}R w stosunku do 5-HT₇R, co odzwierciedlają wyznaczone dla tego typu połączeń wysokie wartości $S_{7/1A}$. Zatem, podczas projektowania aktywnych ligandów 5-HT_{1A}R, pozbawionych powinowactwa do 5-HT₇R, zastosowanie modyfikacji strukturalnych zachowujących sztywną, liniową konformację związku powinno zapewnić pożądaną selektywność.

Sugerowana preferencja przez 5-HT₇R konformacji zgiętych została potwierdzona negatywnymi wynikami otrzymanymi dla pochodnych cykloheksylowych, które świadczą o braku tolerancji sztywnych struktur o liniowej geometrii w kieszeni wiążącej receptora. Natomiast, obniżenie powinowactwa pochodnych łańcuchowych, których swoboda konformacyjna nie uległa zmianie w stosunku do wyjściowych, bardziej aktywnych połączeń dowodzi, że w przypadku 5-HT₇R, oprócz wymagań konformacyjnych – istotną rolę odgrywają specyficzne oddziaływania terminalnego fragmentu amidowego.

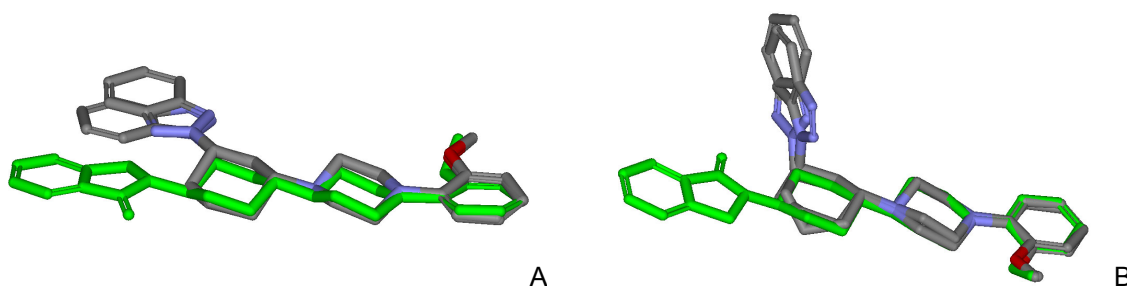
Część przedstawionych powyżej wyników badań została opublikowana w pracy: Structure-intrinsic activity relationship studies in the group of 1-imido/amido substituted 4-(4-arylpiperazin-1-yl)cyclohexane derivatives; new, potent 5-HT_{1A} receptor agents with anxiolytic-like activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14(5), 1391–402.¹⁰⁶

3.2. Pochodne benzotriazolu

3.2.1. Wstęp

W toku dalszych badań prowadzonych w ZChL, nad bioaktywną konformacją ligandów typu LCAP w 5-HT_{1A}R, analizowano wpływ geometrii związku na profil aktywności wewnętrznej. Jedną z grup badanych związków stanowiły pochodne podstawionego w pozycji 1- oraz 2-benzotriazolu, w których – w celu ograniczenia swobody konformacyjnej, łańcuch polimetylenowy (w tym wypadku trójmetrylenowy) zastąpiono układem 1,3-cykloheksanu. Powodowało to wymuszenie nieliniowej geometrii otrzymanych stereoizomerów *cis* i *trans* (rys. 19). Otrzymane wyniki badań powinowactwa (*in vitro*) i aktywności wewnętrznej (*in vivo*) do 5-HT_{1A}R oraz przeprowadzona analiza konformacyjna wykazały, że o ile w przypadku antagonistów receptor preferuje liniowo rozciągnięte konformacje LCAP, to aktywację mogą wywoływać także ligandy o konformacji zgiętej.³

Podobnie jak w poprzednio analizowanej serii pochodnych piperolidyny, badania zsyntezowanych przez mnie stereoizomerów *cis* i *trans* o „zamrożonej” strukturze zgiętej można było rozszerzyć o pomiary powinowactwa do 5-HT₇R i wykorzystując wyniki analizy konformacyjnej przedyskutować zależności struktura-aktywność w odniesieniu do 5-HT₇R.



Rysunek 19. Nałożenie liniowo usztywnionej struktury **172** (struktura oznaczona kolorem zielonym) z A: izomerami *cis* (**179** i **182**) oraz B: izomerami *trans* (**180** i **183**).

3.2.2. Synteza

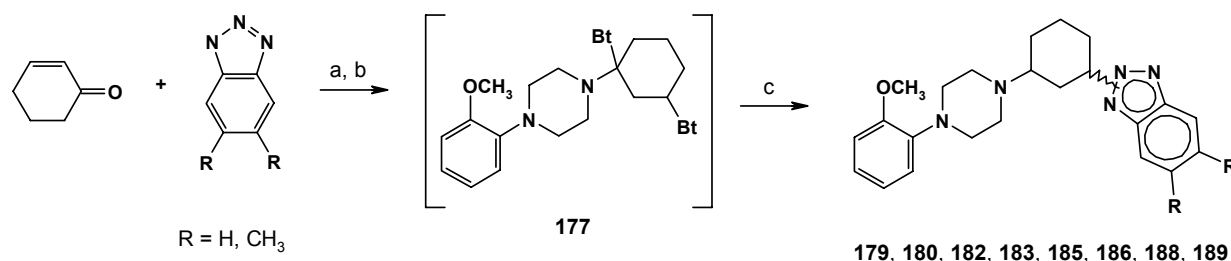
Struktury związków przedstawiono w tabeli 3, a metody syntezy na schemacie 3. Związek MP-3022 (**178**) i jego pochodna w konfiguracji *cis* MP-272 (**179**) zostały zsyntezowane we wcześniejszych badaniach prowadzonych w naszym Zakładzie.^{132, 135}

Natomiast pozostałe połączenia otrzymano w ramach poszukiwań bioaktywnej konformacji ligandów 5-HT_{1A}R,¹³⁶ w których badano łańcuchowe pochodne: MP-30/I (**181**), MP-154/II (**184**) i MP-154/I (**187**) oraz ich odpowiednio „usztywnione” analogi **180** (272-RB-3B), **182** (272-RB-1E), **183** (272-RB-1D), **185** (RB-117A), **186** (RB-117B), **188** (RB-117C), **189** (RB-117D).

W tym celu przeprowadziłem ponownie syntezę **179** (MP-272) na podstawie metody opisanej przez Katritzky'ego i wsp.¹³⁷ Obecne w mieszaninie reakcyjnej: izomer *cis* (**179**) i w mniejszych ilościach trzy izomery: *trans* (**180**) dla 1-podstawionego oraz *cis* (**182**) i *trans* (**183**) dla 2-podstawionego benzotriazolu wyizolowałem na drodze wieloetapowej chromatografii. Analogiczny ciąg reakcji przeprowadziłem dla pochodnych z fragmentem 5,6-dimetylobenzotriazolowym, otrzymując związki: **185**, **186**, **188**, **189**.

Benzotriazol i 5,6-dimetylobenzotriazol łatwo ulegały 1,4-addycji do 2-cykloheksen-1-onu, a powstałe odpowiednie addukty **177** bezpośrednio poddano reakcji z 1-(2-metoksyfenylo)piperazyną. W wyniku redukcji otrzymanych produktów przejściowych (nie wyizolowanych) borowodorkiem sodu otrzymano docelowe produkty (schemat 3). Z mieszaniny reakcyjnej wyizolowano izomery strukturalne *cis* i *trans* zarówno z 1-, jak i 2-podstawionym benzotriazolem lub 5,6-dimetylobenzotriazolem. Strukturę wszystkich nowych związków potwierdzono w oparciu o widma ¹H NMR i analizę elementarną ich soli.

Rezultaty badań ¹H NMR dla otrzymanych izomerów strukturalnych, jak również wcześniej publikowane dane spektralne dla związku **179**,¹³² pozwoliły przypisać konformację 1e,3e do związków **179**, **182**, **185** i **188**, a konformację 1a,3e do **180**, **183**, **186** i **189**.



Schemat 3. (a): Et₂O, temp. pokojowa, 6h; (b): Et₂O, 1-(2-metoksyfenylo)piperazyna, 1H-benzotriazol, temp. pokojowa, 6h lub MeOH, 1-(2-metoksyfenylo)piperazyna, 5,6-dimetylo-1H-benzotriazol, temp. wrzenia, 6h; (c): dioksan, NaBH₄, temp. wrzenia, 5h.

3.2.3. Badania powinowactwa *in vitro*

Dla wszystkich związków, dla których wcześniej określono powinowactwo do 5-HT_{1A}R, wyznaczono wartości stałych K_i do 5-HT₇R w oparciu o metodę wypierania przez badany związek specyficznego radioliganda – [³H]-5-CT z homogenatu komórek HEK 293 ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora 5-HT_{7(b)}. Wartości K_i wyliczono jako średnią z trzech niezależnych eksperymentów, stosując stężenia badanej substancji w zakresie 10⁻¹⁰–10⁻⁴ M. Selektyność do badanych receptorów obliczono według następującego równania: S_{7/1A} = K_i(5-HT₇)/K_i(5-HT_{1A}). Dane zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Struktura, powinowactwo i selektywność 5-HT₇R/5-HT_{1A}R fleksyjnych i usztywnionych pochodnych benzotriazolu.

Związek	R ₁	R ₂	R ₃	K _i [nM]		S _{7/1A}
				5-HT _{1A}	5-HT ₇	
178 (MP-3022)	H	H	I	15	120	8
179 (MP-272)	-(CH ₂) ₃ -		<i>cis</i> I	11	206	18,7
180 (272-RB-3B)	-(CH ₂) ₃ -		<i>trans</i> I	250	510	2
181 (MP-30/I)	H	H	II	24	225	9,4
182 (272-RB-1E)	-(CH ₂) ₃ -		<i>cis</i> II	23	418	18,2
183 (272-RB-1D)	-(CH ₂) ₃ -		<i>trans</i> II	136	354	2,6
184 (MP-154/II)	H	H	III	11	103	9,4
185 (RB-117A)	-(CH ₂) ₃ -		<i>cis</i> III	5	739	148
186 (RB-117B)	-(CH ₂) ₃ -		<i>trans</i> III	290	1428	4,9
187 (MP-154/I)	H	H	IV	65	167	2,6
188 (RB-117C)	-(CH ₂) ₃ -		<i>cis</i> IV	240	900	3,7
189 (RB-117D)	-(CH ₂) ₃ -		<i>trans</i> IV	850	377	0,44

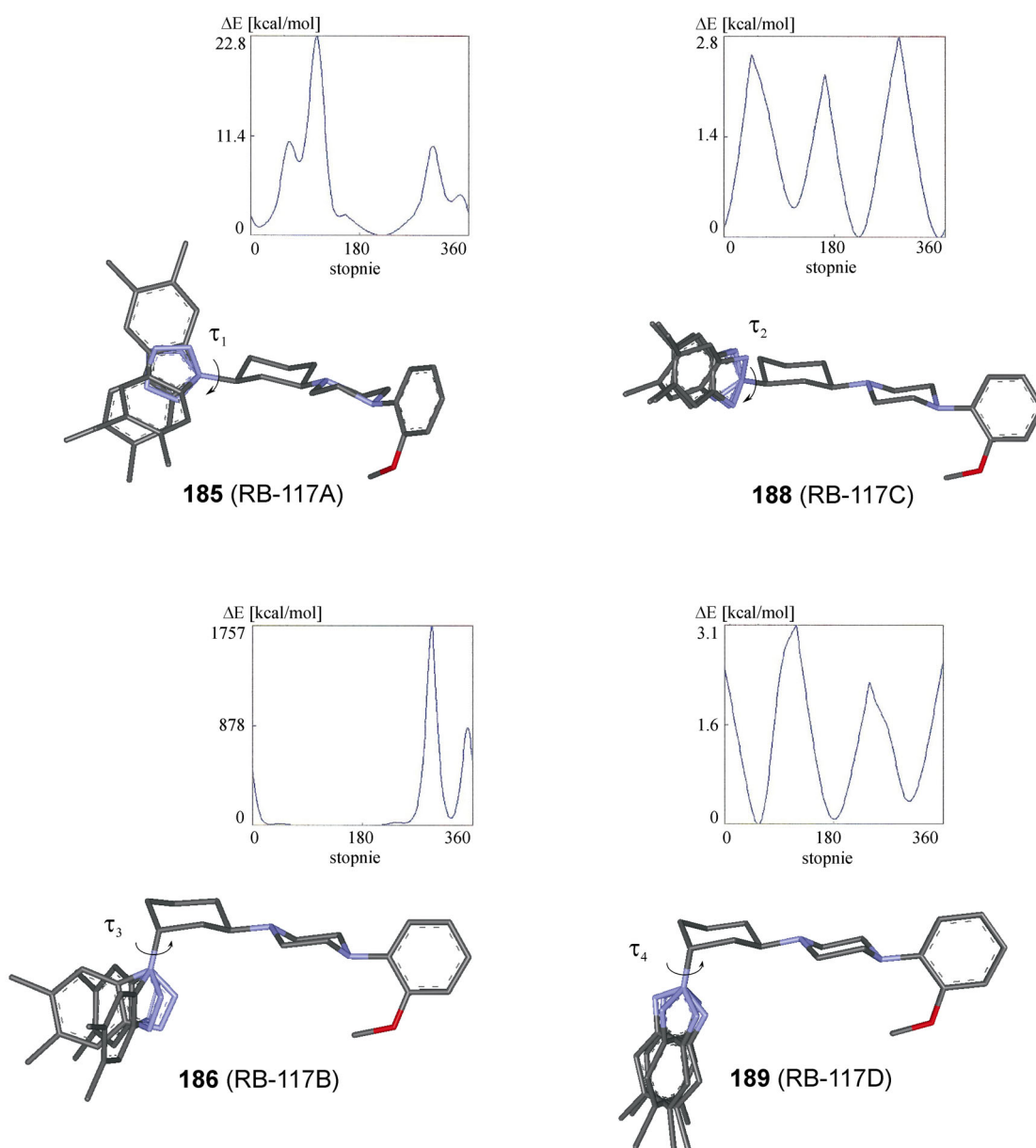
3.2.4. Analiza konformacyjna i dyskusja wyników

Jak już wspomniano na wstępie, zastosowanie 1,3-dipodstawionego pierścienia cykloheksanowego jako łącznika terminalnych fragmentów cząsteczki, wymusiło nieliniową geometrię pochodnych benzotriazolowych. Porównanie otrzymanych w analizie konformacyjnej kątów torsyjnych τ_1 i τ_2 wskazało, że fragmenty amidowe badanych stereoizomerów zajmują różne regiony, przy czym układ 1-benzotriazolu może eksplorować znacznie szerszą przestrzeń konformacyjną niż podstawiony symetrycznie przy atomie N2 (rys. 20).

Wysokie wartości powinowactwa do 5-HT_{1A}R, które wyznaczono dla pochodnych łańcuchowych (**178**, **181**, **184**), izomerów *cis* 1- i 2- benzotriazolu (**179**, **182**) oraz dla pochodnej 5,6-dimetylobenzotriazolu podstawionego w pozycji 1 (**185**) dowiodły, że w miejscu wiążącym 5-HT_{1A}R mogą być tolerowane także ligandy o geometrii nieliniowej.

Wprowadzenie do pierścienia benzotriazolu dwóch grup metylowych powodowało obniżenie powinowactwa tylko dla pochodnych 2-benzotriazolu **188** i **189**. Jest to prawdopodobnie skutkiem zarówno negatywnych oddziaływań sterycznych grup metylowych, a także ograniczeniem możliwości dopasowania podstawnika 2-benzotriazolowego w kieszeni 5-HT_{1A}R, co wynika z jego stosunkowo wąskiej przestrzeni konformacyjnej.

Z kolei zdecydowanie niższe powinowactwo zaobserwowane dla wszystkich izomerów *trans* sugeruje, że tego typu zgięta konformacja nie jest optymalnie akomodowana przez receptor 5-HT_{1A}.



Rysunek 20. Nałożenie konformerów **185**, **186**, **188** i **189** w lokalnych minimach energetycznych ilustrujące, m.in. różne obszary, które mogą być zajmowane przez terminalne podstawniki benzotriazolowe (a w szczególności przez jego pierścień sześciocłonowy). Analiza konformacyjna wykonana z zastosowaniem programu Molecular Modeling Pro Plus wersja 6.0.3 (ChemSw Inc.).

Podobnie jak w przypadku analizy powinowactwa do 5-HT_{1A}R, zależności struktura – aktywność w stosunku do 5-HT₇R, można przedyskutować, porównując powinowactwo: związków łańcuchowych w stosunku do „usztynionych” stereoisomerów *cis* do *trans*, analogów 1- do 2-podstawionego benzotriazolu oraz ocenić wpływ podstawienia układu benzotriazolowego dwoma grupami metylowymi. Ponadto warto także wyniki powinowactwa do 5-HT₇R związków z tej serii zestawić z aktywnością wykazywaną do 5-HT_{1A}R, jak też przeanalizować je w odniesieniu do przedstawionych w poprzednim rozdziale wyników aktywności *in vitro* pochodnych pirolidyny.

Generalnie w całej grupie pochodnych benzotriazolowych najwyższe wartości K_i (103–225 nM) do 5-HT₇R zostały wyznaczone dla wyjściowych pochodnych łańcuchowych: **178**, **181**, **184** i **187**. Wyniki te zatem, odzwierciedlają taki sam poziom powinowactwa, jaki charakteryzował ligandy MM-77 i NAN-190 (**7** i **8**) z tetrametylenowym łańcuchem, które były najaktywniejszymi z dotychczas testowanych ligandów 5-HT₇R i zostały użyte jako związki wzorcowe w badaniach pochodnych pirolidyny.

„Usztynienie” łącznika trójmetylenowego spowodowało obniżenie powinowactwa pozostałych pochodnych benzotriazolowych, a przedział wartości stałych K_i wyznaczonych dla wszystkich stereoisomerów mieścił się w granicach 206 – 1428 nM. Biorąc jednak pod uwagę wyniki otrzymane wcześniej w grupie pochodnych pirolidyny, gdzie odpowiednie łańcuchowe pochodne *o*-MePhP (**163** i **171**) posiadały powinowactwo 420 i 600 nM, a usztynienie liniowej geometrii związku powodowało utratę powinowactwa ($K_i > 10000$ nM), należy przyjąć, że hipoteza zgiętej konformacji bioaktywnej w 5-HT₇R została potwierdzona.

Analizując dalsze zależności struktura – aktywność do 5-HT₇R można zaobserwować, że stereoisomery *trans* obu pochodnych 1-benzotriazolowych **180** i **186**, charakteryzuje około dwukrotne pogorszenie aktywności w stosunku do analogów *cis*, a w przypadku 2-benzotriazolu stereoisomery **182** i **183** posiadają praktycznie porównywalną aktywność do 5-HT₇R. Co ciekawe, zmiana konfiguracji *cis* (**188**) na *trans* (**189**) dla pochodnych z układem 5,6-dimetylobenzotriazolu ponad dwukrotnie zwiększyła wartość powinowactwa związku **189** ($K_i = 377$ nM).

Modyfikacje terminalnego fragmentu benzotriazolowego, poprzez podstawienie dwoma grupami metylowymi powodowały około trzykrotny spadek powinowactwa izomerów *cis* **185** i *trans* **186**, co jest prawdopodobnie wywołane negatywnymi, sterycznymi oddziaływaniami między grupami metylowymi a kieszenią receptora 5-HT₇.

Z drugiej jednak strony, wspomniany już izomer (**189**) wykazywał wyższe powinowactwo do 5-HT₇R również od analogu **186** (z układem 5,6-dimetylobenzotriazolu

podstawionym przy atomie N1), co sugeruje, że w przypadku takiej konfiguracji podstawniki metylowe mogą być tolerowane i ich dalsze modyfikacje w pozycjach 5 i/lub 6 grupy benzotriazolowej są możliwe.

3.2.5. Wnioski

Podsumowując wyniki tego etapu badań, można zauważyć, że chociaż geometria odwzorowana zgietą konformacją stereoizomerów *cis* i *trans* jest lepiej tolerowana od liniowej w kieszeni wiążącej 5-HT₇R, nadal jednak odbiega od optymalnej. Niemniej jednak, wartości powinowactwa do 5-HT₇R otrzymane dla serii pochodnych benzotriazolu świadczą o poprawności przyjętego założenia.

Natomiast biorąc pod uwagę także rezultaty badań aktywności w poprzednio analizowanej grupie pochodnych pirolidyny, należy stwierdzić, że „usztynienie liniowe” struktury związku powoduje otrzymanie selektywnych ligandów 5-HT_{1A}R, które charakteryzują się wówczas największymi współczynnikami S_{7/1A}.

Tak więc ligandy o różnej geometrii wydają się być użytecznym narzędziem do przewidywania i modelowania potencjalnych oddziaływań z miejscem wiążącym receptorów.

Badania wpływu zmian geometrii związków na aktywność wewnętrzną do receptorów 5-HT_{1A} zostały opublikowane w pracy: Conformational Restriction in Novel NAN-190 and MP3022 Analogs and Their 5-HT(1A) Receptor Activity. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2006**, 339, 498–506.¹³⁶

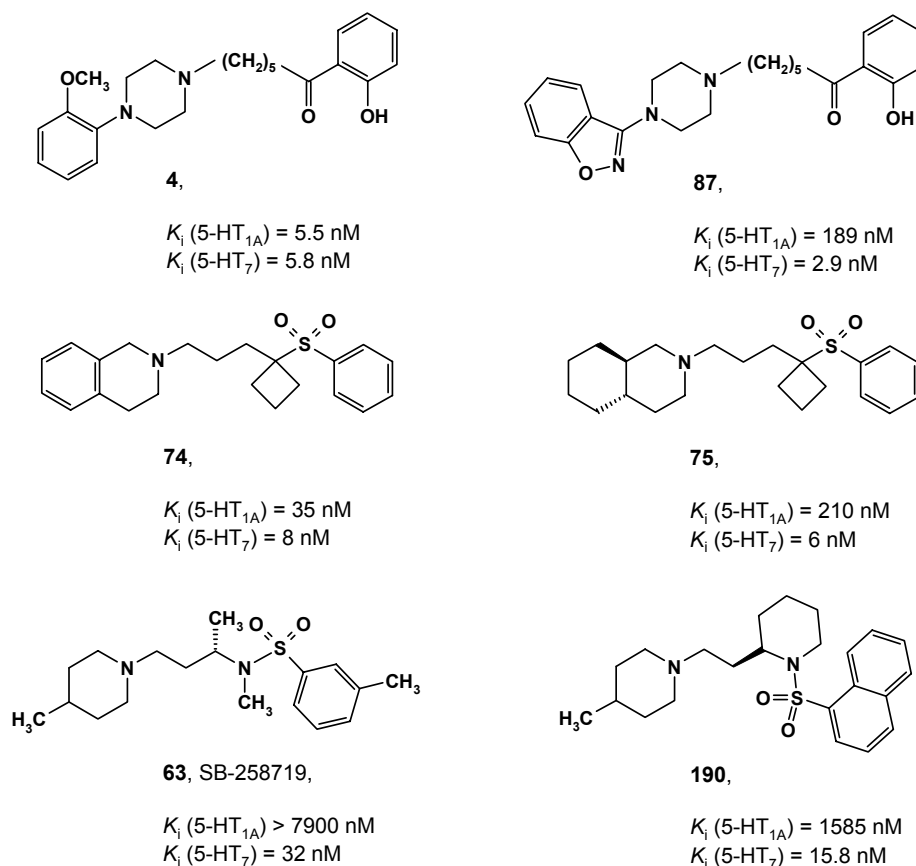
3.3. Pochodne arylosulfonylopiperydyny

3.3.1. Wstęp – związki pilotowe

Dążąc do uzyskania ligandów o wysokim powinowactwie i selektywności do 5-HT₇R, zaprojektowałem pilotową serię związków o zróżnicowanej strukturze chemicznej (**191–7**), uwzględniając dotychczas opublikowane rezultaty badań SAR nad selektywnymi ligandami 5-HT₇R. Na rysunku 21 przedstawiono struktury związków modelowych z wybranych publikacji, a na rysunku 22 propozycje nowych połączeń **191–7**.

W pierwszej kolejności w obrębie farmakoforowego układu arylopiperazyny związku **8** (NAN-190), w miejsce podstawnika 1-(2-metoksyfenylo)-piperazynowego zastosowałem grupę 3-piperazyn-1-ylobenzo[d]izoksazolową (**191–3**), wskazaną przez R. Perrone i wsp.,² jako modyfikację poprawiającą selektywność 5-HT₇/5-HT_{1A} (rys. 22, związki **4** i **87**).

Z drugiej strony, terminalny fragment amidowy zamieniłem na ugrupowanie fenylosulfonamidowe, wprowadzając je do struktur związków **192–7**. Fragment ten występuje w związkach badanych w firmie SmithKlineBeecham, które charakteryzują się bardzo wysokim powinowactwem i selektywnością oddziaływania z receptorem 5-HT₇ w stosunku do pozostałych podtypów receptorów serotoninowych (rys. 21, związki **63** i **190**).¹³⁰

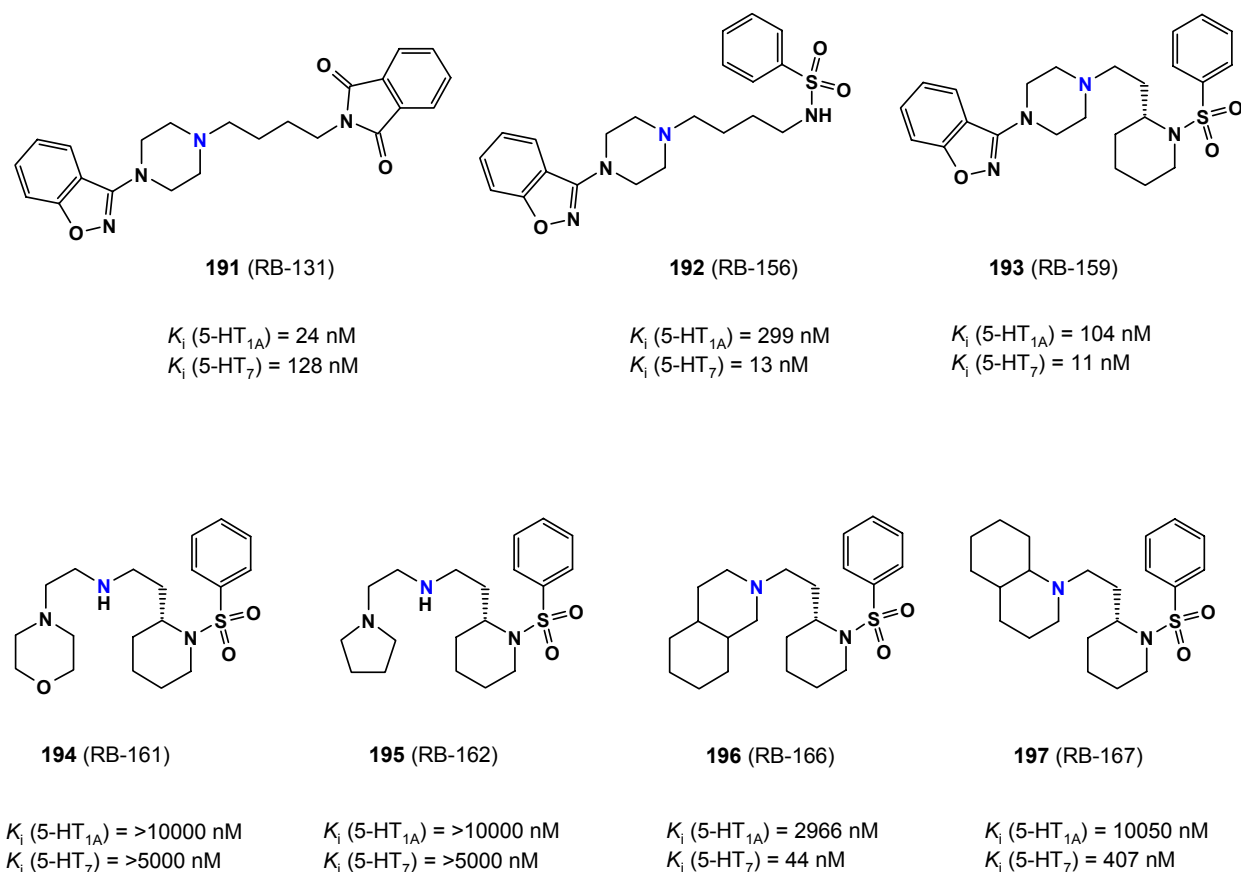


Rysunek 21. Struktury związków modelowych dla pilotowej serii związków.

Koncentrując się na łączniku alkilowym, w miejsce łańcucha *n*-butylowego zastosowałem fragment 2-etylopiperydynowy (**193–7**), który częściowo usztywnia strukturę i może przy zachowaniu częściowej swobody konformacyjnej warunkować preferencję niskoenergetycznych konformacji zgiętych liganda. Związek zawierający takie ugrupowanie (**190**) był badany w cytowanej wyżej pracy, jednak ze względu na nieco wyższe powinowactwo do 5-HT₇R pochodnej **190** z łącznikiem 2-etyleno-1-pirolidylowym zrezygnowano z syntezy jego kolejnych analogów.¹³⁰

Przeprowadziłem także bardziej radykalne zmiany w układzie aminowym, polegające na pozbawieniu go aromaticzności i rozerwaniu pierścienia piperazyny (**194** i **195**) lub zastąpieniu układem całkowicie uwodornionej chinoliny (**197**) i izochinoliny (**196**).

Ostatnia modyfikacja wynikała z prac Raubo i wsp., którzy wykazali, że związki z niearomatycznym fragmentem (4*aS*,8*aS*)-dekahydroizochinolinowym (**75**) cechuje wyższa selektywność do 5-HT₇R niż ich analogi z tetrahydroizochinoliną (THIQ) (**74**).⁸⁷



Rysunek 22. Pilotowa seria związków. Na niebiesko zaznaczono protonowane atomy azotu.

3.3.2. Analiza dokowania związków pilotowych do modelu receptora 5-HT₇

Obecnie w chemii leków ugruntowaną pozycję zajmuje modelowanie molekularne, jako technika wspomagająca chemika eksperymentatora w wyborze celów syntetycznych. Dysponując opracowanym w ZChL wirtualnym modelem białka 5-HT₇R, wszystkie zaprojektowane związki pilotowe (**191–7**) zostały automatycznie zadokowane do tego receptora (szczegóły w rozdz. 4.2.2). Podstawowym oddziaływaniem, które zostało potwierdzone eksperymentalnie, jest wiązanie jonowe pomiędzy atomem tlenu grupy karboksylowej łańcucha bocznego Asp3.32 a protonowanym atomem azotu części aminowej liganda. Oddziaływanie to zostało zdefiniowane jako jedyny więź farmakoforowy we wszystkich dokowaniach. Analiza sekwencji aminokwasów w miejscu wiążącym wirtualnego modelu receptora 5-HT₇ wskazuje, że szczególne podobieństwo do innych receptorów monoaminowych występuje głównie w obrębie kieszeni I (pomiędzy helisami 3-6), a różnice dotyczą głównie kieszeni II (pomiędzy helisami 7-3).⁶⁶

Związki **191** i **192** z fleksyjnym łańcuchem *n*-butylowym kotwiczyły się w miejscu wiążącym, w sposób analogiczny jaki wyznaczono wcześniej dla innych pochodnych LCAP,⁶⁶ przyjmując tylko nieznacznie zgiętą konformację (rys. 23 B, C; str. 63). Część aminowa, tj. fragment piperazynobenzizoksazolu, mieścił się w kieszeni I, oddziałując z aminokwasami helis 3 i 6. Znajdujący się po przeciwnej stronie cząsteczki układ ftalimidowy lub fenylosulfonamidowy penetrował do kieszeni II, przy czym karbonyłowy atom tlenu w **191**, w przeciwieństwie do sulfonamidowego, był w stanie utworzyć mocne wiązanie wodorowe z Tyr7.43.

Częściowe usztywnienie struktury pierścieniem 2-piperydyny wymuszające bardziej zgiętą konformację związku **193** spowodowało, że przy zadokowanym w kieszeni I fragmencie piperazynobenzizoksazolu, podstawnik fenyłowy z grupy sulfonamidowej odgiął się również w stronę tej kieszeni, oddziałując z Phe6.51 (rys. 23 D). W rezultacie w kompleksie z receptorem większość specyficznych oddziaływań cząsteczki pochodziła od aminokwasów zlokalizowanych w obrębie helis 3-6, przy czym sam układ benzizoksazolu tworzył silne wiązanie wodorowe pomiędzy atomem tlenu a Ser5.42 oraz poprzez pierścień aromatyczny oddziaływania typu CH- π z Phe6.52.

W rozwiązaniach otrzymanych dla kolejnych pochodnych **194** i **195** cząsteczki związków zostały zadokowane także w granicach kieszeni I, ale terminalne ugrupowanie sulfonamidowe było skierowane do prawej strony miejsca wiążącego, czyli odwrotnie niż odpowiednie fragmenty imidu/sulfonamidu w pochodnych benzizoksazolowych (rys. 23 G, H). W tym wypadku wiązanie wodorowe z Ser5.42 zostało utworzone przez tlen sulfonamidowy, a jego podstawnik fenyłowy oddziaływał z Phe6.52.

Wyniki dokowania związku **196** pokazały, że jego cząsteczka jest zdecydowanie przesunięta w stronę kieszeni II i w jej obrębie zachodzą główne oddziaływania. Sulfonamidowy atom tlenu znajdował się w pobliżu Tyr7.43, a podstawnik fenyłowy mógł tworzyć oddziaływania typu π - π z Phe3.28, natomiast układ perhydroizochinoliny był w sąsiedztwie Trp6.48 i Phe6.52 (rys. 23 E).

Pochodna perhydrochinoliny – związek **197** – kotwiczył się bliżej centralnej części miejsca wiążącego receptora, zachowując przy tym główny kierunek potencjalnych oddziaływań i atom tlenu z ugrupowania sulfonamidowego był zwrócony w stronę Tyr7.43 (rys. 23 F). Jednak jego pierścień aromatyczny został odgięty w dół, w stosunku do pozycji tego podstawnika znalezionej dla analogu **196**, lokując się pomiędzy aromatycznymi pierścieniami Phe6.51 i Tyr7.43. Ponadto sama geometria układu perhydrochinoliny powodowała jego odmienne ułożenie w kieszeni wiążącej, umożliwiając jedynie nieliczne i tylko niespecyficzne oddziaływania natury hydrofobowej.

Jak już wspomniano w części teoretycznej (rozdz. 2.4, str. 46), w oparciu o wyniki dokowań zróżnicowanej grupy standardowych ligandów do wirtualnego modelu 5-HT₇R zostały zdefiniowane dwa modele farmakoforowe: powinowactwa i selektywności. Analiza sekwencji aminokwasów w miejscu wiążącym 5-HT₇R wskazywała, że szczególne podobieństwo do innych receptorów monoaminowych występuje głównie w obrębie kieszeni I (pomiędzy helisami 3-6), a różnice dotyczą głównie kieszeni II (pomiędzy helisami 7-3).⁶⁶ W obserwowanych kompleksach z receptorem dla grupy tzw. ligandów wieloreceptorowych dominowały interakcje z aminokwasami kieszeni I, natomiast dla selektywnych antagonistów 5-HT₇R główne specyficzne oddziaływania zachodziły w kieszeni wiążącej II (szczególnie z Phe3.28, Arg7.36 i Tyr7.43; rys. 23 A – część niebieska).⁶⁶ Znaczący wpływ na powinowactwo i/lub selektywność do receptora 5-HT₇ miała geometria układu terminalnego amidu/imidu/sulfonamidu (wzajemne ułożenie przestrzenne pierścienia aromatycznego i tlenu grupy karbonylowej/sulfonowej), która determinowała odpowiednie dopasowanie się do wyżej wymienionych aminokwasów. Optymalną geometrię, która pozwalała na równoczesne oddziaływanie typu π - π z Phe3.28, jon- π z Arg7.36 oraz wiązanie wodorowe z Tyr7.43, zidentyfikowano m.in. dla pochodnych arylosulfonamidoalkiloaminowych. Te oddziaływania (wraz z mostkiem solnym do Asp3.32) uniezależniały ligandy od konieczności interakcji z aminokwasami helis 3-6 (rys. 23 A – część czerwona).⁶⁶

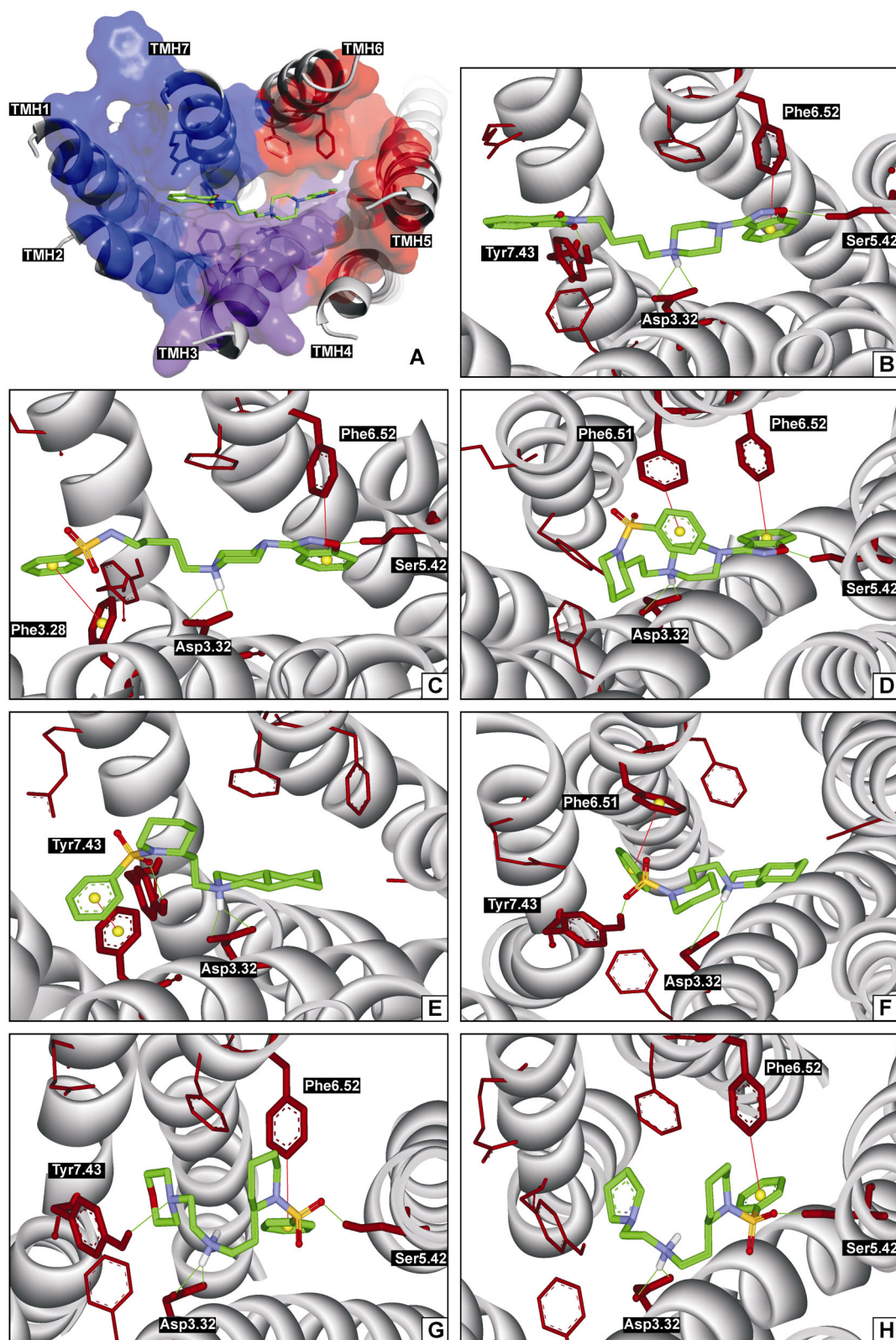
Analizując wyniki dokowania pilotowej serii związków, w odniesieniu do sformułowanych wcześniej, w oparciu o model 5-HT₇R hipotez farmakoforowych, można było założyć, że pochodne benzizoksazolowe **191–3**, kotwicząc się w obrębie kieszeni I, mają szansę wykazywać aktywność do 5-HT₇R, ale będą raczej ligandami nieselektywnymi (rys. 23 B–D). Z kolei, sposób wiązania zidentyfikowany dla związku **196** – analogiczny do

opisanego wcześniej dla wysokoaktywnych ligandów arylosulfonamidoalkiloaminowych, mógł wskazywać zarówno na prawdopodobieństwo posiadania wysokiego powinowactwa, jak i selektywności do 5-HT₇R (rys. 23 E).

W kompleksie utworzonym przez związek **197** oddziaływania specyficzne z aminokwasami kieszeni II były również możliwe, ale inna była pozycja pierścienia aromatycznego, jak też geometria fragmentu perhydrochinoliny (części aminowej związku), stąd też prognoza *ex ante* jego aktywności/selektywności mogła być obciążona większym błędem (rys. 23 F). Połączenia z rozerwanym pierścieniem piperazyny **194** i **195** tworzyły kompleksy z receptorem wiążąc się głównie w kieszeni I. Jednak sposób ich wiązania (częścią sulfonamidową skierowaną w prawo) był odwrotny w stosunku do rozwiązań znalezionych zarówno dla znanych ligandów, jak i pozostałych pilotowych związków. Tak więc podobnie jak w przypadku pochodnej **197**, trudno było dokładnie przewidzieć jakie powinowactwo/selektywność będą charakteryzowały te połączenia w rzeczywistości (rys. 23 G, H).

Podsumowując otrzymane rezultaty, największe prawdopodobieństwo posiadania wysokiej aktywności do 5-HT₇R należało przypisać związkom **191–3** oraz **196**. Z drugiej strony, rozwiązania znalezione dla pochodnych **194**, **195** i **197**, świadczące o odmiennym sposobie wiązania, nie dawały jednoznacznych wskazówek o ich potencjalnej aktywności. Dlatego też zsyntezowałem wszystkie zaprojektowane pochodne, a następnie metodą *in vitro* wyznaczono ich powinowactwo do receptorów 5-HT₇ oraz 5-HT_{1A}. Ponadto eksperymentalna weryfikacja wyników teoretycznych dla wszystkich związków dawała możliwość sprawdzenia poprawności skonstruowanego w ZChL modelu receptora 5-HT₇ i jego przydatności w projektowaniu nowych ligandów.

Badania radioizotopowe wykazały, że tak jak przewidywano, wysoką aktywność ($K_i < 50$ nM) do receptorów 5-HT₇ wykazywały połączenia: **192**, **193** i **196**, a nieco niższą wartość $K_i = 128$ nM wyznaczono dla pochodnej **191**. Co więcej, zgodnie z miejscem dokowania w kieszeni I modelu receptora, wszystkie pochodne benzizoksazolowe posiadały również znamienne aktywność do 5-HT_{1A}R, co potwierdziło ich względnie niską selektywność oddziaływań. Natomiast pochodna perhydroizochinoliny nie wiązała się zupełnie do receptora 5-HT_{1A}, co także zostało odzwierciedlone w modelu 5-HT₇R poprzez zakotwiczenie cząsteczki w warunkującej selektywność oddziaływań kieszeni II. Średnia wartość powinowactwa charakteryzowała związek **197** ($K_i = 407$ nM), przy czym brak powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} ($K_i > 10000$ nM) świadczył o wysokiej selektywności; natomiast związki **194** i **195** nie wiązały się zarówno do receptorów 5-HT₇, jak i 5-HT_{1A}.¹³⁸



Rysunek 23. Sposób wiązania pilotowej serii związków do modelu 5-HT₇R, przedstawiony na przykładzie najlepszych kompleksów ligand-receptor. Pogrubiono aminokwasy tworzące specyficzne oddziaływania z ligandami. Zieloną linią zaznaczono wiązanie jonowe i wiązania wodorowe, a czerwoną linią – oddziaływania układów aromatycznych. (A) – powierzchnia miejsca wiążącego; kieszeń pomiędzy helisami 3-6 oznaczono na czerwono, pomiędzy helisami 7-3 na niebiesko. Część wspólna (TMH3) jest przedstawiona na fioletowo. Związki: (A i B) 191, (C) 192, (D) 193, (E) 196, (F) 197, (G) 194, (H) 195.

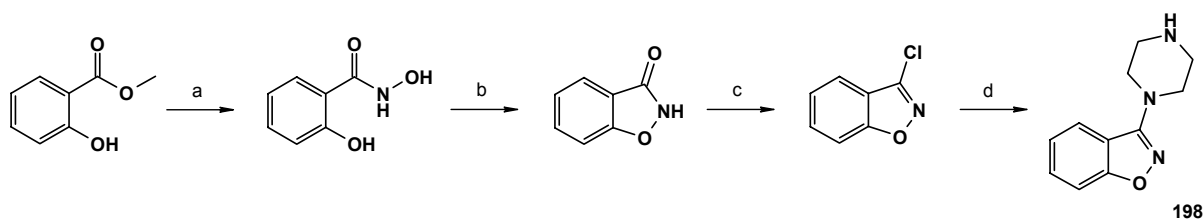
Otrzymane wyniki potwierdziły użyteczność modelu receptora 5-HT₇R w weryfikacji zaprojektowanych struktur i na ich podstawie wytypowałem związki **193** i **196** jako ligandy modelowe dla dwóch serii pochodnych: benzizoksazolopiperazyny i perhydroizochinoliny oraz ze względu na wysoką selektywność związek **197** jako wyjściowy dla grupy połączeń, w których bardziej radykalnie modyfikowałem terminalny fragment aminowy.

3.3.3. Seria benzizoksazolopiperazyny

W obrębie tej grupy zsyntezowałem 7 nowych połączeń **199–205** (tj. RB-211–214, RB-187, RB-179 oraz RB-175), będących analogami **193** (RB-159), w których modyfikowano głównie aryłowy fragment ugrupowania fenylosulfonamidowego. W przypadku pochodnej **199** (RB-175) łącznik 2-etyleno-1-piperydylowy zastąpiono 2-metyleno-1-piperydylowym, co spowodowało skrócenie odległości pomiędzy terminalnymi fragmentami związku.

3.3.3.1. Synteza

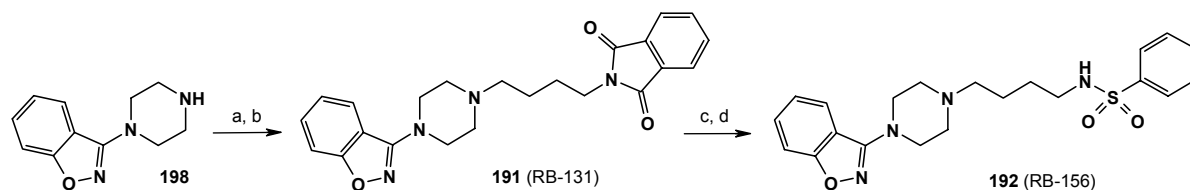
Wyjściowy 3-(piperazyn-1-ylo)benzo[*d*]izoksazol **198** otrzymano w wyniku wieloetapowej syntezy przedstawionej na schemacie 4. W reakcji salicylanu metylu z hydroksyloaminą otrzymano kwas 2-hydroksybenzohydroksamowy, który następnie poddano cyklodehydratacji w obecności karbonylodiimidazolu. Otrzymany benzo[*d*]izoksazol-3-on, pod wpływem tlenochlorku fosforu w środowisku zasadowym, przekształcono w 3-chlorobenzo[*d*]izoksazol, a następnie zgrzewano z piperazyną w temperaturze 130°C.^{139, 140}



Schemat 4. (a): NH₂OH · HCl, 6M NaOH, EtOH, temp. wrzenia, 1h; (b): karbonylodiimidazol, THF, temp. wrzenia, 1h; (c): POCl₃, Et₃N, temp. wrzenia, 16h; (d): piperazyna, 130°C, 1h.

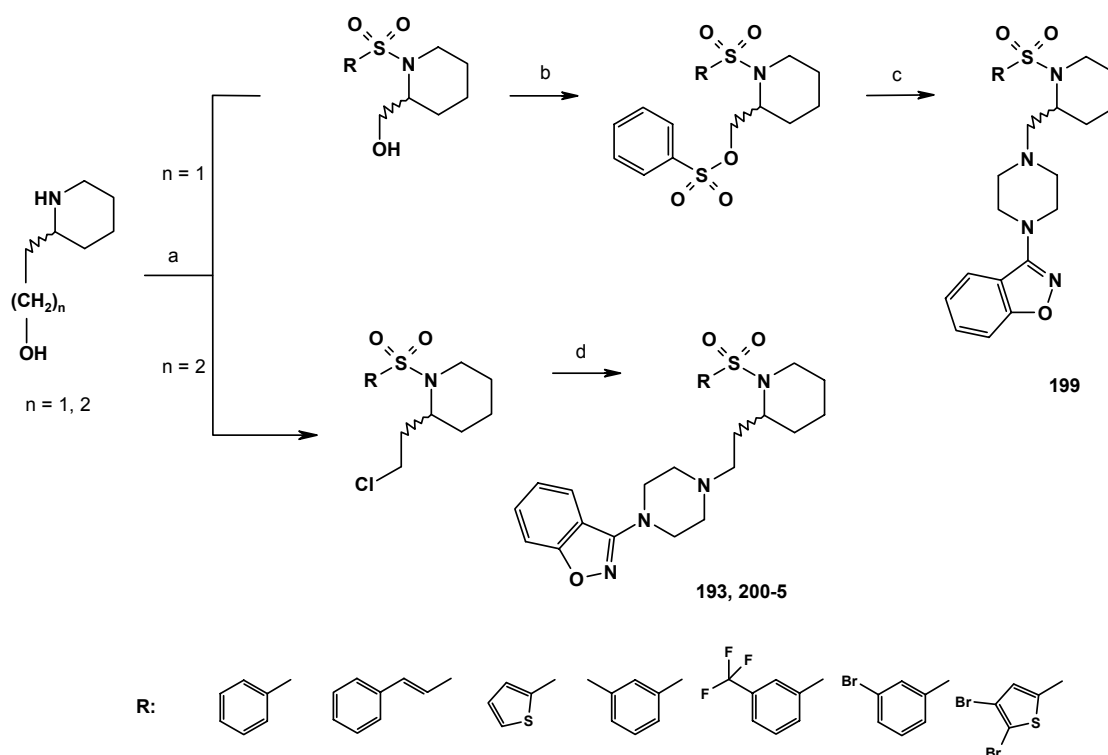
Związki **191** i **192** z serii związków pilotowych otrzymano przeprowadzając kilkietapową syntezę (schemat 5). 3-(Piperazyn-1-ylo)benzo[*d*]izoksazol w reakcji z 1,4-dibromobutanem w obecności katalitycznej ilości eteru 18-korona-6 utworzył bromek 8-benzo[*d*]isoksazol-3-ylo-8-aza-5-azoniaspiro[4.5]dekanu. W kolejnym etapie, w wyniku reakcji bromku czwartorzędowej soli amoniowej z ftalimidem uzyskano **191**, który następnie

przekształcono metodą Gabriela w 4-(4-benzo[d]izoksazol-3-yl)piperazyn-1-yl)butyloaminę. Otrzymaną aminę potraktowano chlorkiem benzenosulfonylowym w obecności trójetylaminy i wyizolowano docelowy produkt **192**.



Schemat 5. (a): 1,4-dibromobutan, K_2CO_3 , 18-korona-6, 95% etanol, 24h; (b): ftalimid, K_2CO_3 , 18-korona-6, ksylen, 22h; (c): 1). $N_2H_4 \cdot H_2O$, etanol, 1h; 2). HCl, 4h; (d): benzenosulfochlordek, Et_3N , $CHCl_3$, $20^\circ C$, 4h.

Syntezę pochodnych **193** i **200–5** rozpoczęto od reakcji piperydyno-2-etanolu z dwukrotnym nadmiarem molowym odpowiednich pochodnych chlorków kwasów sulfonowych. Następnie otrzymane chlorki alkilowe poddano reakcji z 3-piperazyn-1-ylbenzo[d]izoksazolem w środowisku zasadowym, w obecności jodku sodu jako katalizatora. Otrzymane docelowe sulfonamidy wyizolowano jako mieszaniny racemiczne.



Schemat 6. (a): RSO_2Cl , diizopropylamina, $CHCl_3$, $20^\circ C \rightarrow$ temp. wrzenia, 12h; (b): $PhSO_2Cl$, diizopropylamina, $CHCl_3$, temp. wrzenia, 6h; (c): 3-piperazyn-1-ylbenzo[d]izoksazol, NaI, K_2CO_3 , DMF, temp. wrzenia, 6–18h; (d): amina, NaI, K_2CO_3 , CH_3CN , temp. wrzenia, 12h.

W celu otrzymania związku **199** powyższą procedurę zmodyfikowano (schemat 6). Syntezę rozpoczęto od reakcji piperydyno-2-metanolu z równomolową ilością odpowiednich






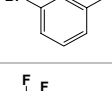

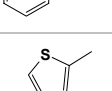
pochodnych chlorków kwasów sulfonowych. Następnie bez wyizolowywania otrzymanego alkoholu, do mieszaniny reakcyjnej dodano równomolową ilość benzenosulfochlorku. Tak otrzymany ester kwasu benzenosulfonowego przeprowadzono w docelowy produkt **199** (mieszanina racemiczna) w reakcji z 3-piperazyn-1-ylobenzo[d]izoksazolem w obecności jodku sodu jako katalizatora.

Struktura nowych związków została potwierdzona widmami ^1H NMR, a wolne zasady zostały przeprowadzone w chlorowodorki i w tej postaci użyte do badań *in vitro*. Masa cząsteczkowa soli została ustalona na podstawie analizy elementarnej.

3.3.3.2. Badania powinowactwa *in vitro* i dyskusja wyników

Dla otrzymanych związków określono powinowactwo do serotoninowych receptorów 5-HT₇ i 5-HT_{1A}, a dane zamieszczono w tabeli 4. Współczynnik selektywności wiązania wyliczono z równania: $S_{1A/7} = K_i(5\text{-HT}_{1A})/K_i(5\text{-HT}_7)$.

Tabela 4. Seria pochodnych benzoizoksazolopiperazyny.

Związek	n	R ¹	K _i [nM]		S _{1A/7}
			5-HT _{1A}	5-HT ₇	
193 (RB-159)	1		105	11	9,5
199 (RB-175)	0		1356	143	9,5
200 (RB-211)	1		197	5,6	35
201 (RB-212)	1		246	1	246
202 (RB-213)	1		481	21	23
203 (RB-179)	1		43	4,5	9,5
204 (RB-187)	1		66	2,7	24
205 (RB-214)	1		112	1,5	75

Wyjściowy związek **193** z fragmentem 3-piperazyn-1-ylobenzo[d]izoksazolowym posiadał wysokie powinowactwo do 5-HT₇R i nieco niższe, lecz też wysokie do podtypu 5-HT_{1A}R i przez to charakteryzował się umiarkowaną selektywnością $S_{1A/7} = 9,5$. Wprowadzenie podstawnika metylowego w pozycję C-3 pierścienia fenyloвого (pochodna **200**) spowodowało wzrost powinowactwa do 5-HT₇R i jednocześnie prawie dwukrotne obniżenie aktywności do 5-HT_{1A}R, co zwiększyło selektywność do $S_{1A/7} = 35$. Jeszcze bardziej korzystnie wpłynęło zastosowanie podstawnika *m*-Br, ponieważ związek **201** wykazywał bardzo wysokie powinowactwo do 5-HT₇R i większy spadek aktywności do 5-HT_{1A}R. Z kolei wprowadzenie grupy *m*-CF₃ (**202**) wywołało obniżenie powinowactwa do obu receptorów, natomiast odsunięcie pierścienia aromatycznego od grupy sulfonowej w strukturze związku **203** ponad dwukrotny wzrost powinowactwa zarówno do 5-HT₇R, jak i 5-HT_{1A}R. Zamiana podstawnika fenyloвого na tienyloвого w związku **204** skutkowała wysokim powinowactwem do obu badanych receptorów ($K_i = 2,7$ i 66 nM, odpowiednio do 5-HT₇R i 5-HT_{1A}R). Podobnie jego 5,6-dibromopochodna **205** charakteryzowała się także bardzo wysoką aktywnością do 5-HT₇R ($K_i = 1,5$ nM), przy nieco niższym powinowactwie do receptorów 5-HT_{1A} ($K_i = 112$ nM). Skrócenie odległości między fragmentem aromatycznym a zasadowym atomem azotu, poprzez zastosowanie łącznika 2-metyleno-1-piperidynowego (**199**), przyczyniło się do osłabienia ($K_i = 197$ nM dla 5-HT₇R) bądź znacznej utraty ($K_i = 1356$ nM dla 5-HT_{1A}R) powinowactwa do badanych receptorów.

Podsumowując otrzymane wyniki, z wyjątkiem związku **199**, wszystkie nowe połączenia posiadały bardzo wysokie powinowactwo do receptorów 5-HT₇, które mieściło się w granicach 1–21 nM. Aktywność tych połączeń do 5-HT_{1A}R była niższa, tak że badane ligandy wykazywały od 9-cio do ponad 200-krotną preferencję wiązania z receptorem 5-HT₇R.

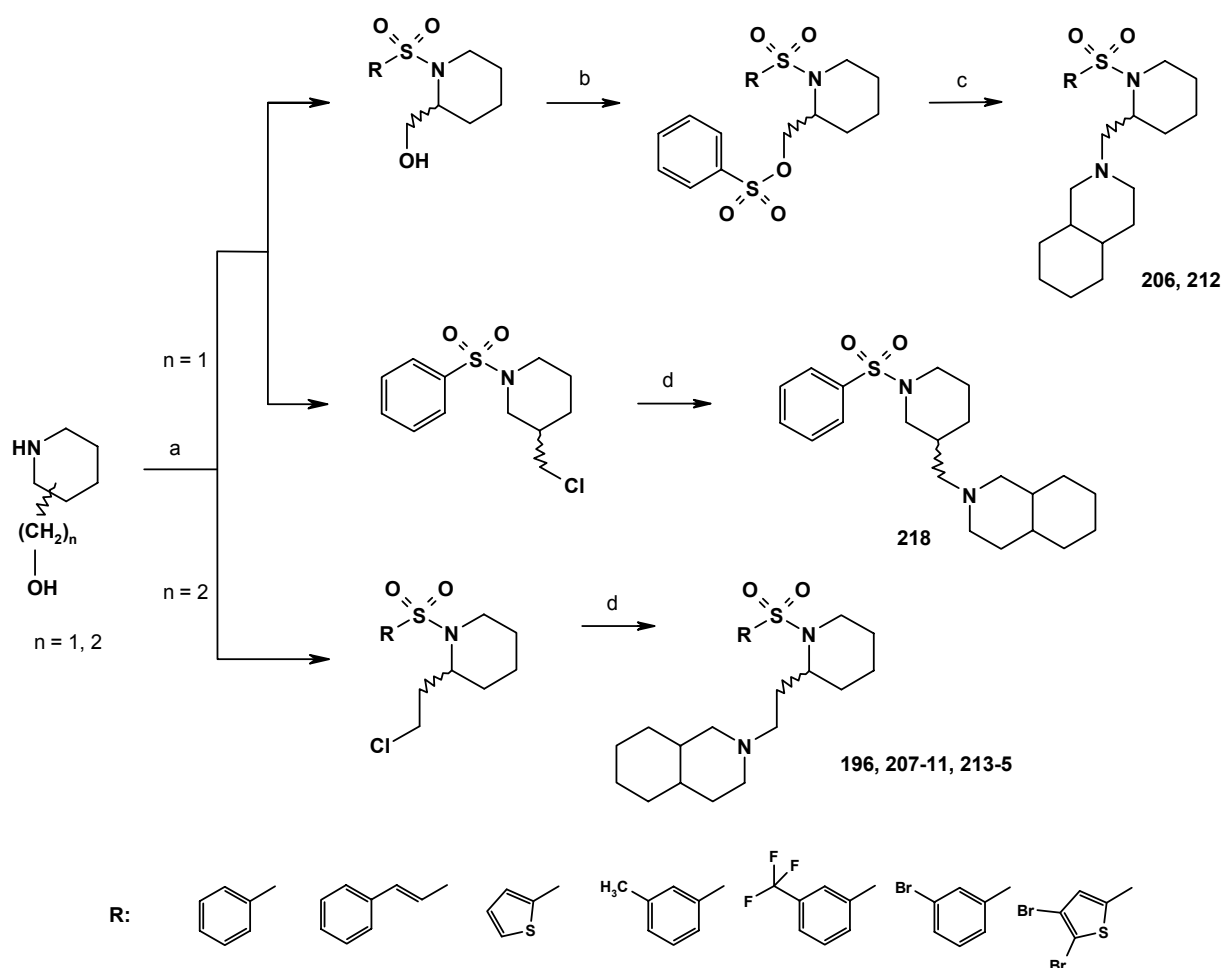
3.3.4. Seria perhydroizochinoliny

Seria pochodnych perhydroizochinoliny obejmuje zsyntezowane przez mnie nowe związki **196** i **206–19**, w których modyfikowałem zarówno arylovery fragment ugrupowania fenylosulfonamidowego (**207–15**), jak też łącznik pomiędzy terminalnymi fragmentami: arylovery i aminowym (**206**, **212** i **216–9**). Podobnie jak w serii benzizoksazolopiperidyny, w miejsce pierścienia fenyloвого zastosowałem różne podstawniki aromatyczne. Natomiast modyfikacje struktury łącznika polegały na jego skróceniu (zastosowanie 2-metylopiperidyny – **206** i **212**), zmianie geometrii poprzez wprowadzenie 3-metylopiperidyny (związek **218**) lub ugrupowania benzyloвого (związek **219**) oraz pozbawieniu usztywnienia (łańcuch *n*-pentan-1-olu; **216**, **217**). W przypadku dwóch ostatnich połączeń struktura terminalnego fragmentu

sulfonamidowego została dodatkowo uproszczona do pierścienia benzenowego, a funkcję sulfonamidową zastąpiła podstawiona w łańcuchu grupa hydroksylowa.

3.3.4.1. Synteza

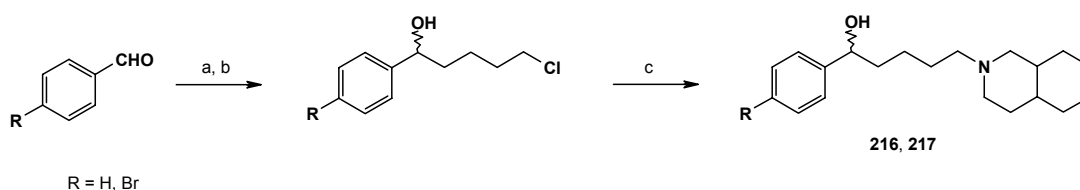
Pochodne **196**, **207–11**, **213–5**, **218** otrzymano w wyniku dwuetapowej syntezy, tj. reakcji piperydyno-2-etanolu lub piperydyno-3-metanolu z dwukrotnym nadmiarem molowym odpowiednich pochodnych chlorków kwasów sulfonowych, a następnie otrzymane chlorki alkilowe poddano reakcji z perhydroizochinoliną w środowisku zasadowym, w obecności jodku sodu jako katalizatora (schemat 7). Otrzymane docelowe sulfonamidy wyizolowano jako mieszaniny racemiczne. Dla związku **213** o wysokim powinowactwie i selektywności względem 5-HT₇R, w celu otrzymania poszczególnych izomerów osobno **214** (*S*) i **215** (*R*), przeprowadzono analogiczny ciąg reakcji, używając jako substratów wyjściowych *R*- i *S*-piperydyno-2-etanolu.



Schemat 7. (a): RSO₂Cl, diizopropylamina, CHCl₃, 20°C, 6h; (b): PhSO₂Cl, diizopropylamina, CHCl₃, temp. wrzenia, 6h; (c): perhydroizochinolina, NaI, K₂CO₃, DMF, temp. wrzenia, 6–18h; (d): amina, NaI, K₂CO₃, CH₃CN, temp. wrzenia, 12h.

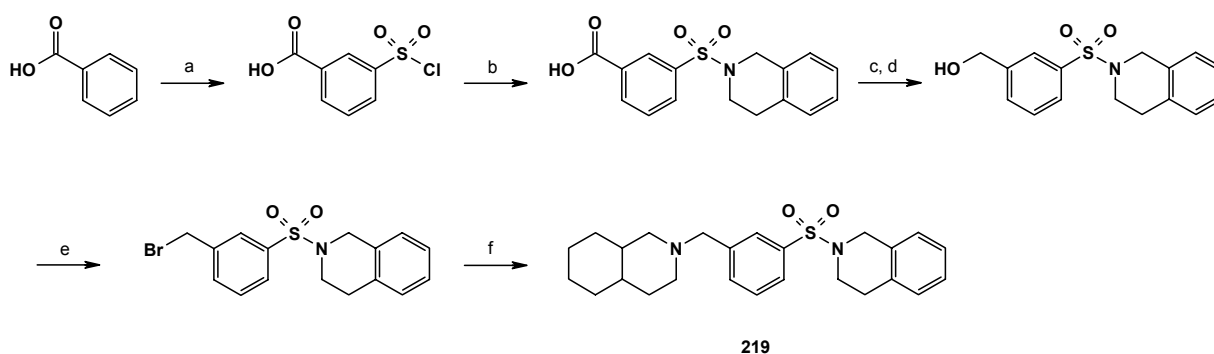
Pochodne 2-metylopiperidyny **206**, **212** uzyskano w trójetapowej sekwencji reakcji. Syntezę rozpoczęto od reakcji piperidyno-2-metanolu z równomolową ilością odpowiednich pochodnych chlorków kwasów sulfonowych, a następnie bez wyizolowywania produktu, do mieszaniny reakcyjnej dodano równomolową ilość benzenosulfochlorku. W kolejnym etapie otrzymane estry kwasu benzenosulfonowego w reakcji z perhydroizochinoliną, w obecności jodku sodu jako katalizatora, tworzyły docelowe związki **206** i **212** jako mieszaniny racemiczne.

Do syntezy pochodnych 1-fenylpentan-1-olu (**216** i **217**) wykorzystano reakcję związków magnezoorganicznych Grignarda z aldehydami (schemat 8).¹⁴¹ W pierwszym etapie w roztworze suchego eteru wygenerowany *in situ* bromek 4-chlorobutylmagnezowy poddano oddziaływaniu z odpowiednimi pochodnymi benzaldehydu. Następnie w wyniku kwaśnej hydrolizy powstałych soli magnezowych uzyskano chlorki alkilowe jako mieszaniny racemiczne. Produkty końcowe otrzymano w reakcji *N*-alkilowania *trans*-perhydroizochinoliny odpowiednimi chlorkami alkilowymi w środowisku zasadowym, w obecności jodku sodu jako katalizatora.



Schemat 8. (a): $\text{Cl}(\text{CH}_2)_4\text{MgBr}$, Et_2O , temp. wrzenia, 2h; (b): H_2O , 25% HCl , 0°C , 1h; (c): K_2CO_3 , NaI , CH_3CN , temp. wrzenia, 12h.

Pochodną tetrahydroizochinoliny **219** otrzymano w sześćoetapowej sekwencji reakcji (schemat 9).



Schemat 9. (a): HSO_3Cl , $0^\circ\text{C} \rightarrow$ temp. wrzenia, 5h; (b): 1,2,3,4-tetrahydroizochinolina, THF, 20°C , 2h; (c): $\text{ClO}_2\text{CH}_2\text{CHCCl}_3$, *N*-etyldiizopropylaminy, CH_2Cl_2 , 0°C , 2h; (d): NaBH_4 , THF, $0 \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 16h; (e): CBr_4 , tryfenylofosfina, CH_2Cl_2 , $0 \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 2h; (f): perhydroizochinolina, K_2CO_3 , NaI , CH_3CN , temp. wrzenia, 3h.

Na początku za pomocą kwasu chlorosulfonowego podstawiono w pozycję *meta* pierścienia aromatycznego kwasu benzoowego grupę chlorosulfonową, którą następnie poddano reakcji w łagodnych warunkach z 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliną. W kolejnym etapie zredukowano grupę karboksylową borowodorkiem sodu, a powstały alkohol poddano bromowaniu przy udziale czterobromku węgla. Końcowy produkt uzyskano na drodze *N*-alkilowania *trans*-perhydroizochinoliny, otrzymanym w poprzednim etapie bromkiem alkilu w środowisku zasadowym, w obecności jodku sodu jako katalizatora.

Struktura nowych związków została potwierdzona widmami ^1H NMR, a wolne zasady zostały przeprowadzone w fumarany i w tej postaci użyte do badań *in vitro*. Masa cząsteczkowa soli została ustalona na podstawie analizy elementarnej.

3.3.4.2. Badania powinowactwa *in vitro* i dyskusja wyników

Wyniki powinowactwa do receptorów 5-HT₇ i 5-HT_{1A} przedstawiono w tabeli 5. Stałe K_i wyznaczone do 5-HT₇R dla związku wyjściowego z podstawnikiem fenylowym **196** oraz jego *m*-CH₃ (**207**) i *m*-Br (**208**) analogów charakteryzowały się porównywalnymi wartościami (34–44 nM). Wśród pochodnych, których modyfikacje dotyczyły części arylovej fragmentu fenylosulfonamidowego, najniższą aktywność ($K_i = 146$ nM) wykazywała pochodna **209** z grupą *m*-CF₃, a najwyższą ($K_i = 8$ nM) związek **213** z grupą 5,6-dibromotienylołą. Niepodstawiony analog **211** tego ostatniego połączenia posiadał około 16-krotnie niższe powinowactwo.

Oddalenie pierścienia fenylovego od ugrupowania sulfonamidowego (**210**) spowodowało, ponad dwukrotne osłabienie powinowactwa do 5-HT₇R ($K_i = 95$ nM) w stosunku do wyjściowej pochodnej **196**.



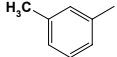
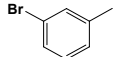
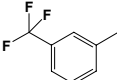
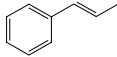



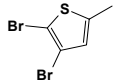
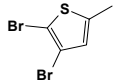
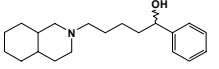
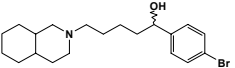
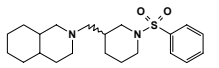
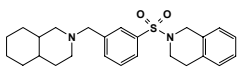
Skrócenie odległości między fragmentem aromatycznym a zasadowym atomem azotu w związkach z łącznikiem 2-metyleno-1-piperidylowym **206** ($K_i = 1225$ nM) i **212** ($K_i > 10000$ nM) przyczyniło się również do znacznego obniżenia bądź utraty powinowactwa.

Podobnie negatywnie na wysokość aktywności do 5-HT₇R wpłynęły zmiany w geometrii fragmentu sulfonamidowego, gdzie jako łączniki zostały wykorzystane układy 3-metylopiperidydy (**218**) i toluenu (**219**).

Uproszczenie struktury terminalnego fragmentu sulfonamidowego i zastosowanie labilnego łańcucha pięciowęglowego z grupą hydroksylową w miejsce sulfonamidowej, okazało się także niekorzystne i znacznie obniżyło aktywność pochodnej **216**. Natomiast wprowadzenie lipofilowego podstawnika Br w pozycję *para* pierścienia benzenowego

w analogu **217** około 7-krotnie (w stosunku do **216**) zwiększyło wartość powinowactwa do 5-HT₇R.

Tabela 5. Seria pochodnych perhydroizochinoliny.

Związek	Struktura			K _i [nM]		S _{1A/7}
	n	R	*	5-HT _{1A}	5-HT ₇	
196 (RB-166)	2		RS	2966	44	67
206 (RB-173)	1		RS	>10000	1225	>8,2
207 (RB-207)	2		RS	>10000	38	>263
208 (RB-208)	2		RS	>10000	34	>294
209 (RB-209)	2		RS	>10000	146	>68
210 (RB-177)	2		RS	>10000	126	>79
211 (RB-185)	2		RS	>10000	95	>105
212 (RB-189)	1		RS	>10000	10000	>1
213 (RB-236)	2		RS	612	8	76
214 (RB-234)	2		S	886	175	5
215 (RB-235)	2		R	509	8	64
216 (RB-237)				2671	637	4
217 (RB-239)				673	94	7,2
218 (RB-233)				1154	720	1,6
219 (RB-246)				295	307	1

Wszystkie badane połączenia były mieszaninami racemicznymi, a w przypadku związków biologicznie czynnych, poszczególne enancjomery często różnią się wykazywaną aktywnością. Dlatego dodatkowo zsyntezowałem oddzielnie izomery *S* (**214**) i *R* (**215**) związku **213**, który wśród pochodnych serii perhydroizochinoliny charakteryzował się najwyższym powinowactwem do 5-HT₇R. Co ciekawe, wartość K_i wyznaczona do 5-HT₇R dla izomeru *R* (**215**) oraz dla racematu **213** była identyczna, natomiast enancjomer **214** z łącznikiem (*S*)-2-etyleno-1-piperodylowym wykazywał prawie 22-krotnie niższe powinowactwo.

Wartości wyznaczonych stałych K_i do 5-HT_{1A}R, dla większości związków przekraczały 10 000 nM, wskazując na zupełny brak oddziaływań z tym podtypem receptora. W zakresie średnich aktywności, od 295–886 nM, wiązały się głównie połączenia posiadające atomy bromu w części arylowej ugrupowania sulfonamidowego, tj. **213–5** i **217** oraz połączenie **219**.

Porównując wyniki powinowactwa otrzymane dla obu serii pochodnych arylosulfonamidowych, można zauważyć, że wyższa aktywność do 5-HT₇R cechowała związki z układem benzizoksazolu, natomiast połączenia z perhydroizochinoliną wykazywały generalnie większą selektywność oddziaływań pomiędzy receptorami 5-HT₇ i 5-HT_{1A}.

3.3.5. Modyfikacje terminalnego fragmentu aminowego

Ostatnia grupa otrzymanych przeze mnie związków zawiera 5 pochodnych 1-benzenosulfonylo-2-etylopiperodyny, w których zastosowałem bardziej radykalne zmiany w strukturze terminalnego fragmentu aminowego poprzez wprowadzenie ugrupowań pozbawionych grupy aromatycznej w pobliżu zasadowego atomu azotu.

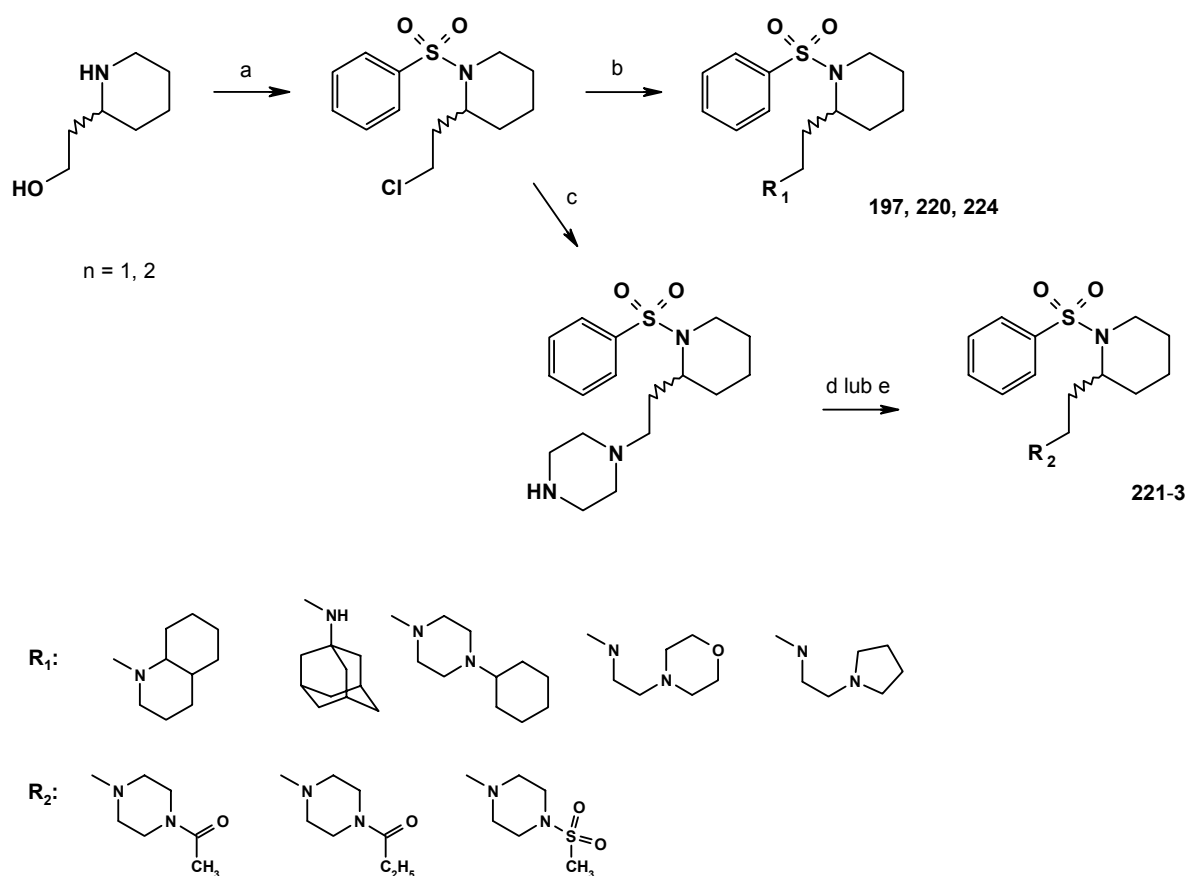
Kierunek tych modyfikacji wynikał z publikacji innych autorów,^{87, 130} i był podyktowany chęcią znalezienia innego niż perhydroizochinolina niearomatycznego układu farmakoforowego z funkcją aminową, co może powodować przewagę specyficznych oddziaływań związku w tzw. selektywnej części kieszeni wiążącej receptora 5-HT₇.⁶⁶

3.3.5.1. Synteza

Związki z serii pilotowej **194** (RB-161) i **195** (RB-162) oraz pochodne **197**, **220** i **224** uzyskano w reakcji piperodyno-2-etanolu z dwukrotnym nadmiarem molowym benzenosulfochlorku, a następnie otrzymane chlorki alkilowe poddano reakcji z odpowiednimi aminami w środowisku zasadowym, w obecności jodku sodu jako katalizatora. Docelowe sulfonamidy wyizolowano jako mieszaniny racemiczne.

W celu uzyskania związków **221–3** 2-(2-chloroetylo)-1-(fenylosulfonylo)piperydynę zgrzewano z piperazyną w temperaturze 130°C, a następnie uzyskaną aminę drugorzędową poddano acylowaniu odpowiednimi bezwodnikami kwasowymi lub chlorkiem metanosulfonowym.

Struktura nowych związków została potwierdzona widmami ^1H NMR, a wolne zasady zostały przeprowadzone w chlorowodorki lub fumarany i w tej postaci użyte do badań *in vitro*. Masa cząsteczkowa soli została ustalona na podstawie analizy elementarnej.



Schemat 10. (a): PhSO_2Cl , diizopropylamina, CHCl_3 , temp. wrzenia, 6h; (b): amina, NaI , K_2CO_3 , CH_3CN , temp. wrzenia, 12h; (c): piperazyna, 130°C, 2h; (d): $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ lub $(\text{C}_2\text{H}_5\text{CO})_2\text{O}$, temp. wrzenia, 0,4h; (e): $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, 20°C, 6h.

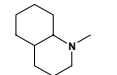
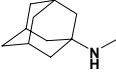
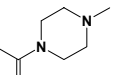
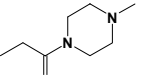
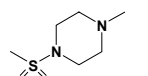
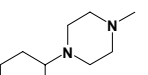
3.3.5.2. Badania powinowactwa *in vitro* i omówienie wyników

Wartości powinowactwa wyznaczone do receptorów 5-HT₇ i 5-HT_{1A} zamieszczono w tabeli 6. Jako związek wyjściowy wybrałem pochodną perhydrochinoliny **197**, badaną w grupie pilotowych połączeń, która cechowała się średnim powinowactwem do 5-HT₇R ale równocześnie była całkowicie pozbawiona aktywności wobec 5-HT_{1A}R. Zastosowanie jej izomerycznego analogu – perhydroizochinoliny jako terminalnego układu aminowego

w poprzedniej serii związków, bardzo korzystnie wpłynęło na selektywność oddziaływań względem 5-HT_{1A}R, nie zmieniając wysokiego poziomu aktywności do receptora 5-HT₇.

Niestety, próba znalezienia innego niż perhydroizochinolina niearomatycznego układu farmakoforowego z funkcją aminową, nie przyniosła pozytywnych wyników. Wszystkie związki w tej serii, a więc pochodne z *N*-podstawionym fragmentem piperazynowym: grupą cykloheksylową **224**, acylową **221** i **222** oraz mesylową **223**, a także pochodna **220** zawierająca ugrupowanie aminy drugorzędowej podstawione pierścieniem adamantanu, nie wiązały się do żadnego z badanych receptorów ($K_i > 4\ 000$ nM).

Tabela 6. Seria połączeń z modyfikacjami fragmentu aminowego.

Związek	R	K_i [nM]		$S_{1A/7}$
		5-HT _{1A}	5-HT ₇	
197 (RB-167)		10000	407	25
220 (RB-198)		>10000	5000	>2
221 (RB-226)		>10000	>10000	≈1
222 (RB-227)		>10000	7738	>1,3
223 (RB-228)		>10000	5446	>1,8
224 (RB-201)		>10000	4043	>2,5

Podsumowując otrzymane wyniki, spośród połączeń zsyntezowanych w obrębie całej grupy pochodnych arylosulfonylopiperydiny, tylko związki z dwóch pierwszych serii, tj. benzioksazolopiperazyny i perhydroizochinoliny można zaliczyć do aktywnych ligandów 5-HT₇R.

3.3.6. Poszerzony profil receptorowy pochodnych arylosulfonylopiperydyny

Definicja selektywności receptorowej zakłada, że ligand wiąże się preferencyjnie do jednej populacji białek w stężeniu tak niskim, że jest ono niewystarczające, aby wywoływać odpowiedź biologiczną ze strony innych receptorów. Oznacza to konieczność wyznaczenia maksymalnie szerokiego profilu receptorowego, określającego powinowactwo danego związku do różnych klas i typów białek wiążących. W rzeczywistości jednak bardzo rzadko wyznaczana jest tzw. selektywność bezwzględna (definiowana wtedy jako specyficzność) i najczęściej określa się jedynie względną wartość tego parametru w odniesieniu do kilku najbliższych spokrewnionych typów receptorów, jako że w większych stężeniach głównie one mogą oddziaływać z badanym ligandem.¹⁴²

Podczas określania selektywności w oparciu o wartości powinowactwa trzeba wziąć pod uwagę szeroki zakres aktywności *in vitro*, jaki można zidentyfikować dla danego liganda do danego receptora przy użyciu różnych systemów eksperymentalnych (zastosowany radioligand, materiał biologiczny), o czym świadczy przegląd blisko 50 000 wartości K_i dostępnych w bazie PDSP (<http://pdsp.med.unc.edu/pdsp.php>). Duże znaczenie ma także sama wysokość wyznaczonego powinowactwa, bowiem jej poziom determinuje, czy obserwowane w badaniach *in vivo* na zwierzętach efekty behawioralne są związane z oddziaływaniem związku tylko na jedną populację receptorów.

Do receptorów monoaminergicznych, których analiza sekwencji aminokwasów miejsc wiążących wskazuje, że są one spokrewnione z 5-HT₇R (i do których antagoniści 5-HT₇R często wykazują znaczące powinowactwo) należą – oprócz 5-HT_{1A}R – także receptory serotoninowe typu 5-HT_{2A} i 5-HT₆, receptor dopaminowy D₂ oraz α_1 -adernergiczny. W związku z tym w celu poszerzenia profilu receptorowego pochodnych arylosulfonylopiperydyny, dla wszystkich ligandów wykazujących wysokie powinowactwo do 5-HT₇R ($K_i < 150$ nM) wyznaczono wartości K_i do receptorów serotoninowego 5-HT_{2A} i dopaminowego D₂. Powinowactwo do receptorów α_1 -adrenergicznych zostało określone dla dwóch związków wyjściowych, tj. dla serii benzizoksazolopiperazyny – związku **192** i perhydroizochinoliny – związku **196**. Natomiast aktywność *in vitro* do receptorów 5-HT₆ została wstępnie oszacowana (wg uproszczonej procedury) dla czterech wybranych połączeń: **187**, **193**, **196**, **211**.

3.3.6.1. Badania powinowactwa

Wartości stałych K_i do receptorów serotoninowych 5-HT_{2A}, dopaminowych D₂ i α_1 -adrenergicznych wyznaczono w oparciu o standardowe metody wypierania przez badany związek specyficznego radioliganda z homogenatu tkankowego mózgu szczura, zgodnie

z zamieszczoną poniżej tabelą 7. Wartości K_i wyliczono jako średnią z trzech niezależnych eksperymentów, stosując stężenia badanej substancji w zakresie 10^{-10} – 10^{-3} M.

Tabela 7. Materiał biologiczny i radioligandy zastosowane do wyznaczenia powinowactwa do receptorów 5-HT_{2A}, D₂ i α_1

Receptor	Radioligand	Struktura mózgu
5-HT _{2A}	[³ H] ketanseryna	kora
D ₂	[³ H] spiperon	prążkowie
α_1	[³ H] prazosyna	kora

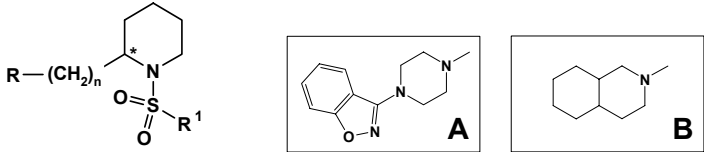


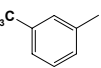
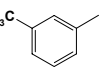
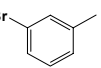
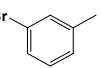
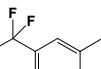
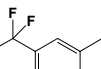
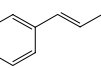
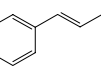


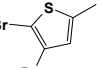
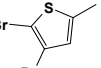
Aktywność do receptorów serotoniny 5-HT₆ określono szacunkowo według uproszczonej procedury, wyznaczając procent wypierania radioliganda ([³H]-LSD) z komórek HEK 293 ze stabilną ekspresją ludzkiego receptora 5-HT₆ przez badany związek w stężeniu 1 μ M. Wszystkie dane zestawiono w tabeli 8.

3.3.6.2. Omówienie wyników

Analizując względną selektywność związków dwóch serii pochodnych arylosufonylopiperydyny tylko wobec receptorów 5-HT₇ i 5-HT_{1A}, można zaobserwować, że wartości parametru $S_{1A/7}$ wyznaczone dla analogów z serii perhydroizochinoliny były zwykle kilkakrotnie (3–8 razy) wyższe od wyliczonych dla ich bezpośrednich odpowiedników w serii benzizoksazolopiperazyny. Wyjątek stanowią połączenia zawierające atomy bromu w pierścieniach aryłowych układu sulfonylopiperydyny, tj. związki **201** i **206** oraz **214** i **213**, które charakteryzowała porównywana selektywność. Jednak, jak wynika z porównania odpowiednich danych przedstawionych w tabeli, pochodne benzizoksazolopiperazyny o bardzo wysokim powinowactwie do 5-HT₇R posiadały nadal znamiennej aktywność do 5-HT_{1A}R (dla **201** K_i = 246 nM i dla **214** K_i = 112 nM). Powoduje to, że w badaniach *in vivo* wykluczenie zmian w zachowaniu zwierząt wynikających z oddziaływania z receptorem 5-HT_{1A} będzie niemożliwe. Co więcej, te same wnioski można wyciągnąć w stosunku do pozostałych pochodnych benzizoksazolopiperazyny, które cechowało wysokie powinowactwo również do innych badanych typów receptorów.

Z kolei wyniki otrzymane dla połączeń z serii perhydroizochinoliny świadczą o ich bardzo wysokiej selektywności, ponieważ wszystkie badane ligandy nie wykazywały istotnej aktywności wobec innych niż 5-HT₇R populacji receptorów.

Tabela 8. Poszerzony profil receptorowy arylosulfonamidowych ligandów 5-HT₇R otrzymanych w serii pochodnych benzizoksazolu i perhydroizochinoliny.

									
Związek	R	R ¹	5-HT ₇	5-HT _{1A}	S _{1A/7}	5-HT _{2A}	D ₂	5-HT ₆	α ₁
193 (RB-159)	A		11	105	9,5	19	12	20%	20
196 (RB-166)	B		44	2966	67	6000	6970	12%	8000
211 (RB-211)	A		5,6	197	35	18	140	NT	NT
207 (RB-207)	B		38	>10000	>263	3630	2858	NT	NT
201 (RB-212)	A		1	246	246	39	46	NT	NT
208 (RB-208)	B		34	>10000	>294	2460	6440	NT	NT
213 (RB-213)	A		21	481	23	131	295	NT	NT
209 (RB-209)	B		146	>10000	68	>10000	9016	NT	NT
179 (RB-179)	A		4,5	43	9,5	68	28	NT	NT
210 (RB-177)	B		126	>10000	>79	2804	>10000	NT	NT
204 (RB-187)	A		2,7	66	24	16	33	54%	NT
211 (RB-185)	B		95	>10000	>105	2930	1816	0%	NT
214 (RB-214)	A		1,5	112	75	45	35	NT	NT
213 (RB-236)	B		8	612	76	1621	1547	NT	NT

3.3.7. Wnioski

Rezultaty badań powinowactwa ligandów z grupy pochodnych arylosulfonamidowych są zgodne z przesłankami, wynikającymi z prowadzonych w naszym Zakładzie prac nad modelami receptora 5-HT₇ i opracowanymi na jego podstawie farmakoforami powinowactwa i selektywności. Potwierdziły one przewidzianą selektywność pochodnych

perhydroizochinoliny nie tylko względem 5-HT_{1A}R, lecz także innych pokrewnych receptorów monoaminowych. Jak bowiem obserwowano w kompleksach ligand-receptor, dla grupy selektywnych antagonistów 5-HT₇R (oraz dla związku **196**) przeważały oddziaływania specyficzne z aminokwasami kieszeni II, a oddziaływania z zakonserwowanym w rodzinie GPCR klastrem aromatycznym helisy 6 były nieliczne. W związku z tym, brak aromatycznych grup w pobliżu protonowanego atomu azotu w strukturze pochodnych z serii perhydroizochinoliny, decydował o ich specyficznym oddziaływaniu w tzw. selektywnej części kieszeni wiążącej receptora 5-HT₇.

Wieloreceptorowy profil pochodnych benzizoksazolopiperydyny także został prawidłowo przewidziany wynikami dokowań związków **192** i **193** do modelu 5-HT₇R, gdzie większość specyficznych oddziaływań cząsteczki pochodziła od aminokwasów zlokalizowanych w obrębie helis 3-6, czyli w wykazującej największą homologię z innymi receptorami monoaminowymi kieszeni I.

Powyższe rezultaty stanowią zatem eksperymentalne potwierdzenie poprawności skonstruowanego w ZChL modelu 5-HT₇R i jego użyteczności w projektowaniu związków o pożądanej selektywności.

3.4. Nowe ligandy a modele farmakoforowe 5-HT₇R

3.4.1. Wstęp

Przedstawione w części teoretycznej modele farmakoforowe ligandów 5-HT₇R (rozdz. 2.4) można zaklasyfikować do dwóch kategorii tzw. *ligand-based* i *structure-based* w zależności od zastosowanego podejścia do ich konstrukcji. Strategia *ligand-based* polega na znalezieniu wspólnych cech związków poprzez nałożenie bezpośrednio na siebie trójwymiarowych struktur uznanych za reprezentację ich bioaktywnych konformacji. W przypadku związków „fleksyjnych” najczęściej przyjmuje się, że rodzina niskoenergetycznych konformacji (otrzymana eksperymentalnie lub obliczona metodami analizy konformacyjnej) odpowiada bioaktywnej, która oddziałuje w miejscu wiążącym.

Głównym ograniczeniem tego podejścia jest fakt, że tworząc model farmakoforowy oparty tylko na nakładaniu wspólnych cech strukturalnych ligandów, zakłada się wspólne miejsce i sposób wiązania tych związków. Natomiast w przypadku zróżnicowanych chemicznie ligandów nie można wykluczyć, że mogą one oddziaływać z różnymi częściami domeny wiążącej. Dlatego też strategia *structure-based* wykorzystująca analizę oddziaływań ligandów bezpośrednio w receptorze, prowadzi do zidentyfikowania topologii specyficznych punktów miejsca wiążącego i przez to może bardziej trafnie przewidywać sposoby wiązania zróżnicowanej grupy związków. W tym podejściu kluczowe znaczenie dla otrzymanych wyników ma jakość modelu receptora, co przy braku danych eksperymentalnych (najlepiej dane krystalograficzne struktury białka) powoduje, że będąc raczej ogólnym przybliżeniem rzeczywistości, może nieprecyzyjnie oddawać interakcje ligand-receptor. Stąd też, podczas tworzenia modeli farmakoforowych receptorów, dla których nie ma danych krystalograficznych, stosowane jest głównie podejście *ligand-based*, sprawdzające się zwłaszcza dla związków o podobnych strukturach. Ponadto, obecnie coraz częstsza praktyką jest interaktywne użycie obu metod, dostarczających komplementarnych wyników analizy interakcji w kompleksie liganda z receptorem.

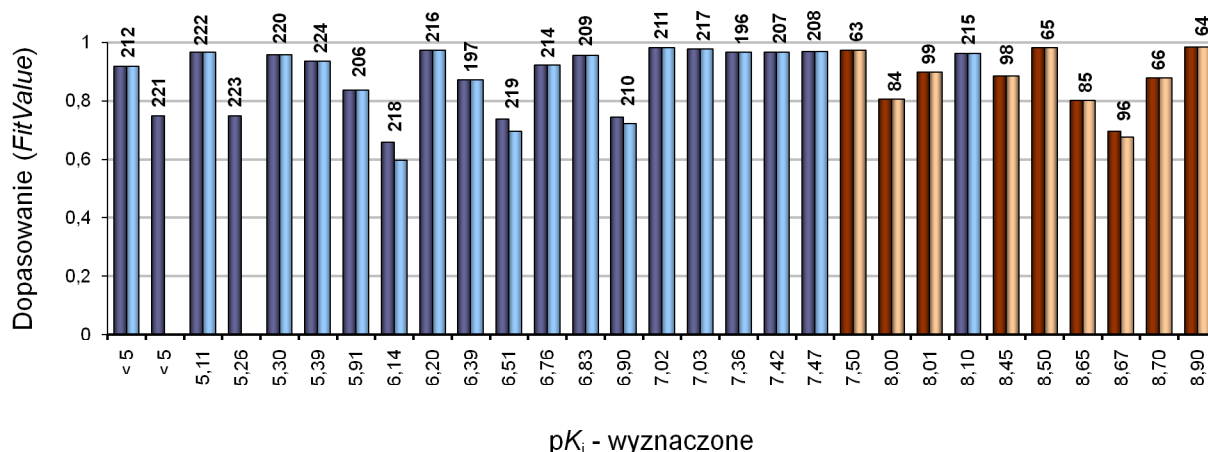
Hipotezy farmakoforowe dla antagonistów 5-HT₇R opracowane w ZChL zostały wygenerowane przy zastosowaniu podejścia *structure-based*.⁶⁶ Strategia tych badań różniła się od powszechnie stosowanego algorytmu wykorzystującego wyniki dokowań do pojedynczej konformacji modelu białka tylko kilku związków, umieszczanych manualnie w arbitralnie wybranym przez autorów miejscu wiążącym. W naszym podejściu opracowana została procedura w pełni automatycznego fleksyjnego dokowania do populacji konformacyjnej modelu receptora, która znajduje optymalne położenie i geometrię danego liganda w najbardziej dopasowanej do niego konformacji miejsca wiążącego. Wykorzystanie dużej grupy strukturalnie zróżnicowanych związków, pozwoliło na wyodrębnienie dwóch

obszarów w kieszeni wiążącej receptora 5-HT₇R i zidentyfikowanie odmiennych wzorów oddziaływań dla antagonistów selektywnych i nieselektywnych. Na podstawie tych wyników zostały zatem zdefiniowane modele farmakoforowe: „powinowactwa” – opisującego cechy związku wystarczające dla posiadania aktywności do 5-HT₇R i „selektywności”, który uszczegółowił elementy w strukturze istotne dla specyficznego oddziaływania z 5-HT₇R.

Ponieważ badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej koncentrowały się na poszukiwaniu selektywnych ligandów, otrzymane wyniki (szczególnie dla grupy sulfonamidowych pochodnych perhydroizochinoliny) wymagały odniesienia do powyższego modelu selektywności.

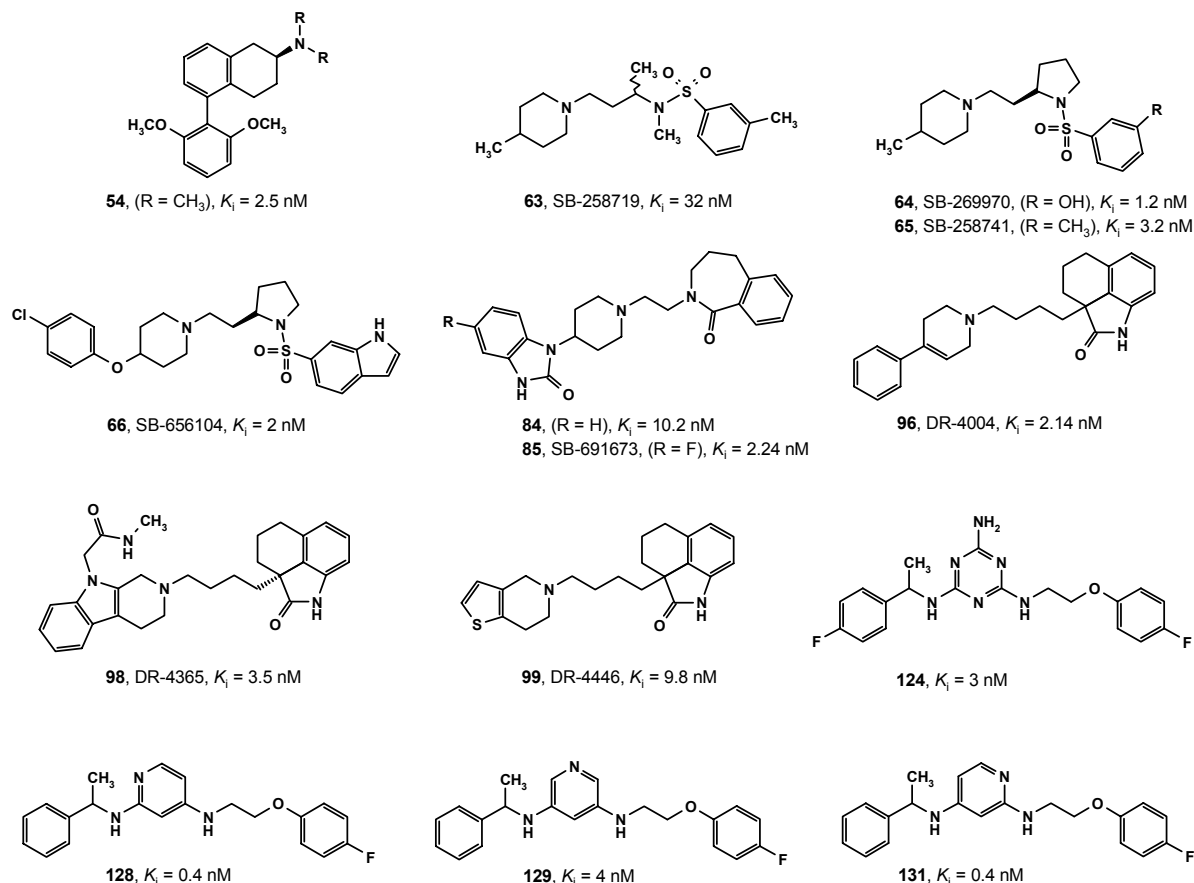
3.4.2. Farmakofor selektywności *structure-based* a pochodne perhydroizochinoliny

W pierwszym etapie zostały odwzorowane relacje przestrzenne elementów farmakoforowych modelu selektywności za pomocą (dostępnego od niedawna w ZChL) pakietu Discovery Studio Client v.2.5.0.9164 firmy Acclerys.¹⁴³ Następnie, trójwymiarowe reprezentacje związków były dopasowywane do modelu protokołem *Ligand Pharmacophore Mapping*. Biorąc po uwagę fakt, że konformacje bioaktywne często posiadają energię wyższą od globalnego minimum, badane związki mapowano jako populacje konformacji, uprzednio wygenerowane (± 20 kcal) z użyciem procedury *Diverse Conformation Generation*. Oprócz pochodnych perhydroizochinoliny (**196**, **206–219**, tab. 5, str. 71), analizowano także serię sulfonamidowych połączeń z modyfikacjami fragmentu aminowego (**197**, **220–224**, tab. 6, str. 74), celem sprawdzenia dyskryminujących własności modelu (odrzućanie połączeń nieaktywnych).



Rysunek 24. Wyniki mapowania nowych związków **196**, **197**, **206–224** (kolor niebieski) oraz znanych ligandów **63–66**, **84**, **85**, **96**, **98**, **99** (kolor czerwony) do co najmniej trzech (*ciemniejsze słupki*) i czterech (*jaśniejsze słupki*) cech farmakoforowych zrekonstruowanego modelu selektywności.

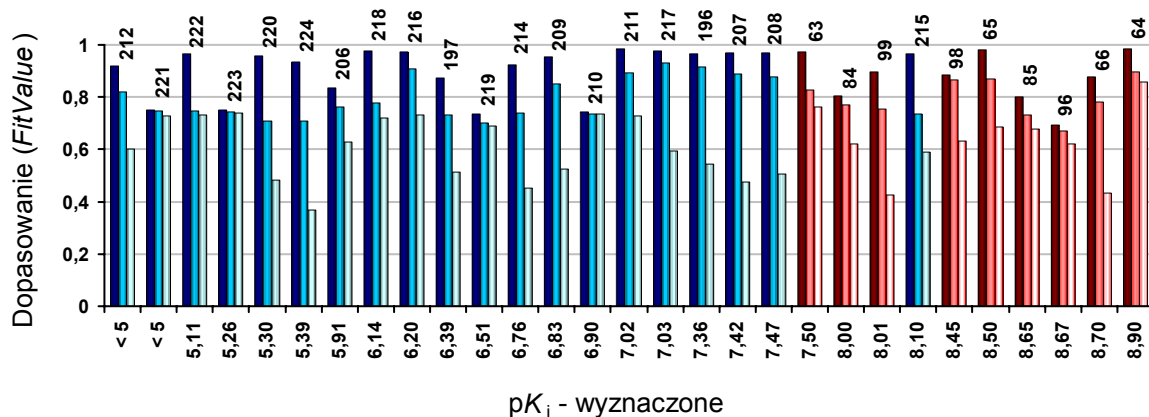
Jak wspomniano w części teoretycznej (str. 46) hipoteza selektywności, opracowana wg podejścia *structure-based*, definiowała cztery cechy, przy czym odpowiednia kombinacja trzech z nich (PI, AR1 oraz HBA1 lub HYD/AR2) wystarcza do selektywnego oddziaływania z 5-HT₇R. Rysunek 24 przedstawia wyniki mapowania związków **196**, **197**, **206–224**, oraz ligandów **63–66**, **84**, **85**, **96**, **98**, **99**, wybranych spośród struktur użytych pierwotnie do wygenerowania źródłowego modelu (rys. 25), zarówno do czterech (*MaxOmitFeat* = 0), jak i do trzech (*MaxOmitFeat* = 1) cech farmakoforowych.



Rysunek 25. Seria treningowa selektywnych ligandów 5-HT₇R użytych do wygenerowania pierwotnej hipotezy selektywności w oparciu o strategię *structure-based*.⁶⁶

Wysokie wartości parametru dopasowania (*FitValue*) wskazują, że hipoteza, chociaż dobrze przewiduje powinowactwo aktywnych ligandów, nie różnicuje całej testowanej serii i podobnie wysoko ocenia połączenia nieaktywne. Trzeba jednak zaznaczyć, że do konstrukcji modelu użyto tylko związków aktywnych, a dodatkowo, został on niejako „wyjęty” z miejsca wiążącego i pozbawiony otoczenia wpływającego na możliwość ułożenia liganda w kieszeni receptora. Dlatego, w kolejnym kroku przeprowadzona została procedura dodawania obszarów sterycznie zabronionych (*Excluded Volumes*) z wykorzystaniem nieaktywnych związków **206**, **212**, **218**, **220**, **222**, **224**, aby zwiększyć własności

dyskryminujące modelu. Niestety, ponowne mapowanie testowanych pochodnych do hipotezy rozbudowanej o 27 i 94 dodatkowe elementy nie poprawiło zależności dopasowania od aktywności związków (rys. 26).



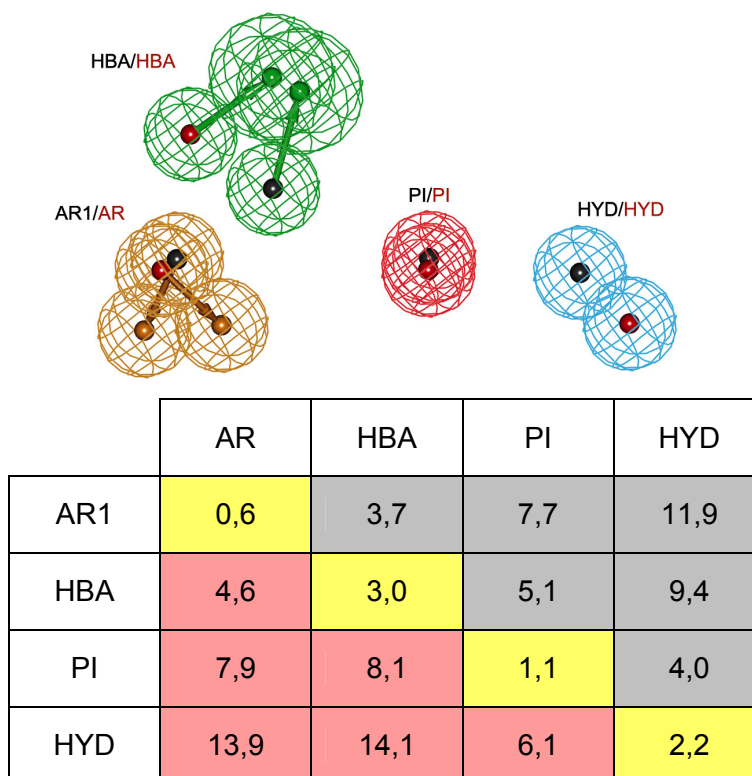
Rysunek 26. Wyniki mapowania nowych związków **196, 197, 206–224** (odcienie niebieskie) oraz znanych ligandów **63–66, 84, 85, 96, 98, 99** (odcienie czerwone) do hipotezy selektywności rozbudowanej o obszary sterycznie zabronione (EV). Słupki granatowe i bordowe – modele bez EV, słupki niebieskie i czerwone – 27 EV, słupki jasnoniebieskie i jasnoczerwone – 94 EV.

3.4.3. Farmakofor *ligand-based* według algorytmu *Catalyst HipHop*

Równoległe do eksperymentów z użyciem odwzorowanego modelu selektywności (*structure-based*) podjąłem próbę konstrukcji „od nowa” modelu farmakoforowego w oparciu o strategię *ligand-based* przy wykorzystaniu tego samego zestawu związków selektywnych (rys. 25). Niestety, stosując algorytm protokołu *Common Feature Pharmacophoric Generation* (algorytm *Catalyst HipHop*) nie udało się otrzymać spójnego modelu opisującego wspólne cechy farmakoforowe dla całego zestawu związków. Proces generowania modelu został zakończony sukcesem, gdy z serii treningowej usunięto 5 ligandów należących do grupy pochodnych diaminopirydyn, diaminotriazyn i aminotetralin, tj. **54, 124, 128, 129, 131** (rys 25).

Otrzymane wyniki charakteryzowało znaczne podobieństwo z hipotezą *structure-based*, gdyż zidentyfikowano analogiczne cechy farmakoforowe, które dodatkowo znajdowały się w podobnych relacjach przestrzennych. Jak wynika z nałożenia obu modeli (rys. 27), dwa podstawowe elementy struktury ligandów receptorów monoaminergicznych (PI oraz AR) zajmują zbliżone pozycje, choć wektory prostopadłe do płaszczyzn aromatycznych mają odmienny kierunek. Nieco większe różnice występują we względnym położeniu cech HYD (2,2 Å) i HBA (3 Å), lecz w tym ostatnim przypadku ma to mniejsze znaczenie, gdyż odpowiednie wektory wskazują na zbieżny punkt oddziaływania.

Podobnie jak w przypadku eksperymentu dla zrekonstruowanego modelu selektywności przeprowadzone zostało mapowanie całej serii związków do nowego farmakoforu, a następnie rozbudowano model o obszary sterycznie zabronione za pomocą protokołu *Steric Refinement with Excluded Volumes* (algorytm *Catalyst HipHopRefine*). Niestety, również w tym przypadku, otrzymane wyniki nie wykazały pożądanej zależności dopasowania od wartości powinowactwa w testowanej serii związków.



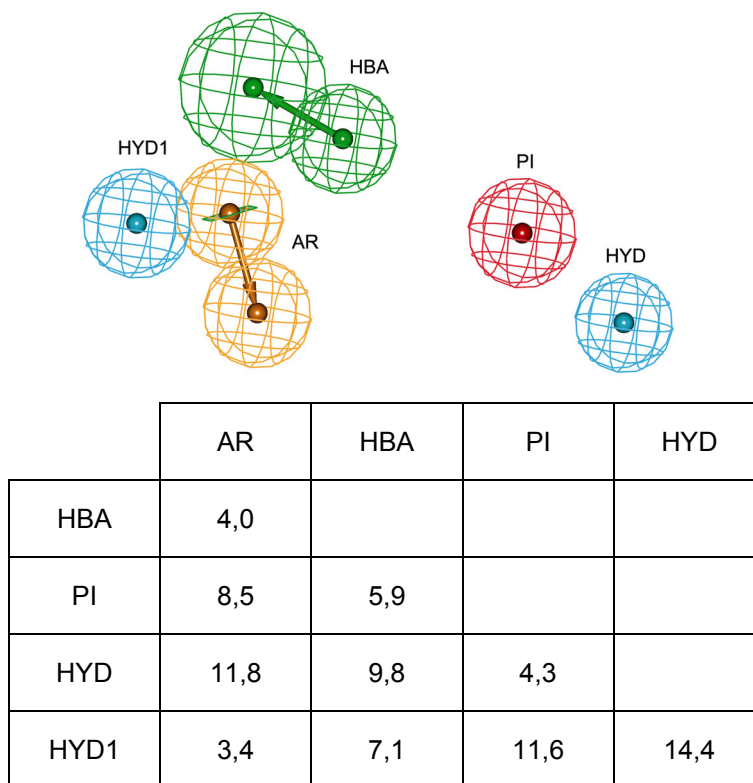
Rysunek 27. Nałożenie zrekonstruowanej hipotezy selektywności *structure-based* (szare centra cech i pola w tabeli) i nowego modelu opartego o *ligand-based design* (czerwone centra cech i pola w tabeli); pola żółte – odległości między odpowiadającymi sobie cechami farmakoforowymi obu modeli.

3.4.4. Hipoteza 3D QSAR – farmakofor *ligand-based* według algorytmu *Catalyst HypoGen*

Metoda *ligand-based* zakłada ułożenie wszystkich ligandów w podobny sposób w miejscu wiążącym receptora. Dane eksperymentalne wskazują jednak, że mogą istnieć odmienne punkty uchwytu dla poszczególnych rodzin ligandów. Te nawet nieznaczne różnice powodują, że modele generowane na podstawie bardzo zróżnicowanej grupy związków są reprezentacją uśrednionego ułożenia ligandów w receptorze i ich skuteczność przewidywania aktywności jest ograniczona. Jak wcześniej wspomniano (rozdz. 3.4, str. 79), modele farmakoforowe zdolne ze znacznym prawdopodobieństwem przewidywać aktywność

biologiczną są najczęściej otrzymywane na podstawie serii związków pochodzących z tej samej rodziny co później testowane ligandy.

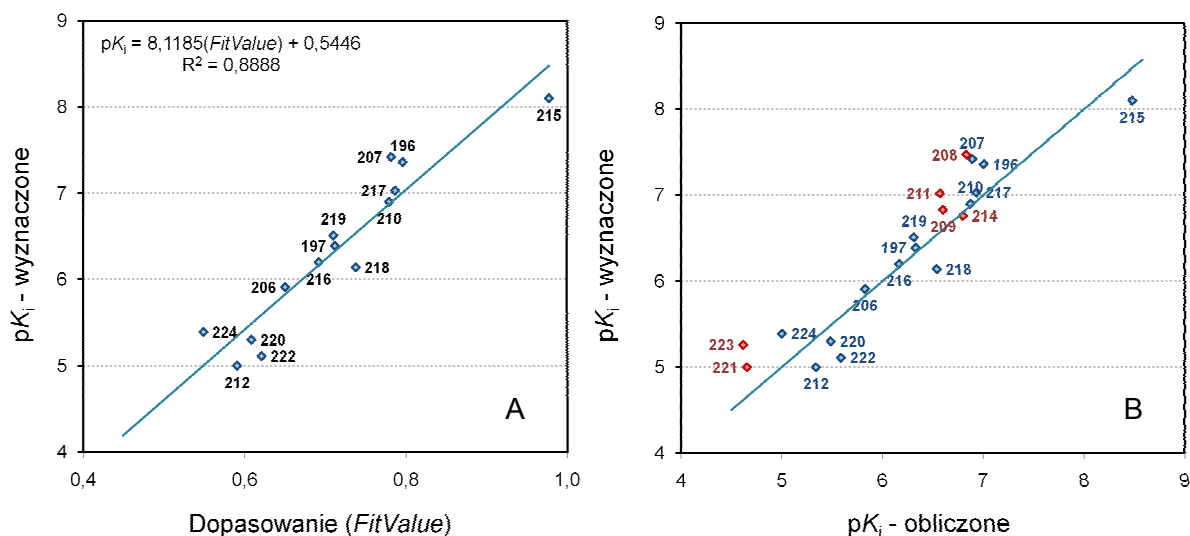
Pochodne arylosulfonamidowe, otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wykazywały dużą rozpiętość powinowactwa ($K_i = 8 - 10\ 000$ nM) i stanowiły odpowiednią grupę dla zastosowania protokołu *3D QSAR Pharmacophore Generation*. Protokół ten, w oparciu o algorytm *Catalyst HypoGen*, generuje serię modeli uporządkowaną według skuteczności przewidywania aktywności. Jako serię treningową wybrałem 14 związków o zróżnicowanym powinowactwie, tj. **196, 197, 206, 207, 210, 212, 215–220, 222, 224**. W parametrach protokołu zezwolono na przypisywanie przez algorytm różnych promieni (*Variable Tolerances*) i istotności (*Variable Weights*) dla poszczególnych sfer cech farmakoforowych. Otrzymano pięciopunktowy model składający się z AR, PI, HBA i dwóch obszarów hydrofobowych HYD i HYD1. Generalnie, przestrzenne rozmieszczenie zdefiniowanych 4 pierwszych elementów było podobne do wcześniejszych hipotez, a dodatkowy region HYD1 występował w pobliżu cechy aromatycznej. Analogicznie jak w poprzednich eksperymentach, uzyskany model został uzupełniony o obszary sterycznie zabronione (10) za pomocą algorytmu *HipHopRefine* wykorzystując pięć nieaktywnych związków (**206, 212, 220, 222, 224**).



Rysunek 28. Model *3D QSAR* wygenerowany metodą *ligand-based design* i macierz odległości pomiędzy cechami farmakoforowymi.

W wyniku mapowania serii treningowej do tak rozbudowanego modelu otrzymano liniową zależność wyznaczonego powinowactwa (pK_i) od dopasowania (*FitValue*), ze współczynnikiem korelacji $r^2 = 0,89$ (rys. 29A).

Na podstawie równania $pK_i = 8,1185(\text{FitValue}) + 0,5446$ obliczono przewidywaną aktywność dla serii treningowej oraz dodatkowo dla 6 testowych związków **208**, **209**, **211**, **214**, **221** i **223** (rys. 29B). Otrzymane rezultaty potwierdziły zatem skuteczność przewidywania aktywności w odniesieniu do analizowanej grupy pochodnych.



Rysunek 29. Wykresy zależności między powinowactwem wyznaczonym eksperymentalnie, a A – parametrem dopasowania do modelu (*FitValue*) oraz B – obliczoną aktywnością pK_i .

Dodatkowo, wykonano również testowe mapowanie kilku selektywnych ligandów (**63–66**) z zestawu użytego do konstrukcji wcześniejszych modeli, wybranych z powodu podobieństwa strukturalnego do otrzymanych w doktoracie pochodnych arylosulfonamidowych. Przewidziana dla związku **63** wartość powinowactwa była bardzo zbliżona do eksperymentalnej ($pK_{i(\text{obl})} = 7,21$ vs $pK_{i(\text{wyzn})} = 7,5$), natomiast pochodne **64–66**, częściowo usztywnione pierścieniem pirolidyny, zostały ocenione jako niżej aktywne ($pK_{i(\text{obl})} = 6,6–6,8$ vs $pK_{i(\text{wyzn})} = 8,5–8,9$). Trzeba jednak zaznaczyć, iż powinowactwo tych związków oznaczono w innych laboratoriach, co może mieć wpływ na otrzymane wyniki.

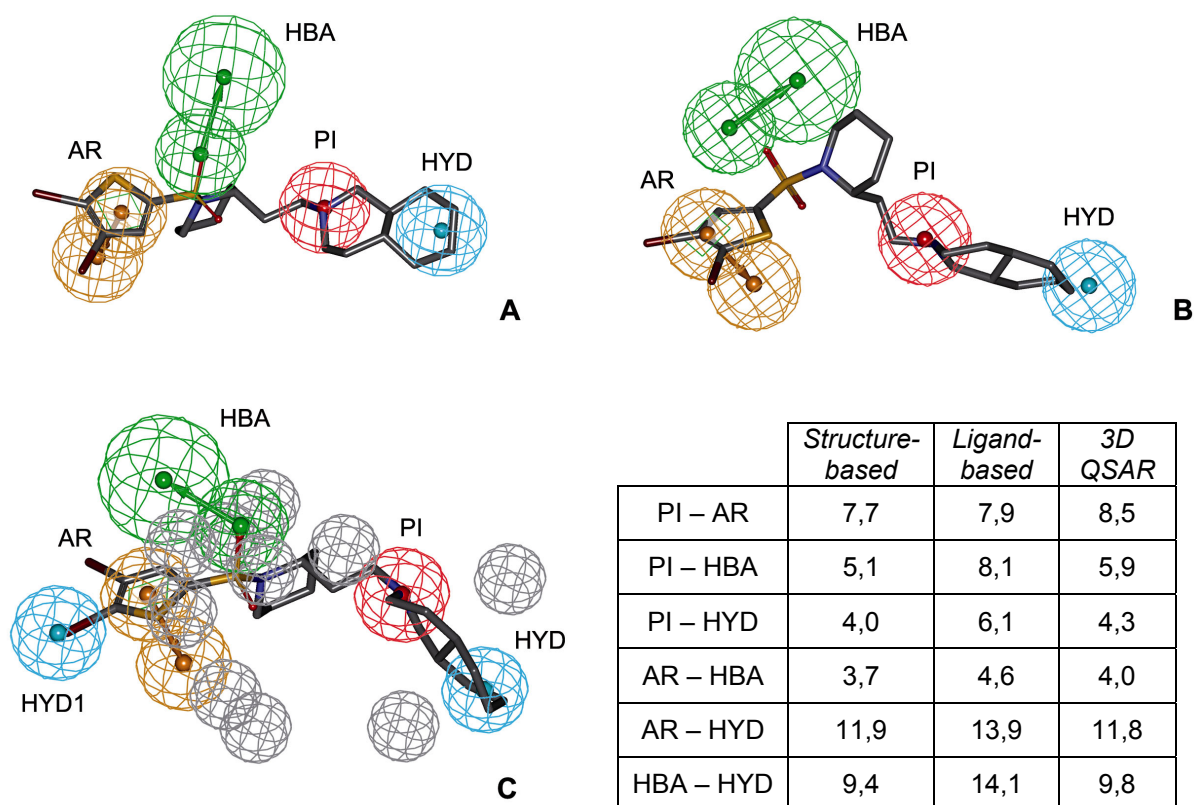
3.4.5. Wnioski

Opracowane modele farmakoforowe tj.:

1. zrekonstruowana hipoteza selektywności otrzymana wcześniej w ZChL wg podejścia *structure-based*,
2. model oparty na metodyce *ligand-based* i algorytmie *Catalyst HipHop*,
3. farmakofor z użyciem protokołu 3D QSAR wykorzystujący algorytm *Catalyst HypoGen*

mimo, że wygenerowane w wyniku trzech różnych metod definiują 4 wspólne cechy farmakoforowe: PI, AR, HBA i HYD, których ogólne podobieństwo w rozmieszczeniu przestrzennym obrazuje rysunek 30. Co ciekawe, porównanie odległości pomiędzy tymi cechami (tabela zamieszczona na rysunku 30) wskazuje, na większą zgodność dla modeli *structure-based* i *3D QSAR* opartych na innych zestawach związków, aniżeli *structure-based* i *ligand-based* wykorzystujących tą samą grupę ligandów.

Ostatni model – *3D QSAR* jest wzbogacony o dodatkowy obszar HYD1, który wskazuje miejsce potencjalnych, dalszych modyfikacji strukturalnych w grupie pochodnych perhydroizochinoliny.



Rysunek 30. Porównanie modeli: A – zrekonstruowanego selektywności; B – otrzymanego metodą *ligand-based design* algorytmem HipHop; C – otrzymanego wg protokołu *3D QSAR* algorytmem *Catalyst HypoGen*. Na rysunkach przedstawiono dopasowanie do modeli najaktywniejszego związku 215.

W procesie przewidywania powinowactwa, wszystkie modele farmakoforowe, bez względu na rodzaj metody zastosowanej do ich konstrukcji, prawidłowo oceniały ligandy o wysokiej aktywności. Jednak próby wykorzystania dwóch pierwszych hipotez, otrzymanych wg różnych strategii, ale opartych na wspólnej grupie połączeń, do dyskryminacji badanych związków nie przyniosły spodziewanych rezultatów. Natomiast ostatnia hipoteza *3D QSAR*, stanowiąca graficzne podsumowanie zależności SAR obserwowanych dla

arylosulfonamidowych pochodnych perhydroizochinoliny, poprawnie oceniała powinowactwo tego typu związków, a więc może być dalej wykorzystywana np. do przeszukiwania bibliotek chemicznych metodą wirtualnego skriningu.

3.5. Podsumowanie

Badania będące przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej miały na celu ustalenie czynników determinujących selektywność oddziaływań pochodnych arylopiiperazynowych i arylosulfonamidowych w stosunku do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}R i 5-HT₇R.

Wyniki otrzymane dla analizowanych grup ligandów (pirolidyny, benzotriazolu i arylosulfonylopiperydydy) pozwoliły ustalić co następuje:

1. preferencję liniowo rozciągniętej konformacji ligandów LCAP przez 5-HT_{1A}R w stosunku do 5-HT₇R, co oznacza, że zastosowanie modyfikacji strukturalnych „zamrażających” taką geometrię związku powinno zapewnić pożądaną selektywność poprzez wykluczenie powinowactwa do 5-HT₇R;
2. zastosowanie terminalnego fragmentu sulfonamidowego dodatkowo usztywnionego pierścieniem piperydynowym, (co wymusza lekko zgiętą konformację przy zachowaniu dużej fleksyjności pozostałego fragmentu cząsteczki) ma znaczenie dla wysokiego powinowactwa do 5-HT₇R pochodnych benzizoksazolopiperazyny, jednak nie eliminuje całkowicie aktywności do 5-HT_{1A}R (jak i innych receptorów monoaminoergicznym);
3. istotne znaczenie dla selektywności 5-HT₇ vs 5-HT_{1A} ma brak aromatycznych grup w pobliżu protonowanego atomu azotu (grupa pochodnych perhydroizochinoliny) co decyduje o specyficznym oddziaływaniu związku głównie w obrębie tzw. selektywnej części kieszeni wiążącej receptora 5-HT₇.

Ponadto, skonstruowany w oparciu o strategię *ligand-based* model farmakoforowy 3D QSAR rozszerzył otrzymaną wcześniej w podejściu *structure-based* hipotezę selektywności, definiując obecność dodatkowego regionu HYD1 zlokalizowanego w pobliżu cechy aromatycznej. Tym samym określił miejsce korzystnych dla aktywności do 5-HT₇R modyfikacji strukturalnych, tj. dalszą rozbudowę pierścieni arylowych przy układzie sulfonylopiperydydy o podstawniki warunkujące oddziaływania hydrofobowe. Co więcej, model ten potrafił poprawnie oceniać powinowactwo zróżnicowanej pod względem aktywności badanej grupy pochodnych co świadczy, że może być dalej wykorzystywany np. do przeszukiwania bibliotek chemicznych metodą wirtualnego skryningu.

Pakiet oprogramowania Discovery Studio wykorzystany do konstrukcji modeli farmakoforowych, okazał się bardzo przystępnym narzędziem, które rozszerza warsztat badawczy chemika syntetyka o techniki modelowania molekularnego stanowiące cenne uzupełnienie prac eksperymentalnych.

4. METODYKA

4.1. Metody otrzymywania badanych związków

4.1.1. Wstęp

Temperaturę topnienia wyznaczono za pomocą aparatu Electrothermal IA9000. Widma ^1H NMR wykonano w ZChL (Varian EM-360L, 60 MHz) i w Pracowni Spektroskopii MRI CMUJ (Varian Mercury-VX, 300 MHz) w roztworze CDCl_3 lub DMSO, używając TMS jako wzorzec. Dane spektralne amin odnoszą się do ich wolnych zasad. Przesunięcia chemiczne wyrażono w δ (ppm), a stałe sprzężenia J w hercach (Hz). Czystość wszystkich związków była rutynowo sprawdzana za pomocą arkuszy TLC Merck Kieselgel lub Aluminum Oxide, Neutral 60-F₂₅₄. Chromatografię kolumnową przeprowadzano, wykorzystując Merck Kieselgel 60 lub Aluminum Oxide 90, Neutral (70–230 mesh). Do badań biologicznych wolne zasady testowanych związków były przeprowadzane w chlorowodorki (eterowy roztwór nasycony gazowym HCl) lub fumarany (równomolowy roztwór kwasu fumarowego w etanolu). Masę cząsteczkową ustalono na podstawie analizy elementarnej soli z dokładnością $\pm 0,4\%$ względem wartości teoretycznej (Instytut Chemii i Technologii Organicznej Politechniki Krakowskiej).

4.1.2. Pochodne pirolidyny

Wyjściowe 4-(4-arylopiiperazyn-1-ylo)butyloaminy otrzymano w oparciu o procedury opisane przez Glennona i wsp.,⁸ natomiast ich sztywne analogi – 4-(4-arylopiiperazyn-1-ylo)cykloheksyloaminy **159** otrzymano według metody opracowanej w naszym laboratorium.¹³²

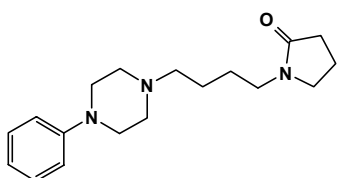
4.1.2.1. Ogólna procedura otrzymywania związków 161–8

Do energicznie mieszanej odpowiedniej 4-(4-arylopiiperazyn-1-ylo)butylaminy lub 4-(4-arylopiiperazyn-1-ylo)cykloheksyloaminy (1 mmol) w CHCl_3 (9 mL) i 20% wodnym roztworze K_2CO_3 (9 mL) dodano w jednej porcji chlorek kwasu 4-chloromasłowego (2 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 godziny, a następnie oddzielono warstwę organiczną i suszono nad bezwodnym MgSO_4 . Rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej.

Otrzymane 4-chloro-*N*-{4-[4-arylopiiperazyn-1-ylo]butylo}- lub 4-chloro-*N*-{4-[4-arylopiiperazyn-1-ylo]cykloheksylo}butyramidy (1 mmol) rozpuszczono w suchym THF i

dodawano kroplami do zawiesiny wodoru sodu (0,37 g) w suchym THF (10 mL). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano do temperatury 65–75°C przez 6h, a następnie po oziębieniu do temperatury pokojowej umieszczono w łaźni lodowej i powoli zgaszono metanolem (10 mL). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość zaś rozpuszczono w chloroformie, przemyto nasyconym roztworem NaHCO₃ i suszono bezwodnym MgSO₄. W końcu, po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej. Do farmakologicznych badań wolne zasady były przeprowadzane w fumarany poprzez potraktowanie równomolową ilością kwasu fumarowego w etanolu.

1-[4-(4-Fenylopiperazyn-1-ylo)butylo]pirolidyn-2-on 161 (RB-91)



$R_f = 0,25$ (SiO₂, CHCl₃/MeOH = 19/1)

żółty olej

Wydajność 79%

Analiza ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

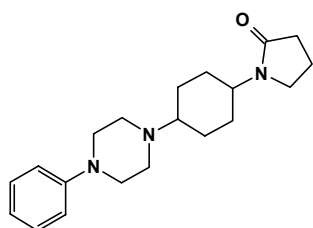
7.2 (t, $J = 8$ Hz, 2H, Ar-H), 7.0–6.6 (m, 3H, Ar-H), 3.6–3.0 (m, 8H), 2.8–1.8 (m, 10H), 1.8–1.1 (m, 4H, –CH₂–(CH₂)₂–CH₂–).

161 (fumaran):

t.t. 117–9°C

Anal. element. (C₁₈H₂₇N₃O · 1.45C₄H₄O₄ · H₂O) C, H, N.

trans-1-[4-(4-Fenylopiperazyn-1-ylo)cycloheksylo]pirolidyn-2-on 162 (RB-106)



$R_f = 0.21$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

bezbarwne kryształy

Wydajność 61%

t.t. 186–8°C

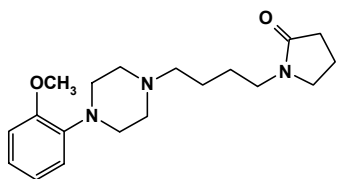
Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.25 (td, $J = 7.0, 1.8$ Hz, 2H, fenyl H-3 i H-5), 6.92 (dd, $J = 8.7, 1.0$ Hz, 2H, fenyl H-2 i H-6), 6.84 (tt, $J = 7.3, 1.0$ Hz, 1H, fenyl H-4), 4.00–3.86 (m, 1H, cycloheksan aks. H-1), 3.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, pirolidyn-2-on H-3 i H-3'), 3.26–3.14 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.80–2.68 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.43–2.27 (m, 3H, cycloheksan aks. H-4 i pirolidyn-2-on H-5 i H-5'), 2.08–1.88 (m, 4H, cycloheksan ekw. H i pirolidyn-2-on H-4 i H-4'), 1.88–1.71 (m, 2H, cycloheksan ekw. H), 1.57–1.37 (m, 4H, cycloheksan aks. H).

162 (fumaran):

t.t. 217–9°C

Anal. element. (C₂₀H₂₉N₃O · 0.75C₄H₄O₄) C, H, N.

1-{4-[4-(2-Metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]butylo}pirolidyn-2-on **163** (RB-61)
 $R_f = 0.34$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 9/1)

żółty olej

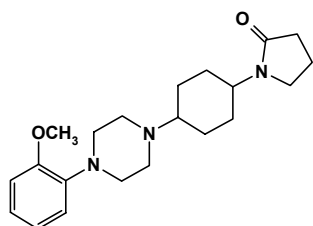
Wydajność 38%

Analiza ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.2–6.7 (m, 4H, Ar-H), 3.8 (s, 3H, OCH₃), 3.6–2.8 (m, 8H), 2.8–1.8 (m, 10H), 1.7–1.1 (m, 4H, –CH₂–(CH₂)₂–CH₂–).

163 (fumaran):

t.t. 131–3°C

Anal. element. (C₁₉H₂₉N₃O₂ · 1.25C₄H₄O₄ · H₂O) C, H, N.*trans*-1-{4-[4-(2-Metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}pirolidyn-2-on **164** (RB-99)
 $R_f = 0.23$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

bezbarwne kryształy

Wydajność 70%

t.t. 180–2°C

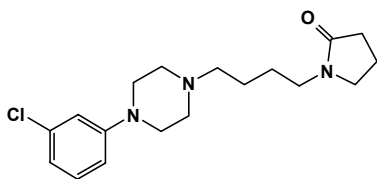
Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.03–6.87 (m, 3H, fenyl H-3, H-4 i H-5), 6.85 (dd, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H, fenyl H-6), 4.00–3.84 (m, 1H, cykloheksan aks. H-1), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.33 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, pirolidyn-2-on H-3 i H-3'), 3.18–3.02 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.86–2.72 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.44–2.28 (m, 3H, cykloheksan aks. H-4 i pirolidyn-2-on H-5 i H-5'), 2.10–1.95 (m, 4H, cykloheksan ekw. H i pirolidyn-2-on H-4 i H-4'), 1.87–1.52 (m, 2H, cykloheksan ekw. H), 1.58–1.38 (m, 4H, cykloheksan aks. H).

164 (fumaran):

t.t. 217–9°C

Anal. element. (C₂₁H₃₁N₃O · 1.5C₄H₄O₄) C, H, N.

1-{4-[4-(3-Chlorofenylo)piperazyn-1-ylo]butylo}pirolidyn-2-on **165** (RB-63) $R_f = 0.18$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

bezbarwne kryształy

Wydajność 74%

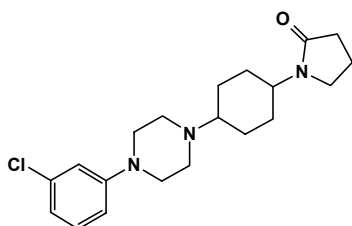
t.t. 80–2°C

Analiza ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.1 (t, $J = 8$ Hz, 1H, Ar-H.), 6.9–6.5 (m, 3H, Ar-H.), 3.7–2.8 (m, 8H), 2.8–1.8 (m, 10H), 1.7–1.1 (m, 4H, –CH₂–(CH₂)₂–CH₂–).

165 (fumaran):

t.t. 126–8°C

Anal. element. (C₁₈H₂₆N₃OCl · C₄H₄O₄) C, H, N.*trans*-1-{4-[4-(3-Chlorofenyl)piperazyn-1-yl]cykloheksyl}pirolidyn-2-on **166** (RB-114) $R_f = 0.19$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

bezbarwne kryształy

Wydajność 50%

t.t. 170–2°C

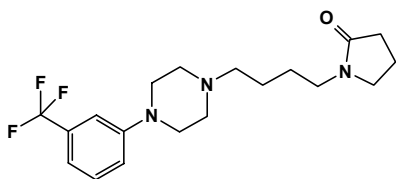
Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.15 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, fenyl H-5), 6.86 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, fenyl H-2), 6.82–6.74 (m, 2H, fenyl H-4 i H-6), 4.00–3.88 (m, 1H, cykloheksan aks. H-1), 3.33 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, pirolidyn-2-on H-3 i H-3'), 3.28–3.14 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.82–2.64 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.43–2.28 (m, 3H, cykloheksan aks. H-4 i pirolidyn-2-on H-5 i H-5'), 2.07–1.91 (m, 4H, cykloheksan ekw. H i pirolidyn-2-on H-4 i H-4'), 1.87–1.72 (m, 2H, cykloheksan ekw. H), 1.57–1.37 (m, 4H, cykloheksan aks. H).

166 (fumaran):

t.t. 206–8°C

Anal. element. (C₂₀H₂₈N₃OCl · 1.1C₄H₄O₄) C, H, N.

1-{4-[4-(3-Trifluorometylofenylo)piperazyn-1-ylo]butylo}pirolidyn-2-on **167** (RB-97)
 $R_f = 0.16$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

żółty olej

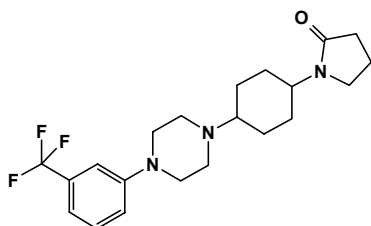
Wydajność 33%

Analiza ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.55–6.8 (m, 4H, Ar-H.), 3.5–3.0 (m, 8H), 2.7–1.7 (m, 10H), 1.7–1.1 (m, 4H, –CH₂–(CH₂)₂–CH₂–).

167 (fumaran):

t.t. 165–7°C

Anal. element. (C₁₉H₂₆N₃OF₃ · 1.6C₄H₄O₄) C, H, N.*trans*-1-{4-[4-(3-Trifluorometylofenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}pirolidyn-2-on **168** (RB-101)
 $R_f = 0.27$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

bezbarwne kryształy

Wydajność 53%

t.t. 162–4°C

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.33 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, fenyl H-5), 7.10 (s, 1H, fenyl H-2), 7.12–7.01 (m, 2H, fenyl H-4 i H-6), 4.02–3.87 (m, 1H, cykloheksan aks. H-1), 3.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, pirolidyn-2-on H-3 i H-3'), 3.30–3.18 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.82–2.66 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.44–2.28 (m, 3H, cykloheksan aks. H-4 i pirolidyn-2-on H-5 i H-5'), 2.08–1.92 (m, 4H, cykloheksan ekw. H i pirolidyn-2-on H-4 i H-4'), 1.88–1.73 (m, 2H, cykloheksan ekw. H), 1.58–1.38 (m, 4H, cykloheksan aks. H).

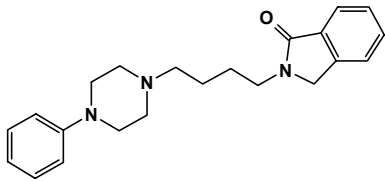
168 (fumaran):

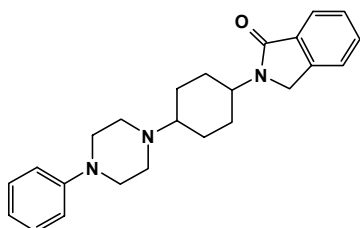
t.t. 215–7°C

Anal. element. (C₂₁H₂₈N₃OF₃ · C₄H₄O₄) C, H, N.

4.1.2.2. Ogólna procedura otrzymywania związków 169–76

Do mieszanego i ogrzewanego do 60°C roztworu odpowiednich 1-arylo-4-[4-(2-ftalimido)butylo]piperazyny⁸ lub 1-arylo-4-[4-(2-ftalimido)cykloheksylo]piperazyny¹³² (1 mmol) w lodowatym kwasie octowym (2.26 g) dodano w jednej porcji pył cynkowy (5.5 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano i ogrzewano do wrzenia przez 1h, następnie odsączono i przemyto lodowatym kwasem octowym. Następnie mieszaninę zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem, zalkalizowano nasyconym roztworem NaHCO₃ i ekstrahowano CHCl₃ (3 × 30 mL). Połączone ekstrakty przemyto nasyconym roztworem NaHCO₃, wodą i suszono bezwodnym MgSO₄. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej. Do farmakologicznych badań wolne zasady przeprowadzono w chlorowodorki poprzez potraktowanie eterowym roztworem nasyconym gazowym HCl.

2-[4-(4-Fenylo-piperazyn-1-ylo)butylo]-2,3-dihydroizoindol-1-on 169 (RB-94)		
	$R_f = 0.34$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 19/1)	
	żółty olej	
	Wydajność 44%	
	Analiza ¹ H NMR (60 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:	
7.9–7.6 (m, 1H, Ar-H), 7.6–7.0 (m, 5H, Ar-H), 7.0–6.6 (m, 3H, Ar-H), 4.3 (s, 2H, dihydroizoindol-1-on CH ₂), 3.6 (t, $J = 6$ Hz, 2H, –CH ₂ – dihydroizoindol-1-on), 3.3–2.9 (m, 4H, piperazyna 2CH ₂), 2.8–2.0 (m, 6H, piperazyna 2CH ₂ i –CH ₂ –piperazyna), 2.0–1.3 (m, 4H, –CH ₂ –(CH ₂) ₂ –CH ₂ –).		
169 (chlorowodorek):	t.t. 224–6°C	Anal. element. (C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O · 2HCl) C, H, N.

trans-2-[4-(4-Fenylopiperazyn-1-ylo)cykloheksylo]-2,3-dihydroizoindol-1-on 170 (RB-104) $R_f = 0.14$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 97/3$)

bezbarwne kryształy

Wydajność 51%

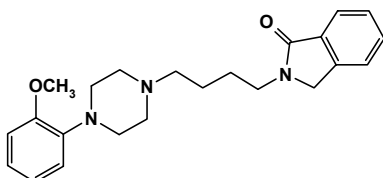
t.t. 218–20°C

Analiza $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.86 (dd, $J = 6.5, 1.7$ Hz, 1H, dihydroizoindol-1-on H-7), 7.56–7.42 (m, 3H, dihydroizoindol-1-on H-4, H-5 i H-6), 7.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, fenyl H-3 i H-5), 6.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, fenyl H-2 i H-6), 6.86 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, fenyl H-4), 4.35 (s, 2H, dihydroizoindol-1-on CH_2), 4.32–4.18 (m, 1H, cykloheksan aks. H-1), 3.30–3.16 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.85–2.71 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.50–2.36 (m, 1H, cykloheksan aks. H-4), 2.16–1.90 (m, 4H, cykloheksan ekw. H), 1.70–1.48 (m, 4H, cykloheksan aks. H).

170 (chlorowodorek):

t.t. 255–7°C

Anal. element. ($\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O} \cdot 2\text{HCl}$) C, H, N.***2-{4-[4-(2-Metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]butylo}-2,3-dihydroizoindol-1-on 171 (RB-82)*** $R_f = 0.37$ (Al_2O_3 , AcOEt)

żółty olej

Wydajność 38%

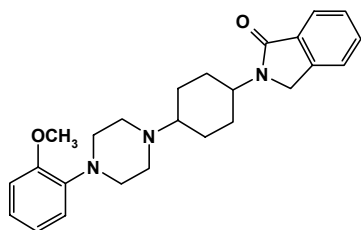
Analiza $^1\text{H NMR}$ (60 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.9–7.6 (m, 1H, Ar-H), 7.5–7.1 (m, 3H, Ar-H), 6.8 (s, 4H, Ar-H), 4.3 (s, 2H, dihydroizoindol-1-on CH_2), 3.7 (s, 3H, OCH_3), 3.6 (t, $J = 6$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$ dihydroizoindol-1-on), 3.2–2.7 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.7–2.1 (m, 6H, piperazyna 2CH_2 i $-\text{CH}_2-$ piperazyna), 1.8–1.3 (m, 4H, $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-$).

171 (chlorowodorek):

t.t. 227–9°C

Anal. element. ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

trans-2-{4-[4-(2-Metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}-2,3-dihydroizoindol-1-on 172 (RB-95) $R_f = 0.31$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 19/1$)

bezbarwne kryształy

Wydajność 87%

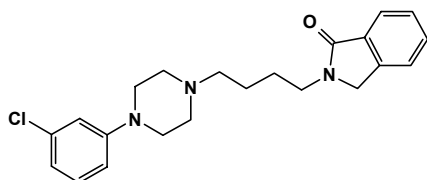
t.t. 162–4°C

Analiza $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, dihydroizoindol-1-on H-7), 7.57–7.41 (m, 3H, dihydroizoindol-1-on H-4, H-5 i H-6), 7.05–6.89 (m, 3H, fenyl H-3, H-4 i H-5), 6.87 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, fenyl H-6), 4.35 (s, 2H, dihydroizoindol-1-on CH_2), 4.33–4.18 (m, 1H, cykloheksan aks. H-1), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 3.30–3.05 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.98–2.80 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.60–2.44 (m, 1H, cykloheksan aks. H-4), 2.22–2.07 (m, 2H, cykloheksan ekw. H), 2.07–1.92 (m, 2H, cykloheksan ekw. H), 1.71–1.50 (m, 4H, cykloheksan aks. H).

172 (chlorowodorek):

t.t. 258–60°C

Anal. element. ($\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) C, H, N.**2-{4-[4-(3-Chlorofenylo)piperazyn-1-ylo]butylo}-2,3-dihydroizoindol-1-on 173 (RB-89)** $R_f = 0.10$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 49/1$)

bezbarwne kryształy

Wydajność 52%

t.t. 111–3°C

Analiza $^1\text{H NMR}$ (60 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

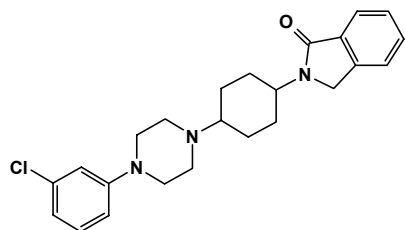
8.0–7.7 (m, 1H, Ar-H), 7.6–7.0 (m, 4H, Ar-H), 7.0–6.6 (m, 3H, Ar-H), 4.3 (s, 2H, dihydroizoindol-1-on CH_2), 3.6 (t, $J = 6$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$ -dihydroizoindol-1-on), 3.3–2.9 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.7–2.2 (m, 6H, piperazyna 2CH_2 i $-\text{CH}_2$ -piperazyna), 1.9–1.3 (m, 4H, $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-$).

173 (chlorowodorek):

t.t. 209–11°C

Anal. element. ($\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{OCl} \cdot \text{HCl}$) C, H, N.

trans-2-[4-[4-(3-Chlorofenyl)piperazyn-1-yl]cykloheksyl]-2,3-dihydroizoidol-1-on **174**
(RB-111)



$R_f = 0.32$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

bezbarwne kryształy

Wydajność 78%

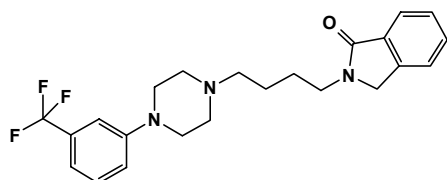
t.t. 214–6°C

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.89 (dd, $J = 6.7, 1.8$ Hz, 1H, dihydroizoidol-1-on H-7), 7.59–7.46 (m, 3H, dihydroizoidol-1-on H-4, H-5 i H-6), 7.19 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, fenyl H-5), 6.91 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, fenyl H-2), 6.86–6.79 (m, 2H, fenyl H-4 i H-6), 4.38 (s, 2H, dihydroizoidol-1-on CH₂), 4.35–4.22 (m, 1H, cykloheksan aks. H-1), 3.30–3.18 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.82–2.72 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.50–2.40 (m, 1H, cykloheksan aks. H-4), 2.16–1.95 (m, 4H, cykloheksan ekw. H), 1.76–1.50 (m, 4H, cykloheksan aks. H).

174 (chlorowodorek): t.t. 269–71°C Anal. element. (C₂₄H₂₈N₃OCl · HCl · 0.8H₂O) C, H, N.

2-[4-[4-(3-Trifluorometylofenylo)piperazyn-1-yl]butylo]-2,3-dihydroizoidol-1-on **175** (RB-92)



$R_f = 0.21$ (SiO₂, AcOEt/CH₃OH = 9/1)

żółty olej

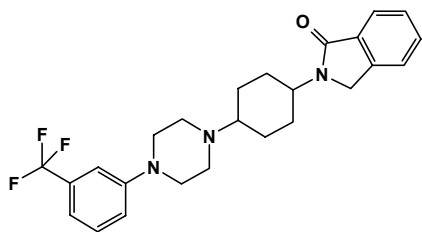
Wydajność 34%

Analiza ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.9–7.6 (m, 1H, Ar-H), 7.7–7.2 (m, 3H, Ar-H), 7.2–6.8 (m, 4H, Ar-H), 4.3 (s, 2H, dihydroizoidol-1-on CH₂), 3.6 (t, $J = 6$ Hz, 2H, –CH₂–dihydroizoidol-1-on), 3.3–2.9 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.7–2.0 (m, 6H, piperazyna 2CH₂ i –CH₂–piperazyna), 2.0–1.3 (m, 4H, –CH₂–(CH₂)₂–CH₂–).

175 (chlorowodorek): t.t. 203–5°C Anal. element. (C₂₃H₂₆N₃OF₃ · HCl · 0.25H₂O) C, H, N.

trans-2-{4-[4-(3-Trifluorometylofenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}-2,3-dihydroizoindol-1-on
176 (RB-102)



$R_f = 0.18$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 97/3)

bezbarwne kryształy

Wydajność 81%

t.t. 187–8°C

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.85 (dd, $J = 6.9, 1.8$ Hz, 1H, dihydroizoindol-1-on H-7), 7.56–7.42 (m, 3H, dihydroizoindol-1-on H-4, H-5 i H-6), 7.34 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, fenyl H-5), 7.11 (s, 1H, fenyl H-2), 7.10–7.02 (m, 2H, fenyl H-4 i H-6), 4.35 (s, 2H, dihydroizoindol-1-on CH₂), 4.33–4.18 (m, 1H, cykloheksan aks. H-1), 3.33–3.20 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.87–2.70 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.51–2.35 (m, 1H, cykloheksan aks. H-4), 2.15–1.91 (m, 4H, cykloheksan ekw. H), 1.70–1.47 (m, 4H, cykloheksan aks. H).

176 (chlorowodorek):

t.t. 259–61°C

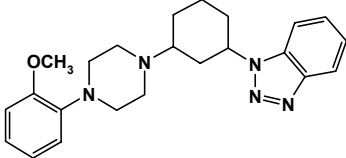
Anal. element. (C₂₅H₂₈N₃OF₃ · HCl · H₂O) C, H, N.

4.1.3. Pochodne benzotriazolu

4.1.3.1. Procedura otrzymywania pochodnych: 179, 180, 182 i 183

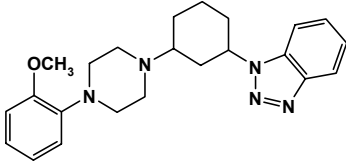
Mieszaninę 1*H*-benzotriazolu (11 mmol) i 2-cykloheksen-1-onu (10 mmol) w Et₂O (30 mL) mieszano w temperaturze pokojowej przez 6h. Następnego dnia do mieszaniny reakcyjnej dodano roztwór 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny (10 mmol) w Et₂O (10 mL) oraz kolejną porcję 1*H*-benzotriazolu (11 mmol). Po 6h mieszania odsączono produkt pośredni, przemyto Et₂O i zawieszono w dioksanie (50 mL). Otrzymaną zawiesinę potraktowano NaBH₄ (6.25 mmol), a następnie po ogrzewaniu do wrzenia przez 5h, pozostawiono w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Mieszaninę reakcyjną wylano na lód i ekstrahowano CHCl₃. Połączone organiczne warstwy przemyto wodą i suszono bezwodnym MgSO₄. Następnie usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (Al₂O₃, AcOEt/heksan = 1/3). Dalsze oczyszczanie i izolację poszczególnych izomerów przeprowadzono na chromatotronie (SiO₂, AcOEt/heksan = 1/1).

cis-1-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-yl]cykloheksylo]-1*H*-benzo[d][1,2,3]triazol 179 (MP-272)

	$R_f = 0.24$ (Al ₂ O ₃ , AcOEt/heksan = 1/3)
	jasnożółty olej
	Wydajność 35%
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
8.10 (dt, $J = 8.3, 0.9$, 1H, benzotriazol H-4), 7.61 (dt, $J = 8.2, 0.9$, 1H, benzotriazol H-7), 7.50 (td, $J = 7.4, 1.1$, 1H, benzotriazol), 7.40 (td, $J = 7.6, 1.1$, 1H, benzotriazol), 7.06–6.91 (m, 3H, aryl H-3, H-4 i H-5), 6.88 (dd, $J = 7.7, 1.1$, 1H, aryl H-6), 4.79 (tt, $J = 11.8, 4.2$, 1H, cykloheksan aks. H-3), 3.88 (s, 3H, OCH ₃), 3.22–3.05 (m, 4H, piperazyna 2CH ₂), 2.95–2.80 (m, 4H, piperazyna 2CH ₂), 2.72 (t, $J = 11.3$, 1H, cykloheksan aks. H-1), 2.49 (szeroki d, 1H, cykloheksan), 2.35–2.06 (m, 5H, cykloheksan), 1.68–1.42 (m, 2H, cykloheksan).	

179 (chlorowodorek):	t.t. 186–8°C	Anal. element. (C ₂₃ H ₂₉ N ₅ O · 2HCl) C, H, N.
-----------------------------	--------------	---

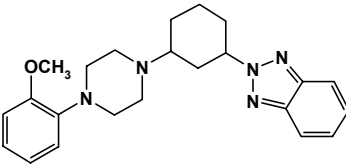
trans-1-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo]-1*H*-benzo[d][1,2,3]triazol **180**
(272-RB-3B)

	$R_f = 0.38$ (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3)
	bezbarwne kryształy
	Wydajność 3.3%
	t.t. 130–132°C
	Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

8.10 (d, $J = 8.5$, 1H, benzotriazol H-4), 7.59 (d, $J = 8.2$, 1H, benzotriazol H-7), 7.50 (td, $J = 7.1$, 1.1, 1H, benzotriazol), 7.39 (td, $J = 7.6$, 1.1, 1H, benzotriazol), 7.09–6.94 (m, 3H, aryl H-3, H-4 i H-5), 6.91 (dd, $J = 7.7$, 1.4, 1H, aryl H-6), 5.28–5.16 (m, 1H, cykloheksan ekw. H-3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.26–3.08 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.90–2.70 (m, 5H, piperazyna 2CH_2 , cykloheksan aks. H-1), 2.48–2.36 (m, 2H, cykloheksan), 2.36–2.15 (m, 2H, cykloheksan), 2.12–2.00 (m, 1H, cykloheksan), 2.00–1.88 (m, 1H, cykloheksan), 1.88–1.78 (m, 1H, cykloheksan), 1.78–1.66 (m, 1H, cykloheksan).

180 (chlorowodorek): t.t. 169–71°C Anal. element. ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.3\text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

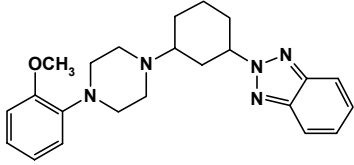
cis-2-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo]-2*H*-benzo[d][1,2,3]triazol **182**
(272-RB-1E)

	$R_f = 0.48$ (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3)
	jasnożółty olej
	Wydajność 4.1%
	Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.94–7.87 (m, 2H, benzotriazol H-4 i H-7), 7.45–7.38 (m, 2H, benzotriazol H-5 i H-6), 7.06–6.91 (m, 3H, aryl H-3, H-4 i H-5), 6.85 (dd, $J = 7.8$, 1.2, 1H, aryl H-6), 4.88 (tt, $J = 12.0$, 3.8, 1H, cykloheksan aks. H-3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.20–3.04 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.94–2.80 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.71 (t, $J = 11.5$, 1H, cykloheksan aks. H-1), 2.62 (szeroki d, 1H, cykloheksan), 2.36 (br d, 1H, cykloheksan), 2.25–1.96 (m, 4H, cykloheksan), 1.66–1.40 (m, 2H, cykloheksan).

182 (chlorowodorek): t.t. 242–4°C Anal. element. ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.3\text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

***trans*-2-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}-2*H*-benzo[d][1,2,3]triazol **183**
(272-RB-1D)**

	$R_f = 0.57$ (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3)
	jasnożółty olej
	Wydajność 1.8%
	Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

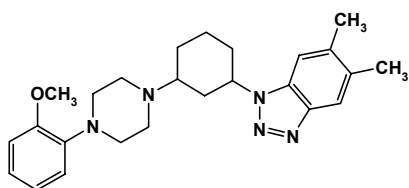
7.94–7.87 (m, 2H, benzotriazol H-4 i H-7), 7.45–7.37 (m, 2H, benzotriazol H-5 i H-6), 7.08–6.93 (m, 3H, aryl H-3, H-4 i H-5), 6.90 (dd, $J = 7.5, 1.5$, 1H, aryl H-6), 5.35–5.22 (m, 1H, cykloheksan ekw. H-3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.32–3.05 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.96–2.65 (m, 5H, piperazyna 2CH_2 i cykloheksan aks. H-1), 2.55–2.40 (m, 2H, cykloheksan), 2.40–2.20 (m, 2H, cykloheksan), 2.10–1.82 (m, 2H, cykloheksan), 1.82–1.62 (m, 2H, cykloheksan).

183 (chlorowodorek):	t.t. 181–3°C	Anal. element. ($\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.6\text{H}_2\text{O}$) C, H, N.
-----------------------------	--------------	--

4.1.3.2. Procedura otrzymywania pochodnych **185**, **186**, **188** i **189**

Mieszaninę 5,6-dimetylo-1*H*-benzotriazolu (12 mmol) i 2-cykloheksen-1-onu (11 mmol) w Et_2O (30 mL) mieszano i ogrzewano do wrzenia przez 6h. Następnego dnia do mieszaniny reakcyjnej dodano roztwór 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny (10 mmol) w MeOH (10 mL) oraz kolejną porcję 5,6-dimetylo-1*H*-benzotriazolu (11 mmol). Po 6h mieszania odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość zawieszono w dioksanie (100 mL). Otrzymaną zawiesinę potraktowano NaBH_4 (6.25 mmol), a następnie po ogrzewaniu do wrzenia przez 5h, pozostawiono w temperaturze pokojowej do następnego dnia. Mieszaninę reakcyjną wiano do 10% roztworu NaOH (40 mL) i ekstrahowano CHCl_3 . Połączone organiczne warstwy przemyto wodą i suszono bezwodnym MgSO_4 . Następnie usunięto rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3). Dalsze oczyszczanie i izolację poszczególnych izomerów przeprowadzono na chromatotronie (SiO_2 , AcOEt/heksan = 1/1) i preparatywnych płytkach TLC (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3).

cis-1-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}-5,6-dimetylo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 185 (RB-117A)



$R_f = 0.15$ (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3)

bezbarwne kryształy

Wydajność 22.6%

t.t. 164–6°C

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

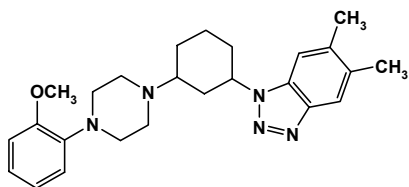
7.78 (s, 1H, benzotriazol H-4); 7.32 (s, 1H, benzotriazol H-7); 7.05–6.81 (m, 3H, fenyl H-3, H-4 i H-5); 6.85 (d, $J = 7.7$, 1H, fenyl H-6); 4.70 (tt, $J = 11.7, 4.2$, 1H, cykloheksan H-3); 3.85 (s, 3H, OCH_3); 3.20–3.06 (m, 4H, piperazyna 2CH_2); 2.95–2.80 (m, 4H, piperazyna 2CH_2); 2.80–2.67 (m, 1H, cykloheksan H); 2.53–2.36 (m, 7H, cykloheksan H); 2.30–2.02 (m, 5H, cykloheksan H); 1.64–1.40 (m, 2H, cykloheksan H).

185 (chlorowodorek):

t.t. 205–7°C

Anal. element. ($\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

trans-1-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}-5,6-dimetylo-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 186 (RB-117B)



$R_f = 0.28$ (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3)

jasnożółty olej

Wydajność 1.2%

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

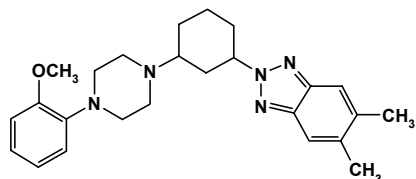
7.79 (s, 1H, benzotriazol H-4), 7.29 (s, 1H, benzotriazol H-7), 7.06–6.90 (m, 3H, aryl H-3, H-4 i H-5), 6.87 (dd, $J = 7.8, 1.4$, 1H, aryl H-6), 5.18–5.06 (m, 1H, cykloheksan ekw. H-3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.26–3.10 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.90–2.70 (m, 5H, piperazyna 2CH_2 i cykloheksan aks. H-1), 2.48–2.30 (m, 8H, 2CH_3 i cykloheksan), 2.28–2.08 (m, 2H, cykloheksan), 2.06–1.95 (m, 1H, cykloheksan), 1.95–1.83 (m, 1H, cykloheksan), 1.83–1.65 (m, 2H, cykloheksan).

186 (chlorowodorek):

t.t. 114–6°C

Anal. element. ($\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O} \cdot 2\text{HCl} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

cis-2-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}-5,6-dimetylo-2H-benzo[d][1,2,3]triazol 188 (RB-117C)



$R_f = 0.38$ (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3)

bezbarwne kryształy

Wydajność 6.0%

t.t. 131–3°C

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

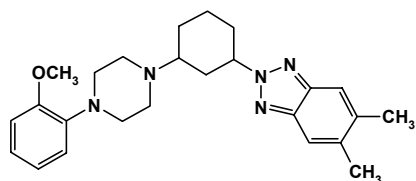
7.58 (s, 2H, benzotriazol H-3 i H-6), 7.03–6.86 (m, 3H, aryl H-3, H-4 i H-5), 6.84 (dd, $J = 7.9, 1.3$, 1H, aryl H-6), 4.78 (tt, $J = 11.9, 3.7$, 1H, cykloheksan aks. H-3), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.16–3.08 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.90–2.80 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.74–2.62 (m, 1H, cykloheksan aks. H-1), 2.60–2.54 (m, 1H, cykloheksan), 2.38 (s, 6H, 2CH_3), 2.32–2.26 (m, 1H, cykloheksan), 2.20–1.90 (m, 4H, cykloheksan), 1.60–1.38 (m, 2H, cykloheksan).

188 (chlorowodorek):

t.t. 222–4°C

Anal. element. ($\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O} \cdot 2\text{HCl}$) C, H, N.

trans-2-{3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazyn-1-ylo]cykloheksylo}-5,6-dimetylo-2H-benzo[d][1,2,3]triazol 189 (RB-117D)



$R_f = 0.49$ (Al_2O_3 , AcOEt/heksan = 1/3)

bezbarwne kryształy

Wydajność 1.4%

t.t. 126–8°C

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.59 (s, 2H, benzotriazol H-3 i H-6), 7.05–6.89 (m, 3H, aryl H-3, H-4 i H-5), 6.86 (d, $J = 7.4$, 1H, aryl H-6), 5.25–5.13 (m, 1H, cykloheksan ekw. H-3), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.23–3.00 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.95–2.60 (m, 5H, piperazyna 2CH_2 i cykloheksan aks. H-1), 2.50–2.22 (m, 9H, 2CH_3 i cykloheksan), 2.22–2.10 (m, 1H, cykloheksan), 2.00–1.82 (m, 2H, cykloheksan), 1.78–1.57 (m, 2H, cykloheksan).

189 (chlorowodorek):

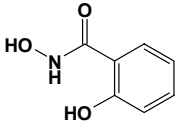
t.t. 207–9°C

Anal. element. ($\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O} \cdot 2\text{HCl}$) C, H, N.

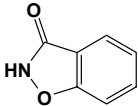
4.1.4. Pochodne sulfonamidowe

Wyjściowy 3-(piperazyn-1-ylo)benzo[d]izoksazol **198** (RB-128) otrzymano w oparciu o metody opisane przez Friary'ego i wsp.¹³⁹ oraz Yevicha i wsp.¹⁴⁰

Etap 1. Do salicylanu metylu (0.13 mol) dodano 400 ml 0.5 M etanolowego roztworu $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$. Następnie dodano 80 ml 6M roztworu NaOH. Ogrzewano do wrzenia przez 1h. Po oziębieniu mieszaniny do temperatury pokojowej odparowano rozpuszczalnik, do pozostałości dodano 1M HCl aż do wytrącenia się osadu (z roztworu zasadowego). Rozpuszczono osad w etanolu i odsączono nierozpuszczalną pozostałość. Zubożono przesącz do odczynu obojętnego i odsączono wytrącony osad.

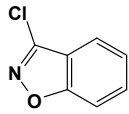
<i>2,N-Dihydroksybenzamid (RB-123)</i>	
	bezbarwne ciało stałe
	Wydajność 69%
	t.t. 168–170°C

Etap 2. Roztwór karbonylodiimidazolu (52 mmol) w THF (75 ml) dodano do wrzącego roztworu RB-123 (26 mmol) w THF (53 ml). Otrzymaną mieszaninę ogrzewano do wrzenia przez 1h. Oziębiono do temperatury pokojowej i odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuszczono w wodzie. Roztwór oziębiono na łaźni lodowej i zakwaszono stężonym HCl do pH = 2. Wytrącony osad odsączono i krystalizowano z octanu etylu.

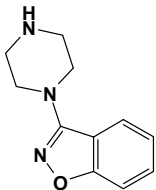
<i>Benzo[d]izoksazol-3(2H)-on (RB-125)</i>	
	$R_f = 0.33$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 9/1$)
	bezbarwne ciało stałe
	Wydajność 52%
	t.t. 132–3°C

Etap 3. Do roztworu RB-125 (1 mmol) w POCl_3 (10 ml) dodano stopniowo Et_3N (1 mmol) i ogrzewano do wrzenia przez 16h. Następnie odparowano POCl_3 na wyparce próżniowej, do pozostałości dodano pokruszony lód, NH_3 aq. i chloroform. Oddzielono organiczną frakcję

i przemyto chloroformem. Połączone organiczne warstwy odparowano na wyparce próżniowej.

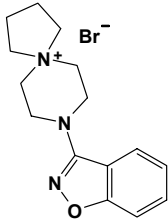
3-Chlorobenzo[d]izoksazol (RB-127)	
	$R_f = 0.67$ (SiO ₂ , CHCl ₃)
	żółty olej
	Wydajność 52%

Etap 4. Związek **198** (RB-128, 1 mmol) dokładnie zmieszano z rozdrobnioną piperazyną (10 mmol) i zgrzewano w temperaturze 130°C przez 2h. Następnie gorącą mieszaninę wlewo do wody (50 ml), dodano 50% roztwór NaOH (2 mmol) i ekstrahowano chloroformem (3 × 50 ml). Osuszono warstwę organiczną bezwodnym MgSO₄ i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono metoda chromatografii kolumnowej.

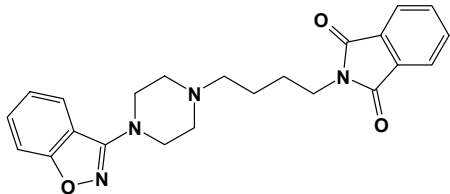
3-(Piperazyn-1-ylo)benzo[d]izoksazol 198 (RB-128)	
	$R_f = 0.27$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 9/1)
	bezbabarwe ciało stałe
	Wydajność 65%
	t.t. 85–7°C
	Analiza ¹ H NMR (60 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
7.8–7.0 (m, 4H, aromat.), 3.8–3.3 (m, 4H, piperazyna 2CH ₂), 3.3–2.8 (m, 4H, piperazyna 2CH ₂), 2.2–1.8 (szeroki s, 1H, NH ₂).	

4.1.4.1. Procedura otrzymywania związków 191 i 192

Mieszaninę **198** (1 mmol), 1,4-dibromobutanu (1.1 mmol), bezwodnego K₂CO₃ (2.4 mmol) i katalitycznej ilości eteru 18-korona-6 w 95% etanolu ogrzewano do wrzenia 24h. Następnie odsączono na gorąco i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do 1/3 objętości początkowej. Oziębiono, a wytrącony osad odsączono i suszono pod lampą.

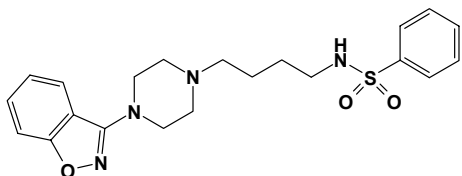
Bromek 8-(benzo[d]izoksazol-3-yl)-8-aza-5-azoniospiro[4,5]dekanu (RB-130)	
	$R_f = 0.12$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 9/1)
	bezbarwne ciało stałe
	Wydajność 66%
	t.t. 254–6°C
	Analiza ¹ H NMR (60 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
7.9–6.8 (m, 4H, aromat.), 4.7–3.4 (m, 8H, 4CH ₂), 3.1–2.0 (m, 4H, 2CH ₂), 2.0–1.5 (m, 4H, 2CH ₂).	

Otrzymany RB-130 (1 mmol) dodano do mieszaniny ftalimidu (1 mmol), bezwodnego K₂CO₃ (1.1 mmol), katalitycznej ilości eteru 18-korona-6 w ksylie i ogrzewano do wrzenia 22h. Następnie odsączono na gorąco i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej.

2-{4-[4-(Benzo[d]izoksazol-3-yl)piperazyn-1-ylo]butylo}izoindolin-1,3-dion 191 (RB-131)	
	$R_f = 0.36$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 49/1)
	jasnożółty olej
	Wydajność 97%
	Analiza ¹ H NMR (60 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
8.0–7.6 (m, 5H, aromat.), 7.6–7.0 (m, 3H, aromat.), 3.9–3.4 (m, 6H, piperazyna 2CH ₂ i łańcuch alkilowy CH ₂), 2.9–2.3 (m, 6H, piperazyna 2CH ₂ i łańcuch alkilowy CH ₂), 2.0–1.2 (m, 4H, łańcuch alkilowy 2CH ₂).	

191 (chlorowodorek):	t.t. 201–3°C	Anal. element. (C ₂₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ · HCl · H ₂ O) C, H, N.
-----------------------------	--------------	--

Wyjściową aminę [4-(4-benzo[d]izoksazol-3-yl)piperazyn-1-ylo]butyloamina (RB-155) otrzymano z **191** (RB-131) metodą Gabriela. Następnie do oziębionej mieszaniny RB-155 (1 mmol) i trietyloaminy (2 mmol) w chloroformie dodano benzenosulfochlordek (1 mmol), po czym mieszano 4h w temperaturze pokojowej. Mieszaninę przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu i odparowano rozpuszczalnik na wyparce próżniowej. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej.

***N*-{4-[4-(Benzo[d]izoksazol-3-yl)piperazyn-1-ylo]butylo}benzenosulfonamid **192** (RB-156)** $R_f = 0.41$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

żółty olej

Wydajność 89%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.85 (dd, $J = 8.2, 1.5$, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.68 (d, $J = 8.2$, 1H, benzoizoksazol H-4), 7.59–7.43 (m, 5H, aromat.), 7.22 (ddd, $J = 8.0, 6.1, 1.7$, 1H, benzoizoksazol), 7.17–7.09 (s, 1H, NH), 3.70–3.63 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 3.03–2.95 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.72–2.65 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.47–2.41 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 1.65–1.56 (m, 4H, łańcuch alkilowy 2CH₂).

192 (chlorowodorek):

t.t. 210–2°C

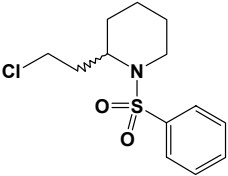
Anal. element. (C₂₁H₂₆N₄O₃S · 1.1HCl) C, H, N.

4.1.4.2. Ogólna procedura otrzymywania związków: 193–7, 200–5, 207–11, 213–5, 218, 220, 224

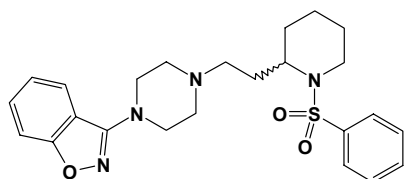
Do mieszaniny odpowiedniego chlorku alkilowego (1 mmol), odpowiedniej aminy (1.2 mmol) i bezwodnego K_2CO_3 (2 mmol) w acetonitrylu dodano katalityczną ilość NaI oraz kilka kropel DMF. Mieszaninę reakcyjną mieszano i ogrzewano do wrzenia przez 6–18h. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po oziębieniu do temperatury pokojowej mieszaninę odsączono i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano nasycony roztwór $NaHCO_3$ i ekstrahowano chloroformem. Organiczną część osuszono bezwodnym $MgSO_4$, odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik za pomocą wyparki próżniowej. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej i z pomocą chromatotronu.

Wyjściowe chlorki 2-(2-chloroetylo)-1-(arylo/alkilosulfonylo)piperidyny otrzymano w oparciu o metodę opisaną przez Lovella i wsp.⁷⁶

Do roztworu odpowiedniego chlorku kwasu sulfonowego (2 mmol) w chlorku metylenu (20 ml) dodano 2-piperidynoetanol (1 mmol) i *N*-etylo-diizopropylaminę (2 mmol). Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 6h, a następnie ogrzewano do wrzenia przez 6h, kontrolując postęp reakcji za pomocą TLC. Po oziębieniu mieszaniny do temperatury pokojowej odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wyizolowano metodą chromatografii kolumnowej i za pomocą chromatotronu.

<i>(RS)</i> -2-(2-chloroetylo)-1-(fenylosulfonylo)piperidyna (<i>RB-158B</i>)	
	$R_f = 0.58$ (SiO_2 , $CHCl_3/CH_3OH = 49/1$)
	żółty olej
	Wydajność 29.6%
	Analiza 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$); δ [ppm]:
7.85 (dd, $J = 8.2, 1.5$, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.60–7.52 (m, 3H, aromat.), 4.27–4.17 (m, 1H, piperidyna H-2), 3.84 (dd, $J = 13.8, 4.4$, 1H, piperidyna H-6), 3.52 (t, $J = 7.2$, 2H, CH_2 łańcuch alkilowy), 2.99 (td, $J = 13.7, 2.3$, 1H, piperidyna H-6), 2.28–2.13 (m, 1H, piperidyna), 1.87–1.73 (m, 1H, piperidyna), 1.54–1.36 (m, 5H, piperidyna i łańcuch alkilowy CH_2), 1.29–1.08 (m, 1H, piperidyna).	

(RS)-3-(4-{2-[1-(Fenylsulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-ylo)benzo[d]izoksazol 193 (RB-159)



$R_f = 0.54$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

jasnożółty olej

Wydajność 78%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.84 (dd, $J = 8.2, 1.5$, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.69 (d, $J = 8.2$, 1H, benzoizoksazol H-4), 7.59–7.42 (m, 5H, aromat.), 7.21 (ddd, $J = 7.9, 6.3, 1.7$, 1H, benzoizoksazol), 4.18–4.08 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.83 (dd, $J = 14.4, 4.1$, 1H, piperydyna H-6), 3.62–3.53 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 3.05 (td, $J = 13.7, 3.1$, 1H, piperydyna H-6), 2.71–2.54 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.51–2.35 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.00–1.85 (m, 1H, piperydyna), 1.72–1.58 (m, 1H, piperydyna), 1.58–1.32 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.26–1.08 (m, 1H, piperydyna).

Analiza ¹H¹H ROESY [CDCl₃]

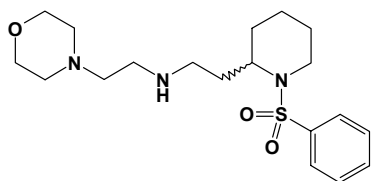
Sygnal protonu	Sygnal korelacyjny	Pochodzenie protonu
7.84 (dd, 2H)	7.59–7.42 (m, 5H, aromat.)	fenyl H-2 i H-6
7.69 (d, 1H)	3.62–3.53 (m, 4H), 7.59–7.42 (m, 5H), 7.21 (ddd, 1H)	benzoizoksazol H-4
7.59–7.42 (m, 5H)	7.84 (dd, 2H), 7.69 (d, 1H), 7.59–7.42 (m, 5H), 7.21 (ddd, 1H)	aromat.
7.21 (ddd, 1H)	7.69 (d, 1H), 7.59–7.42 (m, 5H)	benzoizoksazol
4.18–4.08 (m, 1H)	2.51–2.35 (m, 2H), 2.00–1.85 (m, 1H), 1.72–1.58 (m, 1H), 1.58–1.32 (m, 5H)	piperydyna H-2
3.83 (dd, 1H)	3.05 (td, 1H), 1.58–1.32 (m, 5H), 1.26–1.08 (m, 1H)	piperydyna H-6
3.62–3.53 (m, 4H)	7.69 (d, 1H), 2.71–2.54 (m, 4H)	piperazyna 2CH ₂
3.05 (td, 1H)	3.83 (dd, 1H), 2.00–1.85 (m, 1H), 1.72–1.58 (m, 1H), 1.58–1.32 (m, 5H), 1.26–1.08 (m, 1H)	piperydyna H-6
2.71–2.54 (m, 4H)	3.62–3.53 (m, 4H), 1.72–1.58 (m, 1H)	piperazyna 2CH ₂
2.51–2.35 (m, 2H)	4.18–4.08 (m, 1H), 2.00–1.85 (m, 1H), 1.72–1.58 (m, 1H)	łańcuch alkilowy CH ₂
2.00–1.85 (m, 1H)	4.18–4.08 (m, 1H), 3.05 (td, 1H), 2.51–2.35 (m, 2H), 1.72–1.58 (m, 1H)	piperydyna
1.72–1.58 (m, 1H)	4.18–4.08 (m, 1H), 3.05 (td, 1H), 2.51–2.35 (m, 2H), 2.71–2.54 (m, 4H), 2.00–1.85 (m, 1H), 1.58–1.32 (m, 5H)	piperydyna
1.58–1.32 (m, 5H)	4.18–4.08 (m, 1H), 3.83 (dd, 1H), 3.05 (td, 1H), 1.26–1.08 (m, 1H)	piperydyna i łańcuch alkilowy CH ₂
1.26–1.08 (m, 1H)	3.83 (dd, 1H), 3.05 (td, 1H), 1.58–1.32 (m, 5H)	piperydyna

Kursywą zaznaczono sygnały charakteryzujące się mniejszą intensywnością.

193 (chlorowodorek):

t.t. 206–8°C

Anal. element. (C₂₄H₃₀N₄O₃S · HCl) C, H, N.

(RS)-2-Morfolino-N-[2-[1-(fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo]etanoamina 194 (RB-161) $R_f = 0.24$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 9/1)

żółty olej

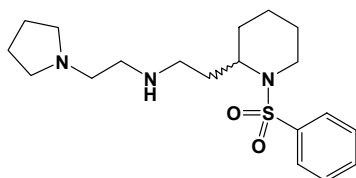
Wydajność 27%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.84 (dd, $J = 8.2, 1.5$, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.59–7.46 (m, 3H, aromat.), 4.18–4.09 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.81 (dd, $J = 14.9, 3.6$, 1H, piperydyna H-6), 3.71 (t, $J = 4.6$, 4H, morfolina CH₂–O–CH₂), 3.04 (td, $J = 13.8, 2.5$, 1H, piperydyna H-6), 2.80–2.62 (m, 4H, CH₂–NH–CH₂), 2.62–2.38 (m, 6H, (CH₂)₃N), 2.18–1.91 (m, 2H, piperydyna i NH), 1.68–1.54 (m, 1H, piperydyna), 1.54–1.23 (m, 5H, łańcuch alkilowy CH₂ i piperydyna), 1.16–0.99 (m, 1H, piperydyna).

194 (fumaran):

t.t. 166–168°C

Anal. element. (C₁₉H₃₁N₃O₃S · C₄H₄O₄) C, H, N.**(RS)-2-[1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]-N-[2-(pirolidyn-1-ylo)etylo]etanoamina 195 (RB-162)** $R_f = 0.23$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 9/1)

żółty olej

Wydajność 31%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

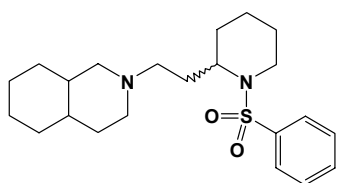
7.84 (dd, $J = 7.9, 1.8$, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.59–7.44 (m, 3H, aromat.), 4.18–4.07 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.80 (dd, $J = 14.3, 3.1$, 1H, piperydyna H-6), 3.03 (td, $J = 14.1, 2.3$, 1H, piperydyna H-6), 2.76–2.47 (m, 7H, NH i łańcuch alkilowy 3CH₂), 2.28–2.15 (m, 4H, pirolidyna 2CH₂), 2.00–1.86 (m, 1H, piperydyna), 1.82–1.71 (m, 4H, pirolidyna 2CH₂), 1.65–1.52 (m, 1H, piperydyna), 1.52–1.29 (m, 5H, piperydyna i pirolidyna 2CH₂), 1.19–1.05 (m, 1H, piperydyna).

195 (fumaran):

t.t. 97–100°C

Anal. element. (C₁₉H₃₁N₃O₂S · 2C₄H₄O₄ · H₂O) C, H, N.

(±)-*trans*-2-{2-[(*RS*)-1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}dekahydroizochinolina **196**
(*RB*-166)



$R_f = 0.46$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 9/1$)

żółty olej

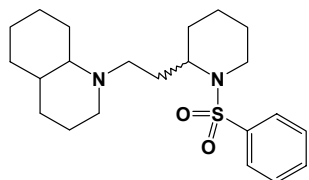
Wydajność 72%

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.82 (dd, $J = 8.2, 1.5$, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.58–7.44 (m, 3H, aromat.), 4.11–3.99 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.80 (dd, $J = 13.8, 3.6$, 1H, piperydyna H-6), 3.12–2.92 (m, 1H, piperydyna H-6), 2.64–2.20 (m, 4H, łańcuch alkilowy CH_2 i PHIQ), 2.04–1.80 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.80–1.01 (m, 20H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy).

196 (fumaran): t.t. 84–87°C Anal. element. ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} \cdot 1.3 \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

(±)-2-{2-[(*RS*)-1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}dekahydrochinolina **197** (*RB*-167)



$R_f = 0.48$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 9/1$)

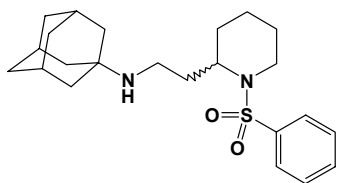
żółty olej

Wydajność 67%

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.82 (dd, $J = 6.9, 1.3$, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.58–7.44 (m, 3H, aromat.), 4.09–3.92 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.80 (dd, $J = 12.8, 6.4$, 1H, piperydyna H-6), 3.14–2.86 (m, 1H, piperydyna H-6), 2.86–2.68 (m, 1H, PHIQ), 2.68–2.40 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH_2 i dekahydrochinolina), 2.10–1.90 (m, 2H, piperydyna i dekahydrochinolina), 1.90–1.05 (m, 21H, dekahydrochinolina, piperydyna i łańcuch alkilowy CH_2).

197 (fumaran): t.t. 83–86°C Anal. element. ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} \cdot 1.1 \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

Adamantan-1-ylo-[(RS)-2-[1-(fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo]amina 220 (RB-198) $R_f = 0.21$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 9/1)

bezbarwne kryształy

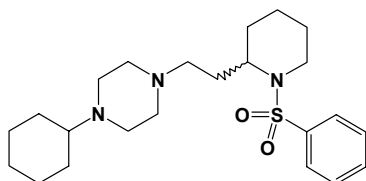
Wydajność 52%

t.t. 104–106°C

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.87–7.82 (m, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.57–7.45 (m, 3H, aromat.), 4.17–4.07 (m, 1H, piperydyna aks. H-2), 3.80 (dd, $J = 14.1, 4.1$, 1H, piperydyna H-6), 3.00 (td, $J = 13.7, 2.8$, 1H, piperydyna H-6), 2.62–2.46 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.03–2.01 (m, 3H, adamantan 3CH), 1.96–1.82 (m, 1H, piperydyna), 1.70–1.53 (m, 13H, piperydyna i adamantan 6CH₂), 1.53–1.34 (m, 6H, piperydyna i NH), 1.20–1.04 (m, 1H, piperydyna).

220 (chlorowodorek):	t.t. 216–218°C	Anal. element. (C ₂₃ H ₃₄ N ₂ O ₂ S · HCl) C, H, N.
-----------------------------	----------------	---

(RS)-1-Cykloheksylo-4-{2-[1-(fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyna 224 (RB-201) $R_f = 0.31$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

bezbarwne kryształy

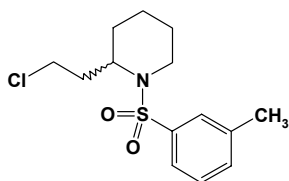
Wydajność 72%

t.t. 217–219°C

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.85–7.79 (m, 2H, fenyl H-2 and H-6), 7.56–7.45 (m, 3H, aromat H), 4.11–4.01 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.80 (dd, $J = 14.1, 3.8$, 1H, piperydyna H-6), 3.00 (td, $J = 13.7, 2.3$, 1H, piperydyna H-6), 2.63–2.52 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.50–2.36 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.36–2.16 (m, 3H, łańcuch alkilowy CH₂ i cykloheksan H-1), 1.91–1.73 (m, 5H, piperydyna i cykloheksan), 1.65–1.52 (m, 2H, piperydyna i cykloheksan), 1.52–1.38 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.30–1.04 (m, 6H, piperydyna i cykloheksan).

224 (chlorowodorek):	t.t. 216–218°C	Anal. element. (C ₂₃ H ₃₇ N ₃ O ₂ S · HCl) C, H, N.
-----------------------------	----------------	---

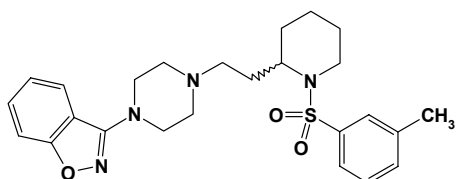
(RS)-2-(2-Chloroetylo)-1-(tolueno-3-sulfonylo)piperydyna (RB-206) $R_f = 0.27$ (SiO₂, CHCl₃/heksan = 1/1)

żółty olej

Wydajność 94%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.67–7.61 (m, 2H, aromat.), 7.41–7.32 (m, 2H, aromat.), 4.26–4.17 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.83 (dd, $J = 14.7, 4.4$, 1H, piperydyna H-6), 3.52 (td, $J = 7.2, 1.3$, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.98 (td, $J = 13.7, 2.3$, 1H, piperydyna H-6), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.26–2.13 (m, 1H, piperydyna), 1.86–1.73 (m, 1H, piperydyna), 1.54–1.39 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.29–1.10 (m, 1H, piperydyna).

(RS)-3-(4-{2-[1-(Tolueno-3-sulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-ylo)benzo[d]izoksazol 200 (RB-211) $R_f = 0.45$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

żółty olej

Wydajność 94%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

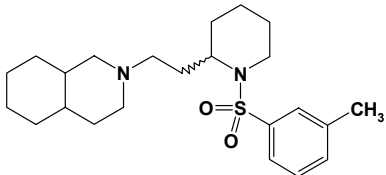
7.71–7.61 (m, 3H, fenyl i benzoizoksazol), 7.51–7.40 (m, 2H, fenyl i benzoizoksazol), 7.40–7.32 (m, 2H, fenyl) 7.21 (ddd, $J = 8.2, 6.1, 1.5$, 1H, benzoizoksazol), 4.17–4.08 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.82 (dd, $J = 14.1, 3.8$, 1H, piperydyna H-6), 3.60–3.54 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 3.05 (td, $J = 13.7, 2.3$, 1H, piperydyna H-6), 2.68–2.54 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.47–2.35 (m, 5H, CH₃ i łańcuch alkilowy CH₂), 1.98–1.83 (m, 1H, piperydyna), 1.71–1.57 (m, 1H, piperydyna), 1.56–1.36 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.29–1.10 (m, 1H, piperydyna).

200 (chlorowodorek):

t.t. 215–217°C

Anal. element. (C₂₅H₃₂N₄O₃S · HCl) C, H, N.

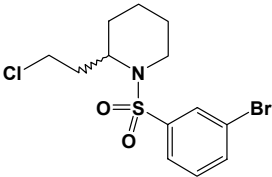
(±)-trans-2-{2-[(RS)-1-(Tolueno-3-sulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}dekahydroizochinolina 207 (RB-207)

	$R_f = 0.52$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 9/1)
	żółty olej
	Wydajność 97%
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:

7.65–7.59 (m, 2H, fenyl), 7.41–7.32 (m, 2H, fenyl), 4.10–4.00 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.81 (dd, $J = 14.7, 3.4$, 1H, piperydyna H-6), 3.06 (t, $J = 13.3$, 1H, piperydyna H-6), 3.00–2.87 (m, 1H, PHIQ), 2.83–2.68 (m, 1H, PHIQ), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.40–2.25 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.02–1.82 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.75–1.49 (m, 13H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy CH₂), 1.44–1.14 (m, 4H, piperydyna i PHIQ), 1.07–0.80 (m, 3H, PHIQ).

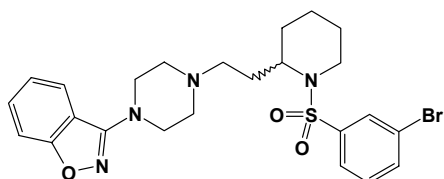
207 (fumaran):	t.t. 76–79°C	Anal. element. (C ₂₃ H ₃₆ N ₂ O ₂ S · 1.5 C ₄ H ₄ O ₄ · 1.5 H ₂ O) C, H, N.
-----------------------	--------------	---

(RS)-1-(3-Bromobenzenosulfonylo)-2-(2-chloroetylo)piperydyna (RB-203)

	$R_f = 0.41$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /heksan = 1/1)
	żółty olej
	Wydajność 96%
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:

7.99 (sd, $J = 1.7$, 1H, fenyl H-2), 7.77 (ddd, $J = 8.2, 1.0, 1.0$, 1H, aromat.), 7.68 (ddd, $J = 8.2, 1.0, 1.0$, 1H, aromat.), 3.38 (t, $J = 7.9$, 1H, fenyl H-5), 4.27–4.18 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.82 (dd, $J = 14.4, 4.1$, 1H, piperydyna H-6), 3.52 (td, $J = 6.9, 1.0$, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.99 (td, $J = 13.8, 2.6$, 1H, piperydyna H-6), 2.26–2.13 (m, 1H, piperydyna), 1.89–1.76 (m, 1H, piperydyna), 1.61–1.40 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.29–1.10 (m, 1H, piperydyna).

(RS)-3-(4-{2-[1-(3-Bromofenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-yl)-benzo[d]izoksazol **201** (RB-212)



$R_f = 0.46$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

bezbarwny olej

Wydajność 50%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

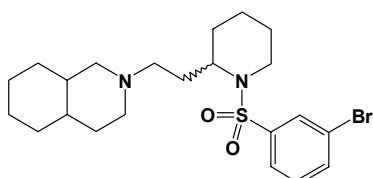
7.99 (st, $J = 1.7$, 1H, fenyl H-2), 7.80–7.75 (m, 3H, benzoizoksazol H-4 oraz fenyl H-4 i H-6), 7.72–7.65 (m, 2H, aromat), 7.52–7.42 (m, 2H, benzoizoksazol), 7.38 (t, $J = 7.9$, 1H, fenyl H-5), 7.21 (ddd, $J = 7.9, 6.1, 1.8$, 1H, benzoizoksazol), 4.18–4.09 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.82 (dd, $J = 14.4, 4.1$, 1H, piperydyna H-6), 3.60–3.54 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 3.06 (t, $J = 13.8$, 1H, piperydyna H-6), 2.68–2.54 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.45–2.34 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 1.96–1.82 (m, 1H, piperydyna), 1.74–1.59 (m, 1H, piperydyna), 1.59–1.35 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.32–1.12 (m, 1H, piperydyna).

201 (chlorowodorek):

t.t. 216–218°C

Anal. element. (C₂₄H₂₉BrN₄O₃S · HCl) C, H, N.

(±)-trans-2-{2-[(*RS*)-1-(3-Bromofenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}dekahydroizochinolina **208** (RB-208)



$R_f = 0.52$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 9/1)

żółty olej

Wydajność 93%

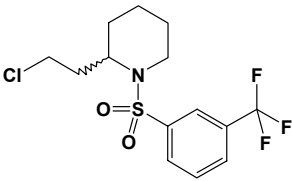
Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

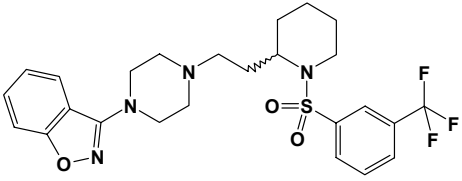
7.97 (st, $J = 1.7$, 1H, fenyl H-2), 7.97 (dt, $J = 6.3, 1.1$, 1H, fenyl H), 7.97 (dt, $J = 8.7, 1.0$, 1H, fenyl H), 7.37 (t, $J = 7.9$, 1H, fenyl H), 4.11–3.99 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.79 (dd, $J = 14.1, 3.8$, 1H, piperydyna H-6), 3.07 (t, $J = 13.3$, 1H, piperydyna H-6), 2.99–2.85 (m, 1H, PHIQ), 2.83–2.68 (m, 1H, PHIQ), 2.38–2.24 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.03–1.83 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.76–1.47 (m, 13H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy), 1.43–1.15 (m, 4H, piperydyna i PHIQ), 1.04–0.81 (m, 3H, PHIQ).

208 (fumarany):

t.t. 86–88°C

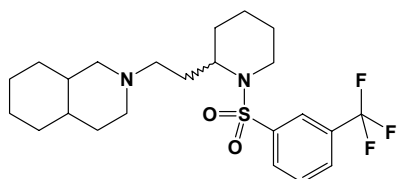
Anal. element. (C₂₂H₃₃BrN₂O₂S · 1.1 C₄H₄O₄ · H₂O) C, H, N.

<i>(RS)</i> -2-(2-Chloroetylo)-1-(3-trifluorometylobenzenosulfonylo)piperydyna (RB-204)	
	$R_f = 0.13$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /heksan = 1/1)
	żółty olej
	Wydajność 75%
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
8.12 (s, 1H, fenyl H-2), 8.05 (d, $J = 7.7$, 1H, aromat.), 7.82 (d, $J = 7.7$, 1H, aromat.), 3.38 (t, $J = 7.7$, 1H, fenyl H-5), 4.30–4.21 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.84 (dd, $J = 14.6$, 3.8, 1H, piperydyna H-6), 3.52 (td, $J = 6.9$, 2.7, 2H, łańcuch alkilowy CH ₂), 3.02 (td, $J = 13.8$, 2.5, 1H, piperydyna H-6), 2.26–2.13 (m, 1H, piperydyna), 1.90–1.78 (m, 1H, piperydyna), 1.60–1.38 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH ₂), 1.29–1.06 (m, 1H, piperydyna).	

<i>(RS)</i> -3-(4-{2-[1-(3-Trifluorometylo)fenylosulfonylo]piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-ylo)-benzo[d]izoksazol 202 (RB-213)	
	$R_f = 0.40$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 49/1);
	bezbarwne kryształy
	Wydajność 74%
	t.t. 128–130°C
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
8.11 (s, 1H, fenyl H-2), 8.04 (d, $J = 7.7$, 1H, fenyl H-6), 7.81 (d, $J = 7.7$, 1H, fenyl H-4), 7.71–7.62 (m, 2H, fenyl H-5 i benzoizoksazol H-4), 7.51–7.41 (m, 2H, benzoizoksazol), 7.22 (ddd, $J = 7.9$, 6.2, 1.7, 1H, benzoizoksazol), 4.21–4.11 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.83 (dd, $J = 14.6$, 4.3, 1H, piperydyna H-6), 3.60–3.54 (m, 4H, piperazyna 2CH ₂), 3.08 (td, $J = 13.7$, 2.4, 1H, piperydyna H-6), 2.68–2.53 (m, 4H, piperazyna 2CH ₂), 2.44–2.36 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH ₂), 1.98–1.83 (m, 1H, piperydyna), 1.75–1.60 (m, 1H, piperydyna), 1.60–1.32 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH ₂), 1.26–1.08 (m, 1H, piperydyna).	

202 (chlorowodorek):	t.t. 217–219°C	Anal. element. (C ₂₅ H ₂₉ F ₃ N ₄ O ₃ S · 1.1 HCl) C, H, N.
-----------------------------	----------------	--

(±)-*trans*-2-(2-[(*RS*)-1-[3-(Trifluorometylo)fenylosulfonylo]piperydyn-2-ylo)etylo)dekahydroizochinolina **209** (RB-209)



$R_f = 0.53$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 9/1)

żółty olej

Wydajność 86%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

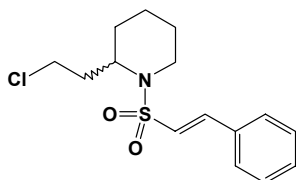
8.09 (s, 1H, fenyl H-2), 8.02 (d, $J = 8.2$, 1H, fenyl), 7.79 (d, $J = 7.7$, 1H, fenyl), 7.64 (t, $J = 7.9$, 1H, fenyl), 4.14–4.02 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.81 (dd, $J = 14.1, 3.8$, 1H, piperydyna H-6), 3.06 (t, $J = 13.3$, 1H, piperydyna H-6), 3.02–2.87 (m, 1H, PHIQ), 2.83–2.67 (m, 1H, PHIQ), 2.39–2.26 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.03–1.84 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.77–1.50 (m, 13H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy), 1.44–1.16 (m, 4H, piperydyna i PHIQ), 1.07–0.82 (m, 3H, PHIQ).

209 (fumaran):

t.t. 81–84°C

Anal. element. (C₂₃H₃₃F₃N₂O₂S · C₄H₄O₄ · H₂O) C, H, N.

(*RS,E*)-2-(2-Chloroetylo)-1-(styrylosulfonylo)piperydyna (RB-176)



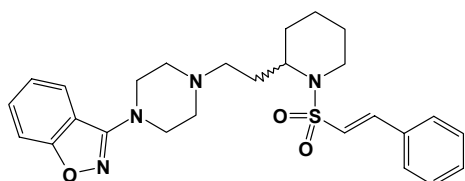
$R_f = 0.60$ (SiO₂, CHCl₃)

żółty olej

Wydajność 48%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.52–7.38 (m, 6H, CH=CH i aromat.), 6.70 (d, $J = 15.4$, 1H, CH=CH), 4.22–4.12 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.77 (dd, $J = 14.4, 1.5$, 1H, piperydyna H-6), 3.59 (t, $J = 6.9$, 2H, CH₂ łańcuch alkilowy), 2.99 (td, $J = 13.5, 2.7$, 1H, piperydyna H-6), 2.40–2.26 (m, 1H, piperydyna), 1.94–1.80 (m, 1H, piperydyna), 1.80–1.18 (m, 6H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂).

(RS,E)-3-(4-{2-[1-(Styrylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-ylo)benzo[d]izoksazol 203 (RB-179) $R_f = 0.54$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 49/1$)

żółty olej

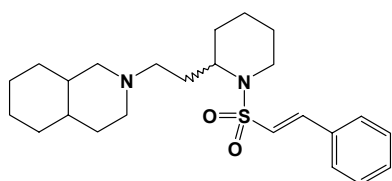
Wydajność 79%

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.67 (d, $J = 8.2$, 1H, benzoizoksazol H-4), 7.51–7.37 (m, 8H, $\text{CH}=\text{CH}$ i aromat.), 7.21 (ddd, $J = 7.9$, 6.1, 1.8, 1H, benzoizoksazol), 6.68 (d, $J = 15.4$, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 4.13–4.03 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.75 (dd, $J = 13.3$, 3.16, 1H, piperydyna H-6), 3.60–3.46 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 3.08 (td, $J = 13.3$, 2.2, 1H, piperydyna H-6), 2.72–2.55 (m, 4H, piperazyna 2CH_2), 2.55–2.40 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH_2), 2.09–1.94 (m, 1H, piperydyna), 1.80–1.55 (m, 6H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH_2), 1.55–1.39 (m, 1H, piperydyna).

203 (chlorowodorek):

t.t. 231–233°C

Anal. element. ($\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3\text{S} \cdot \text{HCl}$) C, H, N.**(±)-trans-2-(2-{(RS)-1-[(E)-Styrylosulfonylo]piperydyn-2-ylo}etylo)dekahydroizochinolina 210 (RB-177)** $R_f = 0.39$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 19/1$)

jasnożółty olej

Wydajność 86%

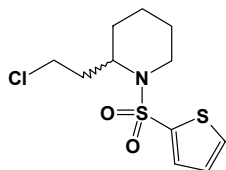
Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.50–7.37 (m, 6H, $\text{CH}=\text{CH}$ i aromat.), 6.67 (dd, $J = 15.4$, 1.0, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 4.06–3.95 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.71 (dd, $J = 13.3$, 3.1, 1H, piperydyna H-6), 3.13–2.99 (m, 1H, piperydyna H-6), 2.70–2.10 (m, 4H, łańcuch alkilowy CH_2 i PHIQ), 2.10–1.88 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.88–1.15 (m, 20H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy).

210 (fumaran):

t.t. 95–98°C

Anal. element. ($\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} \cdot 1.3 \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$) C, H, N.

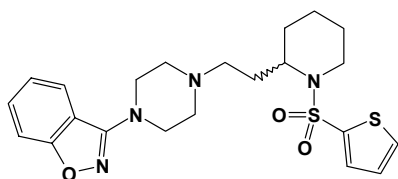
(RS)-2-(2-Chloroetylo)-1-(tiofen-2-ylosulfonylo)piperydyna (RB-184-6) $R_f = 0.52$ (SiO₂, CHCl₃)

żółty olej

Wydajność 88%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.61–7.54 (m, 2H, aromat.), 7.08 (dd, $J = 5.1, 3.6$, 1H, aromat.), 4.32–4.21 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.93 (dd, $J = 13.8, 4.4$, 1H, piperydyna H-6), 3.52 (t, $J = 7.2$, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 3.04 (td, $J = 13.9, 2.8$, 1H, piperydyna H-6), 2.30–2.12 (m, 1H, piperydyna), 1.88–1.73 (m, 1H, piperydyna), 1.63–1.35 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.31–1.10 (m, 1H, piperydyna).

(RS)-3-(4-{2-[1-(Tiofen-2-ylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-ylo)benzo[d]izoksazol 204 (RB-187) $R_f = 0.45$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

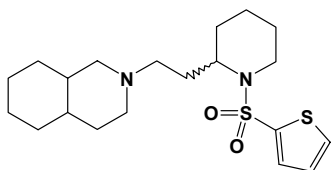
jasnożółty olej

Wydajność 54%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.69 (d, $J = 8.2$, 1H, benzoizoksazol H-4), 7.58–7.42 (m, 4H, aromat.), 7.21 (ddd, $J = 7.9, 6.1, 1.8$, 1H, benzoizoksazol), 7.07 (dd, $J = 5.1, 3.6$, 1H, tiofen), 4.23–4.13 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.86 (dd, $J = 14.1, 3.8$, 1H, piperydyna H-6), 3.62–3.53 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 3.08 (td, $J = 13.7, 2.4$, 1H, piperydyna H-6), 2.71–2.55 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.52–2.37 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.00–1.86 (m, 1H, piperydyna), 1.74–1.60 (m, 1H, piperydyna), 1.56–1.45 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.38–1.18 (m, 1H, piperydyna).

204 (chlorowodorek): t.t. 232–234°C Anal. element. (C₂₂H₂₈N₄O₃S₂ · HCl · 0.1 H₂O) C, H, N

(±)-trans-2-{2-[(RS)-1-(Tiofen-2-ylosulfonyl)piperydyn-2-ylo]etylo}dekahydroizochinolina 211 (RB-185) $R_f = 0.48$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 19/1)

żółty olej

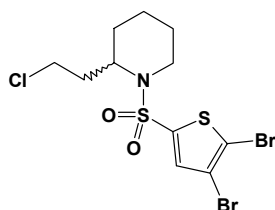
Wydajność 59%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.57–7.51 (m, 2H, aromat.), 7.05 (dd, $J = 4.9, 3.8$, 1H, aromat.), 4.16–4.05 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.83 (dd, $J = 14.1, 3.8$, 1H, piperydyna H-6), 3.14–2.90 (m, 1H, piperydyna H-6), 2.70–2.10 (m, 4H, łańcuch alkilowy CH₂ i PHIQ), 2.10–1.80 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.80–1.17 (m, 20H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy CH₂).

211 (fumaran):

t.t. 84–87°C

Anal. element. (C₂₀H₃₂N₂O₂S₂ · C₄H₄O₄ · H₂O) C, H, N.**(RS)-2-(2-Chloroetylo)-1-(4,5-dibromotiofeno-2-sulfonylo)piperydyna (RB-205)** $R_f = 0.36$ (SiO₂, CHCl₃/heksan = 1/1)

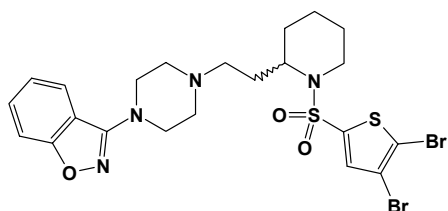
żółty olej

Wydajność 85%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.38 (s, 1H, aromat.), 4.28–4.19 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.82 (dd, $J = 14.9, 3.6$, 1H, piperydyna H-6), 3.52 (t, $J = 6.9$, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 3.05 (td, $J = 13.6$, 1H, piperydyna H-6), 2.31–2.16 (m, 1H, piperydyna), 1.96–1.81 (m, 1H, piperydyna), 1.66–1.45 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.45–1.25 (m, 1H, piperydyna).

(RS)-3-(4-{2-[1-(4,5-Dibromotiofen-2-ylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-ylo)-benzo[d]izoksazol **205** (RB-214)



$R_f = 0.42$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

bezbarwny olej

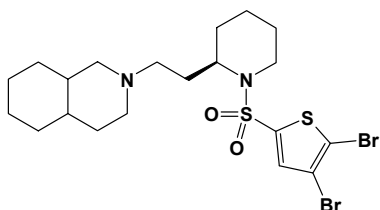
Wydajność 75%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.69 (d, $J = 7.7$, 1H, benzoizoksazol H-4), 7.51–7.42 (m, 2H, benzoizoksazol), 7.36 (s, 1H, tiofen), 7.21 (ddd, $J = 7.9, 6.1, 1.8$, 1H, benzoizoksazol), 4.20–4.10 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.80 (dd, $J = 13.8, 4.1$, 1H, piperydyna H-6), 3.65–3.55 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 3.09 (td, $J = 13.6, 2.0$, 1H, piperydyna H-6), 2.71–2.55 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.48–2.37 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 1.98–1.84 (m, 1H, piperydyna), 1.77–1.48 (m, 6H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.45–1.22 (m, 1H, piperydyna).

205 (chlorowodorek): t.t. 234–236°C Anal. element. (C₂₂H₂₆Br₂N₄O₃S₂ · HCl) C, H, N.

(±)-trans-2-{2-[*(R)*-1-(4,5-Dibromotiofen-2-sulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}dekahydroizochinolina **213** (RB-235)



$R_f = 0.28$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

żółty olej

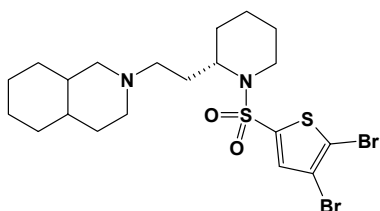
Wydajność 40%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.34 (s, 1H, tiofen.), 4.10–4.00 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.78 (dd, $J = 13.8, 3.6$, 1H, piperydyna H-6), 3.07 (t, $J = 13.3$, 1H, piperydyna H-6), 3.00–2.86 (m, 1H, PHIQ), 2.84–2.68 (m, 1H, PHIQ), 2.39–2.25 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.02–1.83 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.76–1.49 (m, 13H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy CH₂), 1.44–1.15 (m, 4H, piperydyna i PHIQ), 1.06–0.80 (m, 3H, PHIQ).

213 (fumaran): t.t. 181–183°C Anal. element. (C₂₀H₃₀Br₂N₂O₂S₂ · C₄H₄O₄) C, H, N.

(±)-*trans*-2-{2-[(*S*)-1-(4,5-Dibromotiofeno-2-sulfonylo)piperydyn-2-yl]etylo}dekahydroizochinolina **214** (RB-234)



$R_f = 0.28$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

żółty olej

Wydajność 52%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

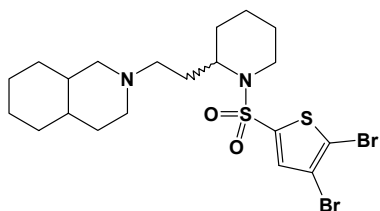
7.34 (s, 1H, tiofen), 4.10–4.00 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.78 (dd, $J = 13.8, 4.1$, 1H, piperydyna H-6), 3.08 (t, $J = 13.3$, 1H, piperydyna H-6), 3.01–2.86 (m, 1H, PHIQ), 2.85–2.69 (m, 1H, PHIQ), 2.40–2.27 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.04–1.85 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.77–1.49 (m, 13H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy CH₂), 1.44–1.15 (m, 4H, piperydyna i PHIQ), 1.06–0.80 (m, 3H, PHIQ).

214 (fumaran):

t.t. 188–190°C

Anal. element. (C₂₀H₃₀Br₂N₂O₂S₂ · C₄H₄O₄) C, H, N.

(±)-*trans*-2-{2-[(*R**S*)-1-(4,5-Dibromotiofeno-2-sulfonylo)piperydyn-2-yl]etylo}dekahydroizochinolina **215** (RB-236)



$R_f = 0.34$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

żółty olej

Wydajność 97%

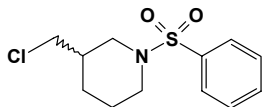
Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

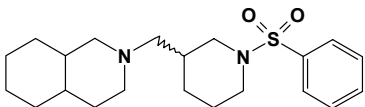
7.34 (s, 1H, aromat.), 4.12–4.00 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.77 (d, $J = 13.8, 4.1$, 1H, piperydyna H-6), 3.06 (t, $J = 13.1$, 1H, piperydyna H-6), 2.95–2.85 (m, 1H, PHIQ), 2.84–2.68 (m, 1H, PHIQ), 2.38–2.26 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.02–1.82 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.78–1.48 (m, 13H, piperydyna, PHIQ i łańcuch alkilowy), 1.44–1.15 (m, 4H, piperydyna i PHIQ), 1.05–0.79 (m, 3H, PHIQ).

215 (fumaran):

t.t. 161–164°C

Anal. element. (C₂₀H₃₀Br₂N₂O₂S₂ · C₄H₄O₄) C, H, N.

<i>(RS)</i> -3-(Chlorometylo)-1-(fenylosulfonylo)piperydyna (RB-230)	
	$R_f = 0.49$ (SiO ₂ , CHCl ₃)
	żółty olej
	Wydajność 63%
	Analiza ¹ H NMR (60 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
8.2–7.4 (m, 5H, aromat.), 4.0–3.4 (m, 4H, N(CH ₂) ₂), 3.0–0.7 (m, 7H, piperydyna i CH ₂ Cl).	

<i>(±)</i> -trans-2-[[1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-3-ylo]metylo]dekahydroizochinolina 218 (RB-233)	
	$R_f = 0.40$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 49/1)
	żółty olej
	Wydajność 68%
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
7.80–7.74 (m, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.61–7.48 (m, 3H, aromat.), 3.76–3.56 (m, 2H, piperydyna NCH ₂), 2.8–2.71 (m, 1H, piperydyna NCH), 2.71–2.56 (m, 1H, piperydyna NCH), 2.35 (td, $J = 11.3, 1.5$, 1H, PHIQ), 2.11–1.98 (m, 3H, łańcuch alkilowy CH ₂ i PHIQ), 1.92–1.43 (m, 12H, PHIQ i piperydyna), 1.35–1.10 (m, 4H, PHIQ), 1.06–0.75 (m, 3H, PHIQ).	

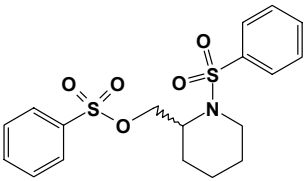
218 (fumaran):	t.t. 88–91°C	Anal. element. (C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₂ S · C ₄ H ₄ O ₄ · 0.5 H ₂ O) C, H, N.
-----------------------	--------------	---

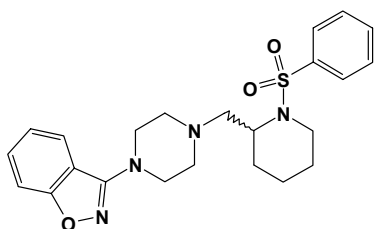
4.1.4.3. Ogólna procedura otrzymywania związków: 199, 206 i 212

Do mieszaniny odpowiedniego chlorku alkilowego (1 mmol), odpowiedniej aminy (1.2 mmol) i bezwodnego K_2CO_3 (2 mmol) w DMF (10 ml) dodano katalityczną ilość NaI. Mieszaninę reakcyjną mieszano i łagodnie ogrzewano do wrzenia przez 12h. Po oziębieniu do temperatury pokojowej, mieszaninę odsączono i wiano do wody (150 ml). Odsączony osad rozpuszczono w chloroformie, przemyto nasyconym roztworem $NaHCO_3$ i ekstrahowano chloroformem. Osuszono bezwodnym $MgSO_4$, odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej i za pomocą chromatotronu.

Wyściowe benzenosulfoniany [1-(arylo/alkilosulfonylo)piperydyn-2-ylo]metylu otrzymano w oparciu o metodę opisaną przez Lovella i wsp.⁷⁶

Do roztworu odpowiedniego chlorku kwasu sulfonowego (1 mmol) w chlorku metylenu (20 ml) dodano 2-piperydnoetanol (1 mmol) i *N*-etyliodiiizopropylaminę (2 mmol). Roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 6h, a następnie ogrzewano do wrzenia przez 6h, kontrolując postęp reakcji za pomocą TLC. Po dodaniu benzenosulfochlorku (1 mmol) kontynuowano ogrzewanie przez 6h. Po oziębieniu mieszaniny do temperatury pokojowej odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wyizolowano metodą chromatografii kolumnowej i za pomocą chromatotronu.

<i>Benzenosulfonian (RS)-[1-(fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]metylu (RB-172-6)</i>	
	$R_f = 0.54$ (SiO_2 , $CHCl_3$)
	jasnożółty olej
	Wydajność 57%
	Analiza 1H NMR (60 MHz, $CDCl_3$); δ [ppm]:
8.1–7.3 (m, 10H, aromat.), 4.5–3.9 (m, 3H, piperydyna H-2 i OCH_2), 3.9–3.5 (d, $J = 14$, 1H, piperydyna H-6), 3.1–2.5 (m, 1H, piperydyna H-6), 1.9–1.1 (m, 6H, piperydyna $3CH_2$).	

(RS)-3-(4-[[1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]metylo]piperazyn-1-ylo)benzo[d]izoksazol 199 (RB-175) $R_f = 0.62$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 49/1$)

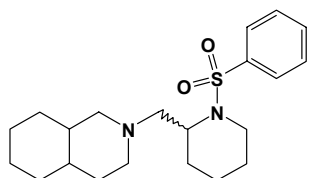
żółty olej

Wydajność 15%

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.89 (dd, $J = 8.2, 1.5, 2\text{H}$, fenyl H-2 i H-6), 7.67 (d, $J = 7.7, 1\text{H}$, benzoizoksazol H-4), 7.58–7.41 (m, 5H, aromat.), 7.21 (ddd, $J = 8.1, 6.2, 1.7, 1\text{H}$, benzoizoksazol), 4.31–4.21 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.73 (dd, $J = 13.6, 3.3, 1\text{H}$, piperydyna H-6), 3.60–3.45 (m, 4H, piperazylna 2CH_2), 3.05 (td, $J = 13.3, 2.1, 1\text{H}$, piperydyna H-6), 2.74–2.44 (m, 6H, piperazylna 2CH_2 i łańcuch alkilowy CH_2), 1.88–1.74 (m, 1H, piperydyna), 1.62–1.40 (m, 4H, piperydyna), 1.40–1.24 (m, 1H, piperydyna).

199 (chlorowodorek):	t.t. 216–218°C	Anal. element. ($\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_3\text{S} \cdot \text{HCl} \cdot 0.2 \text{H}_2\text{O}$) C, H, N.
-----------------------------	----------------	--

(±)-trans-2-[[1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]metylo]dekahydroizochinolina 206 (RB-173) $R_f = 0.37$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 19/1$)

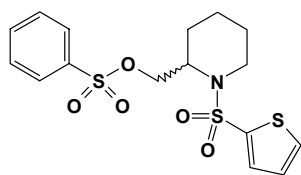
żółty olej

Wydajność 79%

Analiza ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ [ppm]:

7.88 (ddd, $J = 8.2, 6.7, 1.5, 2\text{H}$, fenyl H-2 i H-6), 7.57–7.43 (m, 3H, fenyl), 4.26–4.10 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.77–3.65 (m, 1H, piperydyna H-6), 3.00–2.84 (m, 2H, piperydyna H-6 i PHIQ), 2.82–2.66 (m, 1H, PHIQ), 2.52–2.40 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH_2), 2.08–1.86 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.79–1.51 (m, 11H, piperydyna i PHIQ), 1.48–1.16 (m, 4H, piperydyna i PHIQ), 1.09–0.85 (m, 3H, PHIQ).

206 (fumaran):	t.t. 86–89°C	Anal. element. ($\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} \cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$) C, H, N.
-----------------------	--------------	--

Benzenosulfonian (RS)-[1-(tiofen-2-ylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]metylu (RB-188) $R_f = 0.41$ (SiO₂, CHCl₃)

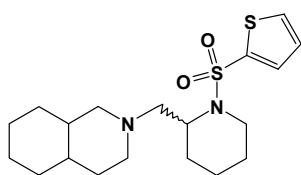
bezbarwne kryształy

Wydajność 66%

t.t. 76–78°C

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.91–7.86 (m, 2H, aromat.), 7.74–7.64 (m, 1H, tiofen), 7.61–7.51 (m, 4H, tiofen i fenyl), 7.04 (dd, $J = 5.1, 3.6$, 1H, tiofen H-4), 4.32–4.24 (m, 1H, piperydyna H-2), 4.21–4.03 (m, 2H, OCH₂), 3.84–3.73 (m, 1H, piperydyna H-6), 2.97–2.81 (m, 1H, piperydyna H-6), 1.80–1.70 (m, 1H, piperydyna), 1.61–1.23 (m, 5H, piperydyna).

(±)-trans-2-[[1-(Tiofen-2-ylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]metylo]dekahydroizochinolina 212 (RB-189) $R_f = 0.27$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

żółty olej

Wydajność 59%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.61–7.50 (m, 2H, tiofen), 7.05 (t, $J = 4.3$, 1H, tiofen), 4.26–4.12 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.76 (d, $J = 13.9$, 1H, piperydyna H-6), 3.00–2.85 (m, 2H, piperydyna H-6 i PHIQ), 2.83–2.67 (m, 1H, PHIQ), 2.52–2.41 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 2.07–1.86 (m, 2H, piperydyna i PHIQ), 1.80–1.52 (m, 11H, piperydyna i PHIQ), 1.48–1.17 (m, 4H, piperydyna i PHIQ), 1.10–0.90 (m, 3H, PHIQ).

212 (fumaran):

t.t. 88–91°C

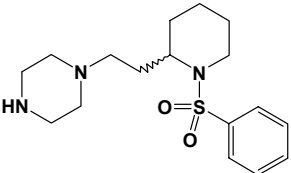
Anal. element. (C₁₉H₃₀N₂O₂S₂ · C₄H₄O₄ · 0.4 H₂O) C, H, N.

4.1.4.4. Ogólna procedura otrzymywania związków: 221 i 222

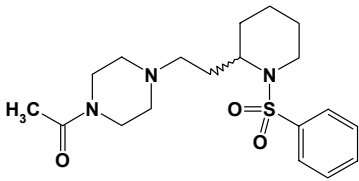
Związek RB-225 (1 mmol) rozpuszczono w 1 ml bezwodnika kwasu octowego lub propionowego i łagodnie ogrzewano do wrzenia przez 15 min. Mieszaninę ochłodzono i wiano do wody (20 ml), po czym znów ją ogrzewano do wrzenia przez 30 min. Po ochłodzeniu dodano nasycony roztwór NaHCO₃ (30 ml) i ekstrahowano octanem etylu (3 × 50 ml). Surowe produkty **221** i **222** oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej.

Wyjściowa (RS)-1-{2-[1-(fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyna została otrzymana w oparciu o metodę przedstawioną w pracy Yevicha i wsp.¹⁴⁰

Związek RB-158B (1 mmol; str. 108) dokładnie zmieszano z rozdrobnioną piperazyną (10 mmol) i zgrzewano w temperaturze 130°C przez 2h. Następnie gorącą mieszaninę wiano do wody (50 ml), dodano 50% roztwór NaOH (2 mmol) i ekstrahowano chloroformem (3 × 50ml). Osuszono warstwę organiczną bezwodnym MgSO₄ i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej.

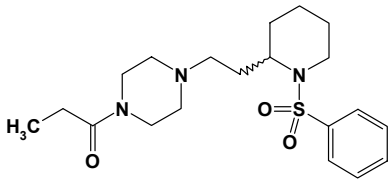
<i>(RS)-1-{2-[1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyna (RB-225)</i>	
	$R_f = 0.37$ (Al ₂ O ₃ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 49/1)
	jasnożółty olej
	Wydajność 68%
	Analiza ¹ H NMR (60 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
8.2–7.4 (m, 5H, aromat.), 4.4–3.4(m, 2H, piperydyna H-2 i H-6), 3.4–2.7 (m, 7H, łańcuch alkilowy CH ₂ , piperazyna 2CH ₂ , piperydyna H-6'), 2.7–2.1 (m, 5H, piperazyna 2CH ₂ i NH), 2.1–0.9 (m, 8H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH ₂).	

(RS)-1-(4-{2-[1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-ylo)etanon 221 (RB-226)

	$R_f = 0.31$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 19/1)
	żółty olej
	Wydajność 72%
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
<p>7.84 dd, $J = 8.2, 1.5, 2H$, fenyl H-2 i H-6), 7.59–7.45 (m, 3H, aromat.), 4.16–4.07 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.81 (dd, $J = 14.4, 3.6, 1H$, piperydyna H-6), 3.68–3.52 (m, 2H, piperazyna CH₂), 3.46 (t, $J = 5.1, 2H$, piperazyna CH₂), 3.03 (td, $J = 13.7, 2.4, 1H$, piperydyna H-6), 2.52–2.28 (m, 6H, piperazyna 2CH₂ i łańcuch alkilowy CH₂), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.95–1.78 (m, 1H, piperydyna), 1.67–1.54 (m, 1H, piperydyna), 1.54–1.32 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.24–1.06 (m, 1H, piperydyna).</p>	

221 (chlorowodorek):	t.t. 217–219°C	Anal. element. (C ₁₉ H ₂₉ N ₃ O ₃ S · HCl · 0.4H ₂ O) C, H, N.
-----------------------------	----------------	---

(RS)-1-(4-{2-[1-(Fenylosulfonylo)piperydyn-2-ylo]etylo}piperazyn-1-ylo)propan-1-on 222 (RB-227)

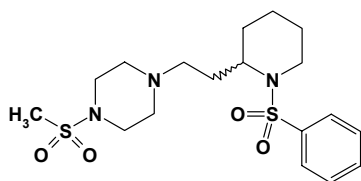
	$R_f = 0.38$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 19/1)
	żółty olej
	Wydajność 90%
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:
<p>7.86–7.80 (m, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.58–7.45 (m, 3H, aromat.), 4.15–4.06 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.81 (dd, $J = 14.1, 4.4, 1H$, piperydyna H-6), 3.70–3.60 (m, 2H, piperazyna CH₂), 3.53–3.45 (m, 2H, piperazyna CH₂), 3.03 (td, $J = 13.8, 2.6, 1H$, piperydyna H-6), 2.56–2.36 (m, 6H, piperazyna 2CH₂ i łańcuch alkilowy CH₂), 2.33 (q, $J = 7.5, 2H$, COCH₂), 2.00–1.85 (m, 1H, piperydyna), 1.69–1.55 (m, 1H, piperydyna), 1.55–1.32 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.22–1.08 (m, 1H, piperydyna), 1.14 (t, $J = 7.4, 3H$, CH₃).</p>	

222 (chlorowodorek):	t.t. 218–220°C	Anal. element. (C ₂₀ H ₃₁ N ₃ O ₃ S · HCl) C, H, N.
-----------------------------	----------------	---

4.1.4.5. Procedura otrzymywania związku 223

Do rozpuszczonego w chloroformie RB-225 (1 mmol; str. 127) dodano *N*-etyldiizopropylaminy (2 mmol) i chlorek kwasu metanosulfonowego (2 mmol). Reagenty mieszano w temperaturze pokojowej przez 6h, a następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt wyizolowano metodą chromatografii kolumnowej i z wykorzystaniem chromatotronu.

(*RS*)-1-(Metylosulfonylo)-4-{2-[1-(fenylosulfonylo)piperdyn-2-ylo]etylo}piperazyna 223 (RB-228)



$R_f = 0.29$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 49/1)

żółty olej

Wydajność 71%

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.86–7.80 (m, 2H, fenyl H-2 i H-6), 7.59–7.45 (m, 3H, aromat.), 4.18–4.08 (m, 1H, piperydyna H-2), 3.80 (dd, $J = 14.1, 3.8$, 1H, piperydyna H-6), 3.626–3.19 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 3.03 (td, $J = 13.7, 2.3$, 1H, piperydyna H-6), 2.77 (s, 3H, CH₃), 2.59–2.43 (m, 4H, piperazyna 2CH₂), 2.43–2.35 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 1.92–1.78 (m, 1H, piperydyna), 1.65–1.51 (m, 1H, piperydyna), 1.51–1.35 (m, 5H, piperydyna i łańcuch alkilowy CH₂), 1.25–1.05 (m, 1H, piperydyna).

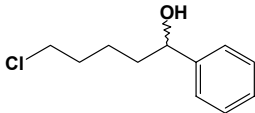
223 (chlorowodorek):	t.t. 179–180°C	Anal. element. (C ₁₈ H ₂₉ N ₃ O ₄ S ₂ · HCl · 0.4H ₂ O) C, H, N.
-----------------------------	----------------	--

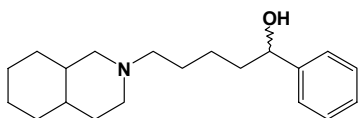
4.1.4.6. Ogólna procedura otrzymywania związków 216 i 217

Do mieszaniny odpowiedniego chlorku alkilowego (1 mmol), *trans*-perhydroizochinoliny (1.2 mmol) i bezwodnego K_2CO_3 (2 mmol) w acetonitrylu dodano katalityczną ilość NaI. Mieszaninę reakcyjną mieszano i ogrzewano do wrzenia przez 6h. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po oziębieniu do temperatury pokojowej mieszaninę odsączono i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano nasycony roztwór $NaHCO_3$ i ekstrahowano chloroformem. Organiczną część osuszono bezwodnym $MgSO_4$, odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik za pomocą wyparki próżniowej. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej i za pomocą chromatotronu.

Wyjściowe (\pm)-5-chloro-1-fenylpentan-1-ol (RB-229) i (\pm)-1-(4-bromofenyl)-5-chloropentan-1-ol (RB-238) otrzymano metodą Grignarda.¹⁴⁴

Roztwór 1-bromo-4-chlorobutanu w bezwodnym eterze dietylowym wkraplano, intensywnie mieszając, na wiórki Mg. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano do wrzenia przez ok. 2h. Gdy magnez całkowicie przereagował, oziębiono mieszaninę i wkroplono roztwór odpowiedniego aldehydu w bezwodnym eterze dietylowym. Następnie ogrzewano do wrzenia przez ok. 2h. Ochłodzono do temperatury pokojowej, dodano pokruszony lód i wkraplano 25% roztwór HCl aż do rozpuszczenia osadu soli magnezowych. Następnie rozdzielono wytworzone warstwy. Wodną warstwę ekstrahowano eterem dietylowym, a połączone wyciągi eterowe przemyto wodnym roztworem $NaHCO_3$ i wodą. Po osuszeniu bezwodnym K_2CO_3 , oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej i za pomocą chromatotronu.

(\pm)-5-Chloro-1-fenylpentan-1-ol (RB-229)	
	$R_f = 0.25$ (SiO_2 , $CHCl_3/n$ -heksan = 1/1)
	bezbarwny olej
	Wydajność 15%
	Analiza 1H NMR (60 MHz, $CDCl_3$); δ [ppm]:
7.6–7.1 (m, 5H, aromat.), 4.7–4.3 (m, 1H, CH), 3.6–3.1 (m, 3H, OH i łańcuch alkilowy CH_2), 1.9–1.1 (m, 6H, łańcuch alkilowy $3CH_2$).	

(±)-5-(trans-Dekahydroizochinolin-2-ylo)-1-fenylopentan-1-ol 216 (RB-237) $R_f = 0.25$ (SiO₂, CHCl₃/CH₃OH = 9/1)

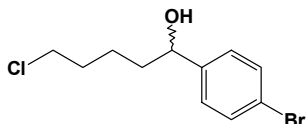
bezbarwne kryształy

Wydajność 42%

t.t. 83–85°C

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.37–7.28 (m, 4H, aromat.), 7.28–7.20 (m, 1H, aromat.), 4.66 (dd, $J = 7.7, 5.6$, 1H, CHOH), 3.64 (szeroki s, 1H, OH), 2.99–2.88 (m, 1H, PHIQ), 2.81–2.71 (m, 1H, PHIQ), 2.31 (t, $J = 7.5$, 2H, NCH₂), 1.96–1.84 (m, 1H, PHIQ), 1.83–1.65 (m, 4H, łańcuch alkilowy CH₂ i PHIQ), 1.64–1.14 (m, 12H, łańcuch alkilowy 2CH₂ i PHIQ), 1.05–0.78 (m, 3H, PHIQ).

Anal. element. (C₂₀H₃₁NO · 0.3H₂O) C, H, N.**(±)-1-(4-Bromofenylo)-5-chloropentan-1-ol (RB-238)** $R_f = 0.39$ (SiO₂, CHCl₃)

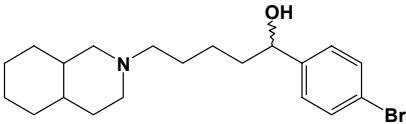
bezbarwny olej

Wydajność 14%

Analiza ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.9–7.1 (m, 4H, aromat.), 4.9–4.4 (m, 1H, CH), 3.7–3.2 (m, 2H, łańcuch alkilowy CH₂), 3.1–2.6 (m, 1H, OH), 2.1–1.1 (m, 6H, łańcuch alkilowy 3CH₂).

(±)-1-(4-Bromofenylo)-5-(trans-dekahydroizochinolin-2-ylo)pentan-1-ol 217 (RB-239)

	$R_f = 0.30$ (SiO ₂ , CHCl ₃ /CH ₃ OH = 9/1)
	bezbarwne kryształy
	Wydajność 75%
	t.t. 109–111°C
	Analiza ¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃); δ [ppm]:

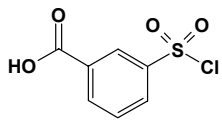
7.44 (d, $J = 8.7$, 2H, aromat.), 7.22 (d, $J = 8.2$, 2H, aromat.), 4.62 (d, $J = 6.7$, 1H, CHO H), 4.18 (szeroki s, 1H, OH), 2.95–2.83 (m, 1H, PHIQ), 2.77–2.65 (m, 1H, PHIQ), 2.27 (t, $J = 7.2$, 2H, NCH₂), 1.91–1.79 (m, 1H, PHIQ), 1.77–1.65 (m, 4H, łańcuch alkilowy CH₂ i PHIQ), 1.63–1.08 (m, 12H, łańcuch alkilowy 2CH₂ i PHIQ), 1.05–0.76 (m, 3H, PHIQ).

Anal. element. (C₂₀H₃₀BrNO · 0.3H₂O) C, H, N.

4.1.4.7. Procedura otrzymywania związku 219

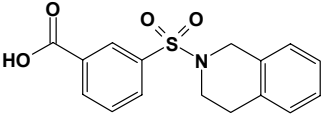
Etap 1. Do oziębionego (0°C) i mieszanego kwasu chlorosulfonowego (200 ml) dodawano małymi porcjami kwas benzoesowy (0.2 mol). Następnie mieszaninę doprowadzono do temperatury pokojowej i ogrzewano do wrzenia przez 3h. Po doprowadzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej, dodawano ją kroplami, intensywnie mieszając, do oziębionej wody (0°C). Otrzymany osad odsączono, osuszono i bezpośrednio użyto w następnym etapie.

Kwas 3-(chlorosulfonylo)benzoesowy (RB-241)

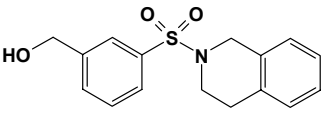
	bezbarwne kryształy
	Wydajność 74%
	t.t. 129–132°C

Etap 2. Do roztworu RB-241 w suchym THF dodano tetrahydroizochinolinę i mieszano przez 2h w temperaturze pokojowej. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość rozpuszczono w 1N HCl. Mieszaninę reakcyjną ekstrahowano

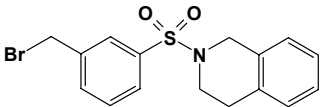
octanem etylu, suszono bezwodnym MgSO_4 i odparowano rozpuszczalnik na wyparce próżniowej. Surowy produkt poddano chromatografii kolumnowej.

<i>Kwas 3-[3,4-dihydroizochinolin-2(1H)-ylosulfonylo]benzoesowy (RB-242)</i>	
	$R_f = 0.26$ (SiO_2 , AcOEt)
	bezbarwne kryształy
	Wydajność 34%
	t.t. 216–218°C
	Analiza $^1\text{H NMR}$ (60 MHz, DMSO): δ [ppm]:
8.4–7.5 (m, 4H, aromat.), 7.3–6.9 (m, 4H, aromat.), 4.3 (s, 2H, THIQ CH_2), 3.5–3.1 (m, 2H, THIQ CH_2), 3.1–2.6 (m, 2H, THIQ CH_2).	

Etap 3. Do roztworu RB-242 (1 mmol) w bezwodnym chlorku metylenu dodano *N*-etyldiizopropylaminy (1.5 mmol), oziębiono (0°C) i dodano mrówczanu 2,2,2-trichloroetylowego (1.5 mmol). Po 2h mieszaninę reakcyjną zagęszczono. Pozostałość potraktowano bezwodnym THF i odsączono. Przesącz ochłodzono w łaźni lodowej i dodano kroplami wodny roztwór NaBH_4 (5 mmol). Mieszaninę stopniowo doprowadzono do temperatury pokojowej. Po 16h mieszaninę reakcyjną zgaszono 6M HCl i zalkalizowano nasyconym roztworem NaHCO_3 . Następnie ekstrahowano eterem dietylowym i suszono bezwodnym Na_2SO_4 . Odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt poddano chromatografii kolumnowej.

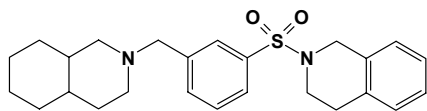
<i>{3-[3,4-Dihydroizochinolin-2(1H)-ylosulfonylo]fenylo}metanol (RB-243)</i>	
	$R_f = 0.45$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 99/1$)
	bezbarwne kryształy
	Wydajność 80%
	t.t. 133–134°C
	Analiza $^1\text{H NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): δ [ppm]:
7.9–7.4 (m, 4H, aromat.), 7.3–6.9 (m, 4H, aromat.), 5.6–5.3 (m, 1H, OH), 4.6 (d, $J = 5$, 2H, CH_2OH), 4.2 (s, 2H, THIQ CH_2), 3.5–3.1 (m, 2H, THIQ CH_2), 3.1–2.6 (m, 2H, THIQ CH_2).	

Etap 4. Do roztworu RB-243 (1 mmol) w bezwodnym chlorku metylenu (9 ml) dodano czterobromek węgla (1.1 mmol). Mieszaninę reakcyjną oziębiono do 0°C i dodano trifenylofosfinę (1.1 mmol). Mieszaninę powoli (w przeciągu 2h) doprowadzono do temperatury pokojowej, następnie dodano nasycony roztwór NaHCO₃ i ekstrahowano chlorkiem metylenu. Ekstrakty organiczne połączono i suszono bezwodnym Na₂SO₄. Po przesączeniu i usunięciu rozpuszczalnika na wyparce próżniowej surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej.

2-[3-(Bromometylo)fenylosulfonyl]-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina (RB-244)	
	$R_f = 0.72$ (SiO ₂ , CHCl ₃)
	bezbarwne kryształy
	Wydajność 78%
	t.t. 117–119°C
	Analiza ¹ H NMR (60 MHz, CDCl ₃): δ [ppm]:
7.9–7.4 (m, 4H, aromat.), 7.4–6.9 (m, 4H, aromat.), 4.5 (s, 2H, CH ₂ Br), 4.2 (s, 2H, THIQ CH ₂), 3.5–3.2 (m, 2H, THIQ CH ₂), 3.0–2.7 (m, 2H, THIQ CH ₂).	

Etap 5. Do mieszaniny RB-244 (1 mmol), *trans*-perhydroizochinoliny (1.2 mmol) i bezwodnego K₂CO₃ (2 mmol) w acetonitrylu dodano katalityczną ilość NaI. Mieszaninę reakcyjną mieszano i ogrzewano do wrzenia przez 3h. Po oziębieniu do temperatury pokojowej, mieszaninę odsączono i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości dodano nasycony roztwór NaHCO₃ i ekstrahowano chloroformem. Ekstrakty organiczne połączono, osuszono bezwodnym MgSO₄, odsączono środek suszący i odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej i za pomocą chromatotronu.

2-(3-[[\pm]-trans-Dekahydroizochinolin-2-ylometylo]fenylosulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina **219** (RB-246)



$R_f = 0.26$ (SiO₂, CHCl₃)

bezbarwne kryształy

Wydajność 96%

t.t. 85–87°C

Analiza ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃); δ [ppm]:

7.81 (s, 1H, fenyl H-2), 7.71 (dt, $J = 7.7, 1.5$, 1H, aromat.), 7.55 (d, $J = 7.7$, 1H, aromat.), 3.45 (t, $J = 7.7$, 1H, aromat.), 7.18–7.10 (m, 2H, aromat.), 7.10–7.00 (m, 2H, aromat.), 4.27 (s, 2H, THIQ CH₂), 3.52 (s, 2H, łańcuch metylenowy CH₂), 3.37 (t, $J = 5.8$, 2H, THIQ CH₂), 2.91 (t, $J = 5.8$, 2H, THIQ CH₂), 2.86–2.77 (m, 1H, PHIQ), 2.69–2.61 (m, 1H, PHIQ), 1.97 (td, $J = 11.8, 2.6$, 1H, PHIQ), 1.75–1.65 (m, 2H, PHIQ), 1.63 (t, $J = 11.1$, 2H PHIQ), 1.55–1.39 (m, 2H, PHIQ), 1.37–1.15 (m, 4H, PHIQ), 1.06–0.79 (m, 3H, PHIQ).

219 (fumarany):

t.t. 92–95°C

Anal. element. (C₂₅H₃₂N₂O₂S · C₄H₄O₄ · 0.9 H₂O) C, H, N.

4.2. Metody badań *in silico*

4.2.1. Analiza konformacyjna pochodnych benzotriazolu

Wszystkie procedury i obliczenia modelowania cząsteczkowego przeprowadzono za pomocą programu Molecular Modeling Pro Plus wersja 6.0.3 (ChemSw Inc.).¹⁴⁵ Przed analizą kątów dwuściennych τ_1 i τ_2 struktura związków była zminimalizowana w polu siłowym MM2. Analizę konformacyjną przeprowadzono, zmieniając kąty torsyjne co 1° w zakresie $0-360^\circ$. Wartości pozostałych kątów torsyjnych „zamrożono”, aby zredukować ilość niskoenergetycznych konformacji.

4.2.2. Dokowanie ligandów

Opracowana w ZChL metodyka modelowania receptorów i dokowania ligandów obejmuje generację dużej populacji modeli homologicznych, ekstensywnie próbkujących przestrzeń konformacyjną miejsca wiążącego receptora oraz automatyczne dokowanie ligandów do całej populacji modeli w celu uzyskania najbardziej korzystnego energetycznie kompleksu ligand-receptor.¹⁴⁶

Do dokowania użyto zestawu 100, opracowanych wcześniej, modeli homologicznych receptora 5-HT₇.^{68,146} Automatyczne dokowanie ligandów zostało przeprowadzone z użyciem programu FlexX 2.0.3¹⁴⁷ z zastosowaniem więzu (filtru) farmakoforowego na oddziaływanie pomiędzy tlenem karboksylowym kwasu asparaginowego 3.32 receptora, a protonowanym atomem azotu liganda. Program przeszukuje przestrzeń konformacyjną liganda próbując jego możliwe położenia w miejscu wiążącym. W zależności od swobody konformacyjnej liganda otrzymuje się od pojedynczych do kilku tysięcy kompleksów z danym modelem receptora.

Otrzymane kompleksy ligand-receptor były automatycznie oceniane przez funkcję F_score (wewnętrzną funkcję programu FlexX), uwzględniającą wkłady od wszystkich oddziaływań korzystnych i niekorzystnych pomiędzy ligandem i receptorem (elektrostatycznych, sterycznych), a także od energii torsyjnej samego liganda. Pod uwagę brano 100 najlepszych kompleksów wg funkcji F_score dla każdego związku, w danym modelu receptora. Otrzymane kompleksy ligand-receptor, zostały poddane rescorengowi (ponownej ocenie) z użyciem 4 kolejnych funkcji: D_score, G_score, Chem_score i PMF_score, a następnie procedurze *consensus scoring* z użyciem modułu CScore, programu SYBYL 7.0. Moduł CScore normalizuje i ocenia kompleksy według wszystkich funkcji i jeśli „score” danego kompleksu znajduje się w pierwszych 50% wyników; przypisuje mu wartość „1”. Zastosowanie CScore umożliwia wytypowanie kompleksów ligand-receptor wysoko ocenianych równocześnie przez wszystkie 5 funkcji (ocena „5”), co zwiększa

prawdopodobieństwo ich wysokiej jakości. Do analizy oddziaływań, spośród tych posiadających najwyższą ocenę, wybrano kompleksy o najwyższej wartości funkcji PMF_score.

4.2.3. Metody otrzymania modeli farmakoforowych 5-HT₇R i analiza dopasowania własnej biblioteki pochodnych sulfonamidowych

Modele analizowanych w pracy trójwymiarowych struktur związków (enancjomery R) zbudowano za pomocą programu ACD/Chem Sketch Freeware v.10.0.¹⁴⁸ Wszystkie kolejne obliczenia wykonano przy użyciu protokołów zawartych w programie Accelrys Discovery Studio Client v.2.5.0.9164. Ponieważ konformacje bioaktywne często posiadają energię wyższą od globalnego minimum, dlatego dla wszystkich testowanych związków wygenerowano populacje konformacji (± 20 kcal, pole siłowe CHARMM) za pomocą protokołu *Diverse Conformation Generation*, stosując metodę BEST (*Best-quality Conformation Generation Method*). Otrzymany w ten sposób zbiór konformacji został wykorzystany do następujących obliczeń.

Relacje przestrzenne elementów farmakoforowych modelu selektywności otrzymanego w oparciu o podejście *structure-based* zostały odwzorowane za pomocą narzędzi pakietu Discovery Studio Acclerys (*Query toolbar*). Na uzyskany model nałożono ograniczenia steryczne (*EV – Excluded Volumes*) za pomocą algorytmu *Catalyst HipHopRefine*. Seria treningowa (**63–66, 84, 85, 96, 98, 99**) posłużyła jako zestaw aktywnych związków, natomiast w zestawie nieaktywnych struktur znalazły się: **206, 212, 218, 220, 222, 224**. Protokół *Steric Refinement with Excluded Volumes* został użyty dwukrotnie. Pierwszy model z 27 *EV* otrzymano, gdy przypisano dla związków nieaktywnych wartość 0 parametru ignorowania cech farmakoforowych (*MaxOmitFeat = 0*) oraz drugi, z 94 *EV*, gdy wartość wspomnianego parametru wynosiła 1 (*MaxOmitFeat = 1*).

Rekonstrukcja modelu selektywności metodą *ligand-based* została przeprowadzona na podstawie zestawu selektywnych związków **63–66, 84, 85, 96, 98, 99**, stosując algorytm *Catalyst HipHop*, który wygenerował zestaw farmakoforów wspólnych dla wszystkich struktur wprowadzonych do protokołu *Common Feature Pharmacophoric Generation*. Domyślne ustawienia protokołu pozostawiono niezmienione. Procedurę dodawania obszarów sterycznie zabronionych przeprowadzono w sposób analogiczny, jak w przypadku wyżej opisanego modelu selektywności (*structure-based*). Otrzymano dwa modele, pierwszy z 20 *EV* (*MaxOmitFeat = 0*) oraz drugi z 70 *EV* (*MaxOmitFeat = 1*).

Porównanie modeli *structure-based* i *ligand-based* wykonano za pomocą protokołu *Pharmacophore Comparison*. Przeprowadzona operacja optymalnego nałożenia obu modeli

wykazała, że średnie odchylenie standardowe (*RMSD – Root Mean Square Deviation*) wynosi 1.89Å.

Do otrzymania drugiego modelu metodą *ligand-based* został zastosowany protokół *3D QSAR Pharmacophore Generation* (algorytm *Catalyst HypoGen*). Na podstawie wybranego zestawu 14 związków o zróżnicowanym powinowactwie **196, 197, 206, 207, 210, 212, 215–220, 222, 224** otrzymano pięciopunktowy model (AR, HBA, PI, HYD i HYD1). W ustawieniach protokołu dozwolono na generowanie sfer cech farmakoforowych o różnym promieniu (*Variable tolerances*) i istotności (*Variable weights*). Dane przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 9. Parametry sfer cech farmakoforowych w modelu 3D QSAR.

	AR	HBA	PI	HYD	HYD1
Promień sfer [Å]	1,6	1,6	1,6	1,45	1,6
Istotność sfer	1,725	2,243	1,725	1,725	1,725

Następnie za pomocą algorytmu *HipHopRefine*, wykorzystując pięć nieaktywnych związków z zestawu serii treningowej **206, 212, 220, 222, 224** (*MaxOmitFeat* = 0), uzupełniono uzyskany model o 10 obszarów sterycznie zabronionych.

Do porównania struktur badanych związków (populacji konformacji) z wszystkimi wspomnianymi wyżej modelami zastosowano metodę fleksyjnego dopasowania (*flexible fitting*) w protokole *Ligand Pharmacophore mapping*. Eksperymenty mapowania dla każdego modelu przeprowadzono dwukrotnie, gdy parametr ignorowania cech farmakoforowych (*MaxOmitFeat*) wynosił 0 i 1.

4.3. Metody badań receptorowych *in vitro*

Oznaczenia powinowactwa zsyntezowanych związków do badanych typów receptorów aminergiczných przeprowadzono Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w oparciu o klasyczne metody radioizotopowe zgodnie z zamieszczoną poniżej tabelą. Szczegóły procedur w odniesieniu do poszczególnych typów receptorów podane są w odpowiednich publikacjach.

Tabela 10. Materiał biologiczny i radioligandy zastosowane do wyznaczenia powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ i D₂.

Receptor	Materiał biologiczny	Radioligand	Wiązanie niespecyficzne	Lit.
5-HT _{1A}	Hipokamp	[³ H]-8-OH-DPAT (NEN Chemicals)	5-HT	149
5-HT _{2A}	Kora	[³ H]-ketanseryna (NEN Chemicals)	Metysergid	149
5-HT ₆	HEK293	[³ H]-LSD (Hartmann GmbH)	Metiotepina	150
5-HT ₇	Podwzgórze lub HEK293	[³ H]-5-CT (Amersham)	5-HT	6,107
D ₂	Prążkowie	[³ H]-spiperon (Perkin-Elmer)	Butaklamol	9

Metodyka tych badań polega na inkubacji odpowiedniego materiału biologicznego ze specyficznym radioligandem w obecności badanego związku, podczas której obie substancje współzawodniczą w procesie tworzenia kompleksu z danym typem receptora. Ustalony stan równowagi zostaje utrwalony przez odsączenie frakcji białkowej, w której zawartość związanego radioliganda oznaczana jest w liczniku scyntylicyjnym. Równocześnie badany jest szereg stężeń danego związku (najczęściej 8–10 z przedziału 10⁻³–10⁻¹⁰ M), co pozwala na wykreślenie krzywej wypierania (zależności % wypierania od stężenia związku) i obliczenie wartości IC₅₀. Wartość stałej wiązania (K_i) obliczana jest jako średnia przynajmniej z trzech niezależnych eksperymentów na podstawie równania Cheng-Prusoff'a:¹⁵¹

$$K_i = IC_{50} / (1 + L/K_D)$$

gdzie: IC₅₀ – stężenie badanego związku przy którym wypierane jest 50% radioliganda

L – stężenie radioliganda

K_D – stała równowagi wiązania radioliganda w danym układzie

Standardowy błąd pomiaru (SEM) nie przekraczał 15%.

Aktywność do receptorów serotoninowych 5-HT₆ określono szacunkowo wg uproszczonej procedury, która polega na pomiarze % wypierania radioliganda ([³H]-LSD) tylko przez jedno stężenie danej substancji (10⁻⁶ M). W każdym eksperymencie oznaczany był dodatkowo związek wzorcowy o znanym, wysokim powinowactwie do receptorów 5-HT₆ (olanzapina) dla bezpośredniego porównania wyników i jako kontrola wewnętrzna testu.

Spis rysunków

1. Przykładowe związki posiadające mieszany profil receptorowy 5-HT _{1A} /5-HT ₇	13
2. Wybrane ligandy receptorów 5-HT _{1A} i 5-HT ₇ zbadane w ZChL	14
3. Homologia 5-HT _{7A} R z innymi receptorami serotoninowymi	16
4. Pochodne tryptaminy	19
5. Pochodne ergoliny	20
6. Trójcykliczne leki psychotropowe	21
7. Aporfiny	22
8. Pochodne 2-aminotetraliny i 2-aminochromanu	24
9. Pochodne piperydyny	24
10. Arylosulfonamidoalkiloaminy i arylosulfonoalkiloaminy	27
11a. Długołańcuchowe arylopiperydyny i arylopiiperazyny	28
11b. Długołańcuchowe arylopiperydyny, arylopiiperazyny i β -karboliny	30
11c. Długołańcuchowe arylopiperydyny i arylopiiperazyny	32
11d. Długołańcuchowe arylopiiperazyny badane w ZChL	33
11e. Pochodne długołańcuchowych arylopiiperazyn	34
12. Pochodne diaminopirydyny, diaminopirymidyny i diaminotriazyny	35
13. Pochodne amidynomocznika	36
14. Proste arylopiiperazyny	37
15. Pochodne aminoetylopirolu i aminoetylopirazolu	38
16. Związki o zróżnicowanej strukturze	40
17. Mapy konturowe CoMSIA	42
18. Schematyczne przedstawienie moleli farmakoforowych 5-HT ₇ R	45
19. Nałożenie liniowo usztywnionej struktury 172 z A: izomerami <i>cis</i> (179 i 182) oraz B: izomerami <i>trans</i> (180 i 183)	52
20. Nałożenie konformerów 185 , 186 , 188 i 189 w lokalnych minimach energetycznych ilustrujące, m.in. różne obszary, które mogą być zajmowane przez terminalne podstawniki benzotriazolowe	56
21. Struktury związków modelowych dla pilotowej serii związków	59
22. Pilotowa seria związków	60

23. Sposób wiązania pilotowej serii związków do modelu 5-HT ₇ R, przedstawiony na przykładzie najlepszych kompleksów ligand–receptor	64
24. Wyniki mapowania nowych związków 196, 197, 206–224 oraz znanych ligandów 63–66, 84, 85, 96, 98, 99 do co najmniej trzech i czterech cech farmakoforowych zrekonstruowanego modelu selektywności	80
25. Seria treningowa selektywnych ligandów 5-HT ₇ R użytych do wygenerowania pierwotnej hipotezy selektywności w oparciu o strategię <i>structure-based</i>	81
26. Wyniki mapowania nowych związków 196, 197, 206–224 oraz znanych ligandów 63–66, 84, 85, 96, 98, 99 do hipotezy selektywności rozbudowanej o obszary sterycznie zabronione (<i>EV</i>)	82
27. Nałożenie zrekonstruowanej hipotezy selektywności <i>structure-based</i> i nowego modelu opartego o <i>ligand-based design</i>	83
28. Model <i>3D QSAR</i> wygenerowany metodą <i>ligand-based design</i> i macierz odległości pomiędzy cechami farmakoforowymi	84
29. Wykresy zależności między powinowactwem wyznaczonym eksperymentalnie, a A – parametrem dopasowania do modelu (<i>FitValue</i>) oraz B – obliczoną aktywnością pK _i	85
30. Porównanie modeli: A – zrekonstruowanego selektywności; B – otrzymanego metodą <i>ligand-based design</i> algorytmem HipHop; C – otrzymanego wg protokołu <i>3D QSAR</i> algorytmem <i>Catalyst HypoGen</i>	86

Spis tabel

1. Porównanie własności receptorów 5-HT _{1A} i 5-HT ₇	18
2. Struktura, powinowactwo i selektywność 5-HT ₇ R/5-HT _{1A} R otrzymanych fleksyjnych (struktura A) i usztywnionych (B) pochodnych piperolidyny	50
3. Struktura, powinowactwo i selektywność 5-HT ₇ R/5-HT _{1A} R fleksyjnych i usztywnionych pochodnych benzotriazolu	54
4. Seria pochodnych benzoizoksazolopiperazyny	66
5. Seria pochodnych perhydroizochinoliny	71
6. Seria połączeń z modyfikacjami fragmentu aminowego	74
7. Materiał biologiczny i radioligandy zastosowane do wyznaczenia powinowactwa do receptorów 5-HT _{2A} , D ₂ i α ₁	76
8. Poszerzony profil receptorowy arylosulfonamidowych ligandów 5-HT ₇ R otrzymanych w serii pochodnych benzizoksazolu i perhydroizochinoliny	77
9. Parametry sfer cech farmakoforowych w modelu 3D QSAR	138
10. Materiał biologiczny i radioligandy zastosowane do wyznaczenia powinowactwa do receptorów 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} , 5-HT ₆ , 5-HT ₇ i D ₂	139

5. PIŚMIENNICTWO

1. Paillet-Loilier M.; Fabis F.; Lepailleur A.; Bureau R.; Butt-Gueulle S.; Dauphin F.; Delarue C.; Vaudry H.; Rault S. Phenylpyrroles, a new chemolibrary virtual screening class of 5-HT₇ receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*(16), 3753-7.
2. Perrone R.; Berardi F.; Colabufo N. A.; Lacivita E.; Leopoldo M.; Tortorella V. Synthesis and structure-affinity relationships of 1-[omega-(4-aryl-1-piperaziny)alkyl]-1-aryl ketones as 5-HT(7) receptor ligands. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*(4), 646-9.
3. Leopoldo M.; Berardi F.; Colabufo N. A.; Contino M.; Lacivita E.; Perrone R.; Tortorella V. Studies on 1-arylpiperazine derivatives with affinity for rat 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*(2), 247-55.
4. <http://pdsp.med.unc.edu/indexR.html>
5. Griebel G.; Rodgers R. J.; Perrault G.; Sanger D. J. The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT(1A) receptor antagonists in three rat models of anxiety. *Neuropharmacology* **2000**, *39*(10), 1848-57.
6. Bojarski A. J.; Duszyńska B.; Kolaczowski M.; Kowalski P.; Kowalska T. The impact of spacer structure on 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptor affinity in the group of long-chain arylpiperazine ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*(23), 5863-6.
7. Paluchowska M. H.; Bojarski A. J.; Charakchieva-Minol S.; Wesółowska A. Active Conformation of Some Arylpiperazine Postsynaptic 5-HT_{1A} Receptor Antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*(4), 273-83.
8. Glennon R. A.; Naiman N. A.; Lyon R. A.; Titeler M. Arylpiperazine derivatives as high-affinity 5-HT_{1A} serotonin ligands. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*(10), 1968-71.
9. Bojarski A. J.; Paluchowska M. H.; Duszyńska B.; Klodzinska A.; Tatarczyńska E.; Chojnacka-Wojcik E. 1-Aryl-4-(4-succinimidobutyl)piperazines and their conformationally constrained analogues: synthesis, binding to serotonin (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇), alpha1-adrenergic, and dopaminergic D₂ receptors, and in vivo 5-HT_{1A} functional characteristics. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*(6), 2293-303.
10. <http://www.fda.gov/default.htm>
11. Hoyer D.; Hannon J. P.; Martin G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *71*(4), 533-54.
12. Hedlund P. B.; Huitron-Resendiz S.; Henriksen S. J.; Sutcliffe J. G. 5-HT₇ receptor inhibition and inactivation induce antidepressant like behavior and sleep pattern. *Biol. Psychiatry.* **2005**, *58*(10), 831-7.
13. Pedigo N. W.; Yamamura H. I.; Nelson D. L. Discrimination of multiple [³H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J. Neurochem.* **1981**, *36*(1), 220-6.
14. Middlemiss D. N.; Fozard J. R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur. J. Pharmacol.* **1983**, *90*(1), 151-3.
15. Arvidsson L. E.; Hacksell U.; Nilsson J. L.; Hjorth S.; Carlsson A.; Lindberg P.; Sanchez D.; Wikstrom H. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*(8), 921-3.

16. Leopoldo M. Serotonin(7) receptors (5-HT(7)Rs) and their ligands. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*(5), 629-61.
17. De Vry J. 5-HT1A receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl)*. **1995**, *121*(1), 1-26.
18. Gonzalez L. E.; File S. E.; Overstreet D. H. Selectively bred lines of rats differ in social interaction and hippocampal 5-HT1A receptor function: a link between anxiety and depression? *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, *59*(4), 787-92.
19. Menard J.; Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1999**, *23*(4), 591-613.
20. Lopez-Rodriguez M. L.; Ayala D.; Benhamu B.; Morcillo M. J.; Viso A. Arylpiperazine derivatives acting at 5-HT(1A) receptors. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*(4), 443-69.
21. Pucadyil T. J.; Kalipatnapu S.; Chattopadhyay A. The serotonin1A receptor: a representative member of the serotonin receptor family. *Cell Mol. Neurobiol.* **2005**, *25*(3-4), 553-80.
22. Lattmann E.; Fernandez I. M.; Dunn S.; Parveen B.; Lattmann P.; Billington D. C.; Bunprakob Y.; Sattayasai J. Novel 5-HT7 Ligands as Antidepressants: Automated Synthesis of *N*-Substituted-*N*-[1-Methyl-3-(4-Methylpiperidin-1-yl)propyl]-Arylsulfonamides. *Lett. Drug Design Disc.* **2006**, *3* 49-54.
23. Guscott M.; Bristow L. J.; Hadingham K.; Rosahl T. W.; Beer M. S.; Stanton J. A.; Bromidge F.; Owens A. P.; Huscroft I.; Myers J.; Rupniak N. M.; Patel S.; Whiting P. J.; Hutson P. H.; Fone K. C.; Biello S. M.; Kulagowski J. J.; McAllister G. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT7 receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology.* **2005**, *48*(4), 492-502.
24. Wesolowska A.; Nikiforuk A.; Stachowicz K.; Tatarczynska E. Effect of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB-269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology.* **2006**, *51*(3), 578-86.
25. Terron J. A.; Falcon-Neri A. Pharmacological evidence for the 5-HT7 receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*(3), 609-16.
26. De Vries P.; De Visser P. A.; Heiligers J. P.; Villalon C. M.; Saxena P. R. Changes in systemic and regional haemodynamics during 5-HT7 receptor-mediated depressor responses in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1999**, *359*(4), 331-8.
27. Perez-Garcia G. S.; Meneses A. Effects of the potential 5-HT7 receptor agonist AS 19 in an autoshaping learning task. *Behav. Brain Res.* **2005**, *163*(1), 136-40.
28. Meneses A. Effects of the 5-HT7 receptor antagonists SB-269970 and DR-4004 in autoshaping Pavlovian/instrumental learning task. *Behav. Brain Res.* **2004**, *155*(2), 275-82.
29. Rocha-Gonzalez H. I.; Meneses A.; Carlton S. M.; Granados-Soto V. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT7 receptors in the formalin test. *Pain.* **2005**, *117*(1-2), 182-92.
30. Dogrul A.; Seyrek M. Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT7, but not 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*(5), 498-505.
31. Krobert K. A.; Bach T.; Syversveen T.; Kvingedal A. M.; Levy F. O. The cloned human 5-HT7 receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2001**, *363*(6), 620-32.

32. Heidmann D. E.; Szot P.; Kohen R.; Hamblin M. W. Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology*. **1998**, 37(12), 1621-32.
33. Sharif N. A.; Senchyna M. Serotonin receptor subtype mRNA expression in human ocular tissues, determined by RT-PCR. *Mol. Vis.* **2006**, 12:1040-7. 1040-7.
34. Bourson A.; Kapps V.; Zwingelstein C.; Rudler A.; Boess F. G.; Sleight A. J. Correlation between 5-HT₇ receptor affinity and protection against sound-induced seizures in DBA/2J mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1997**, 356(6), 820-6.
35. Graf M.; Jakus R.; Kantor S.; Levay G.; Bagdy G. Selective 5-HT_{1A} and 5-HT₇ antagonists decrease epileptic activity in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Neurosci. Lett.* **2004**, 359(1-2), 45-8.
36. Bakker C.; Glennon J. C.; Hesselink M. B.; Thaete C.; McCreary A.; Van Scharrenburg G. J. M. 1-(2H-1-Benzopyran-2-one-8-yl)piperazine Derivatives for The Treatment of Movement Disorders. **2005**, US 2005215551.
37. Makino S.; Fukuchi N.; Asari S.; Hashimoto M.; Yano T.; Yamada Y.; Tokumasu M.; Shoji M.; Tanabe I.; Fujita S.; Matsumoto H. Novel Piperidine Derivative. **2007**, US20070021460.
38. Hedlund P. B.; Kelly L.; Mazur C.; Lovenberg T.; Sutcliffe J. G.; Bonaventure P. 8-OH-DPAT acts on both 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to induce hypothermia in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 487(1-3), 125-32.
39. Faure C.; Mnie-Filali O.; Scarna H.; Debonnel G.; Haddjeri N. Effects of the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 on rat hormonal and temperature responses to the 5-HT_{1A/7} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Neurosci. Lett.* **2006**, 404(1-2), 122-6.
40. Gargaglioni L. H.; Steiner A. A.; Branco L. G. Involvement of serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region on hypoxia-induced hypothermia. *Brain Res.* **2005**, 1044(1), 16-24.
41. Gargaglioni L. H.; Bicego K. C.; Nucci T. B.; Branco L. G. Serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region modulate the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol Neurobiol.* **2006**, 153(1), 1-13.
42. Tonini M.; Vicini R.; Cervio E.; De Ponti F.; De Giorgio R.; Barbara G.; Stanghellini V.; Dellabianca A.; Sternini C. 5-HT₇ receptors modulate peristalsis and accommodation in the guinea pig ileum. *Gastroenterology*. **2005**, 129(5), 1557-66.
43. Neal K. B.; Bornstein J. C. Serotonergic receptors in therapeutic approaches to gastrointestinal disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6(6), 547-52.
44. Kellett D. O.; Ramage A. G.; Jordan D. Central 5-HT₇ receptors are critical for reflex activation of cardiac vagal drive in anaesthetized rats. *J. Physiol.* **2005**, 563(Pt 1), 319-31.
45. Kellett D. O.; Stanford S. C.; Machado B. H.; Jordan D.; Ramage A. G. Effect of 5-HT depletion on cardiovascular vagal reflex sensitivity in awake and anesthetized rats. *Brain Res.* **2005**, 1054(1), 61-72.
46. Idzko M.; Panther E.; Stratz C.; Muller T.; Bayer H.; Zissel G.; Durk T.; Sorichter S.; Di Virgilio F.; Geissler M.; Fiebich B.; Herouy Y.; Elsner P.; Norgauer J.; Ferrari D. The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *J. Immunol.* **2004**, 172(10), 6011-9.

47. Mahe C.; Loetscher E.; Dev K. K.; Bobirnac I.; Otten U.; Schoeffter P. Serotonin 5-HT₇ receptors coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells. *Neuropharmacology*. **2005**, 49(1), 40-7.
48. Lieb K.; Biersack L.; Waschbisch A.; Orlikowski S.; Akundi R. S.; Candelario-Jalil E.; Hull M.; Fiebich B. L. Serotonin via 5-HT₇ receptors activates p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C epsilon resulting in interleukin-6 synthesis in human U373 MG astrocytoma cells. *J. Neurochem*. **2005**, 93(3), 549-59.
49. Durk T.; Panther E.; Muller T.; Sorichter S.; Ferrari D.; Pizzirani C.; Di Virgilio F.; Myrtek D.; Norgauer J.; Idzko M. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *Int. Immunol*. **2005**, 17(5), 599-606.
50. Siddiqui A.; bu-Amara M.; Aldairy C.; Hagan J. J.; Wilson C. 5-HT₇ receptor subtype as a mediator of the serotonergic regulation of luteinizing hormone release in the zona incerta. *Eur. J. Pharmacol*. **2004**, 491(1), 77-84.
51. Barnes N. M.; Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. **1999**, 38(8), 1083-152.
52. Nichols D. E.; Nichols C. D. Serotonin receptors. *Chem. Rev*. **2008**, 108(5), 1614-41.
53. Vanhoenacker P.; Haegeman G.; Leysen J. E. 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol. Sci*. **2000**, 21(2), 70-7.
54. Read K. E.; Sanger G. J.; Ramage A. G. Evidence for the involvement of central 5-HT₇ receptors in the micturition reflex in anaesthetized female rats. *Br. J. Pharmacol*. **2003**, 140(1), 53-60.
55. Ramage A. G. The role of central 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) receptors in the control of micturition. *Br. J. Pharmacol*. **2006**, 147 Suppl 2:S120-31. S120-S131.
56. D'Agostino G.; Condino A. M.; Gallinari P.; Franceschetti G. P.; Tonini M. Characterization of prejunctional serotonin receptors modulating [3H]acetylcholine release in the human detrusor. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **2006**, 316(1), 129-35.
57. Shen Y.; Monsma F. J., Jr.; Metcalf M. A.; Jose P. A.; Hamblin M. W.; Sibley D. R. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J. Biol. Chem*. **1993**, 268(24), 18200-4.
58. To Z. P.; Bonhaus D. W.; Eglen R. M.; Jakeman L. B. Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *Br. J. Pharmacol*. **1995**, 115(1), 107-16.
59. Lucchelli A.; M.G.; D'Agostino G.; Masoero E.; Tonini M. The interaction of antidepressant drugs with enteric 5-HT₇ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. **2000**, 362(3), 284-9.
60. Cannon J. G.; Jackson H.; Long J. P.; Leonard P.; Bhatnagar R. K. 5-HT_{1A}-receptor antagonism: N-alkyl derivatives of (R)-(-)-8,11-dimethoxynoraporphine. *J. Med. Chem*. **1989**, 32(8), 1959-62.
61. Cannon J. G.; Mohan P.; Bojarski J.; Long J. P.; Bhatnagar R. K.; Leonard P. A.; Flynn J. R.; Chatterjee T. K. (R)-(-)-10-methyl-11-hydroxyaporphine: a highly selective serotonergic agonist. *J. Med. Chem*. **1988**, 31(2), 313-8.

62. Hedberg M. H.; Linnanen T.; Jansen J. M.; Nordvall G.; Hjorth S.; Unelius L.; Johansson A. M. 11-substituted (R)-aporphines: synthesis, pharmacology, and modeling of D2A and 5-HT1A receptor interactions. *J. Med. Chem.* **1996**, 39(18), 3503-13.
63. Linnanen T.; Brisander M.; Unelius L.; Rosqvist S.; Nordvall G.; Hacksell U.; Johansson A. M. Atropisomeric derivatives of 2',6'-disubstituted (R)-11-phenylaporphine: selective serotonin 5-HT(7) receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, 44(9), 1337-40.
64. Lopez-Rodriguez M. L.; Porras E.; Morcillo M. J.; Benhamu B.; Soto L. J.; Lavandera J. L.; Ramos J. A.; Olivella M.; Campillo M.; Pardo L. Optimization of the pharmacophore model for 5-HT7R antagonism. Design and synthesis of new naphtholactam and naphthosultam derivatives. *J. Med. Chem.* **2003**, 46(26), 5638-50.
65. Vermeulen E. S.; van Smeden M.; Schmidt A. W.; Sprouse J. S.; Wikstrom H. V.; Grol C. J. Novel 5-HT7 receptor inverse agonists. Synthesis and molecular modeling of arylpiperazine- and 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-based arylsulfonamides. *J. Med. Chem.* **2004**, 47(22), 5451-66.
66. Kolaczowski M.; Nowak M.; Pawlowski M.; Bojarski A. J. Receptor-based pharmacophores for serotonin 5-HT7R antagonists-implications to selectivity. *J. Med. Chem.* **2006**, 49(23), 6732-41.
67. Linnanen T.; Brisander M.; Unelius L.; Sundholm G.; Hacksell U.; Johansson A. M. Derivatives of (R)-1,11-Methyleneaporphine: Synthesis, Structure, and Interactions with G-Protein Coupled Receptors. *J. Med. Chem.* **2000**, 43(7), 1339-49.
68. Linnanen T.; Brisander M.; Mohell N.; Johansson A. M. Serotonergic and dopaminergic activities of rigidified (R)-aporphine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11(3), 367-70.
69. Boess F. G.; Martin I. L. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology.* **1994**, 33(3-4), 275-317.
70. Eglen R. M.; Jasper J. R.; Chang D. J.; Martin G. R. The 5-HT7 receptor: orphan found. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, 18(4), 104-7.
71. Sanin A.; Brisander M.; Rosqvist S.; Mohell N.; Malmberg A.; Johansson A. M. 5-Aryl substituted (S)-2-(dimethylamino)tetralines. Novel serotonin 5-HT7 receptor ligands; *XVIIth Int. Symp. Medicinal Chemistry, Barcelona, 2002*.
72. Holmberg P.; Sohn D.; Leideborg R.; Caldirola P.; Zlatoidsky P.; Hanson S.; Mohell N.; Rosqvist S.; Nordvall G.; Johansson A. M.; Johansson R. Novel 2-aminotetralin and 3-aminochroman derivatives as selective serotonin 5-HT7 receptor agonists and antagonists. *J. Med. Chem.* **2004**, 47(16), 3927-30.
73. Vela Hernandez J. M.; Torrens-Jover A.; Buschmann H. H.; Romero-Alonso L. Use of 5-HT7 receptor agonist for the treatment of pain. **2008**, EP 1875899.
74. Holmberg P.; Tedenborg L.; Rosqvist S.; Johansson A. M. Novel 3-aminochromans as potential pharmacological tools for the serotonin 5-HT(7) receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15(3), 747-50.
75. Forbes I. T. Sulfonamide Derivatives as 5-HT7 Receptor Antagonists. **1997**, WO 9729097.
76. Forbes I. T.; Dabbs S.; Duckworth D. M.; Jennings A. J.; King F. D.; Lovell P. J.; Brown A. M.; Collin L.; Hagan J. J.; Middlemiss D. N.; Riley G. J.; Thomas D. R.; Upton N. (R)-3,N-dimethyl-N-[1-methyl-3-(4-methyl-piperidin-1-yl)propyl]benzenesulfonamide: the first selective 5-HT7 receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **1998**, 41(5), 655-7.

77. Machin P. Use of 5-HT₇ Receptor Antagonists for Treating Neuronal Degeneration Resulting from Ischemic Events. **2000**, WO 2000037082.
78. Forbes I. T.; King F. D.; Rahman S. K. Sulfonamide Derivatives and Their Use in The Treatment of CNS Disorders. **1997**, WO 9748681.
79. Forbes I. T.; Rahman S. K. Sulfonamide Derivatives as 5-HT₇ Receptor Antagonists. **1997**, WO 9749695.
80. Mahe C.; Loetscher E.; Feuerbach D.; Muller W.; Seiler M. P.; Schoeffter P. Differential inverse agonist efficacies of SB-258719, SB-258741 and SB-269970 at human recombinant serotonin 5-HT₇ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 495(2-3), 97-102.
81. Forbes I. T.; Douglas S.; Gribble A. D.; Ife R. J.; Lightfoot A. P.; Garner A. E.; Riley G. J.; Jeffrey P.; Stevens A. J.; Stean T. O.; Thomas D. R. SB-656104-A: a novel 5-HT₇ receptor antagonist with improved in vivo properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12(22), 3341-4.
82. Jover A. T.; Prio J. M.; Minguez S. Y.; Zueras A. D.; Alonso L. R.; Buschmann H. H.; Lopez M. G. 5-HT₇ Receptor Antagonists. **2007**, US7211585.
83. Jover A. T.; Prio J. M.; Minguez S. Y.; Lopez M. G.; Zueras A. D.; Alonso L. R.; Buschmann H. H. 5-HT₇ Receptor Antagonists. **2006**, US 20060040978.
84. Jover A. T.; Prio J. M.; Minguez S. Y.; Zueras A. D.; Alonso L. R.; Buschmann H. H. 5-HT₇ Receptor Antagonists. **2006**, US 20060142321.
85. Jover A. T.; Prio J. M.; Minguez S. Y.; Zueras A. D.; Alonso L. R.; Buschmann H. H. 5-HT₇ Receptor Antagonists. **2008**, US20080214603.
86. Bourrain S.; Hunt P. A.; Huscroft I. T.; Kulagowski J. J.; London C.; Naylor E. M.; Raubo P. A.; Seward E. M. Sulfone Derivatives as 5-HT₇ receptor ligands. **2006**, US 7101892.
87. Raubo P.; Beer M. S.; Hunt P. A.; Huscroft I. T.; London C.; Stanton J. A.; Kulagowski J. J. Aminoalkyl phenyl sulfones—a novel series of 5-HT₇ receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16(5), 1255-8.
88. Lattmann E.; Fernandez I. M. Sulfonamide derivatives as 5-HT₇ receptor antagonists. **2005**, WO 2005005387.
89. Curtis N. R.; Hunt P. A.; Kulagowski J. J. 5-HT₇ Receptor Agonists. **2003**, WO 2003048118.
90. Leopoldo M.; Berardi F.; Colabufo N. A.; Contino M.; Lacivita E.; Niso M.; Perrone R.; Tortorella V. Structure-affinity relationship study on N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-4-aryl-1-piperazinealkylamides, a new class of 5-hydroxytryptamine₇ receptor agents. *J. Med. Chem.* **2004**, 47(26), 6616-24.
91. Forbes I. T.; Cooper D. G.; Dodds E. K.; Douglas S. E.; Gribble A. D.; Ife R. J.; Lightfoot A. P.; Meeson M.; Campbell L. P.; Coleman T.; Riley G. J.; Thomas D. R. Identification of a novel series of selective 5-HT₇ receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13(6), 1055-8.
92. Koyama M.; Kikuchi C.; Ushiroda O.; Ando T.; Nagaso H.; Fuji K.; Okuno M.; Hiranuma T. Tetrahydrobenzindole Compounds. **1998**, WO 9800400.

93. Kikuchi C.; Nagaso H.; Hiranuma T.; Koyama M. Tetrahydrobenzindoles: selective antagonists of the 5-HT₇ receptor. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*(4), 533-5.
94. Kikuchi C.; Ando T.; Watanabe T.; Nagaso H.; Okuno M.; Hiranuma T.; Koyama M. 2a-[4-(Tetrahydropyridindol-2-yl)butyl]tetrahydrobenzindole derivatives: new selective antagonists of the 5-hydroxytryptamine₇ receptor. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*(11), 2197-206.
95. Kikuchi C.; Ando T.; Fuji K.; Okuno M.; Satoh E.; Shiiyama M.; Ushiroda O.; Koyama M.; Hiranuma T. Tetrahydrobenzindole Derivatives. **1999**, WO 9933804.
96. Koyama M.; Ushiroda O.; Kikuchi C.; Ando T.; Sato E.; Okuno M.; Hiranuma T. Optically Active Tetrahydrobenzindole. **1999**, WO 9954303.
97. Kikuchi C.; Koyama M.; Fuji K.; Okuno M.; Hiranuma T. Tetrahydrobenzindole Derivatives Capable of Binding To 5-HT₇ Receptor and Metabolically Stable. **2002**, WO 2002018367.
98. Kikuchi C.; Suzuki H.; Hiranuma T.; Koyama M. New tetrahydrobenzindoles as potent and selective 5-HT₇ antagonists with increased In vitro metabolic stability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*(1), 61-4.
99. Kikuchi C.; Hiranuma T.; Koyama M. Tetrahydrothienopyridylbutyl-tetrahydrobenzindoles: new selective ligands of the 5-HT₇ receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*(18), 2549-52.
100. Bromidge S. M.; Gribble A. D.; Lovell P. J.; Witherington J. Tetrahydrobenzindole Derivatives, Their Preparation and Their Use As 5-HT₇ Receptor Antagonists. **2001**, WO 2001029029.
101. Lopez-Rodriguez M. L.; Porras E.; Benhamu B.; Ramos J. A.; Morcillo M. J.; Lavandera J. L. First pharmacophoric hypothesis for 5-HT₇ antagonism. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*(10), 1097-100.
102. Volk B.; Barkoczy J.; Simig G.; Mezei T.; Kapillerne Dezsofi R.; Gacsalyi I.; Pallagi K.; Gigler G.; Levay G.; Moricz K.; Leveleki C.; Sziray N.; Szenasi G.; Egyed A.; Harsing L. G. Piperazine Derivatives of Alkyl Oxindoles. **2005**, WO 2005108363.
103. Volk B.; Barkoczy J.; Simig G.; Mezei T.; Kapillerne Dezsofi R.; Gacsalyi I.; Pallagi K.; Gigler G.; Levay G.; Moricz K.; Leveleki C.; Sziray N.; Szenasi G.; Egyed A.; Harsing L. G. Piperazine Derivatives of Alkyl Oxindoles. **2005**, WO 2005108364.
104. Volk B.; Barkoczy J.; Simig G.; Mezei T.; Kapillerne Dezsofi R.; Gacsalyi I.; Pallagi K.; Gigler G.; Levay G.; Moricz K.; Leveleki C.; Sziray N.; Szenasi G.; Egyed A.; Harsing L. G. Pyridine Derivatives of Alkyl Oxindoles as 5-HT₇ receptor active agents. **2005**, WO 2005108388.
105. Glennon R. A. 3-(4-(Tetrahydropyridin-1-yl)butyl)oxindoles as 5-HT₇ receptor ligands. *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16* 1171-4.
106. Bojarski A. J.; Paluchowska M. H.; Duszynska B.; Bugno R.; Klodzinska A.; Tatarczynska E.; Chojnacka-Wojcik E. Structure-intrinsic activity relationship studies in the group of 1-imido/amido substituted 4-(4-arylpiperazin-1-yl)cyclohexane derivatives; new, potent 5-HT_{1A} receptor agents with anxiolytic-like activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*(5), 1391-402.
107. Paluchowska M. H.; Bugno R.; Duszynska B.; Tatarczynska E.; Nikiforuk A.; Lenda T.; Chojnacka-Wojcik E. The influence of modifications in imide fragment structure on 5-HT₇(1A)

- and 5-HT(7) receptor affinity and in vivo pharmacological properties of some new 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazines. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*(22), 7116-25.
108. Lepailleur A.; Bureau R.; Paillet-Loilier M.; Fabis F.; Saettel N.; Lemaitre S.; Dauphin F.; Lesnard A.; Lancelot J. C.; Rault S. Molecular modeling studies focused on 5-HT7 versus 5-HT1A selectivity. Discovery of novel phenylpyrrole derivatives with high affinity for 5-HT7 receptors. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*(4), 1075-81.
109. Adachi M.; Sasatani T.; Chomei N.; Fukui Y.; Yasui M. Novel Pyridine Compounds. **1999**, WO 9931062.
110. Welch W. M.; Parkih V. 4-(2-Pirydy)l)piperazines Having 5-HT7 Receptor Agonist Activity. **2006**, US 7009051.
111. Poss M. A.; Purandare A. V.; Mattson R. J.; Sun L. 5-HT7 Receptor Antagonists. **2001**, WO 2001085701.
112. Mattson R. J.; Denhart D. J.; Catt J. D.; Dee M. F.; Deskus J. A.; Ditta J. L.; Epperson J.; Dalton K. H.; Gao A.; Poss M. A.; Purandare A.; Tortolani D.; Zhao Y.; Yang H.; Yeola S.; Palmer J.; Torrente J.; Stark A.; Johnson G. Aminotriazine 5-HT7 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*(16), 4245-8.
113. Denhart D. J.; Purandare A. V.; Catt J. D.; King H. D.; Gao A.; Deskus J. A.; Poss M. A.; Stark A. D.; Torrente J. R.; Johnson G.; Mattson R. J. Diaminopyrimidine and diaminopyridine 5-HT7 ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*(16), 4249-52.
114. Hong Y.; Kuki A.; Tompkins E. V.; Peng Z.; Luthin D. R. Amidino-Urea Serotonin Receptor Ligands And Compositions, Their Pharmaceutical Uses, And Methods For Their Synthesis. **2002**, WO 2002036554.
115. Bard J. A.; Zgombick J.; Adham N.; Vaysse P.; Branchek T. A.; Weinschank R. L. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*(31), 23422-6.
116. Van Steen B. J.; Hartog J.; Van Der Heyden J. A.; Schipper J. 1-(2H-1-Benzopyran-2-one-8yl)piperazine Derivatives. **1995**, EP 650964.
117. Lepailleur A.; Bureau R.; Lemaitre S.; Dauphin F.; Lancelot J. C.; Contesse V.; Lenglet S.; Delarue C.; Vaudry H.; Rault S. Molecular design based on 3D pharmacophores. Applications to 5-HT7 receptors. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*(3), 1148-52.
118. Carruthers N. I.; Chai W.; Deng X.; Dvorak C. A.; Kwok A. K.; Liang J. T.; Mani N.; Rudolph D. A.; Wong V. D. Fused Heterocyclic Compounds. **2005**, US 20050119295.
119. Thomson C. G.; Beer M. S.; Curtis N. R.; Diggie H. J.; Handford E.; Kulagowski J. J. Thiazoles and thiopyridines: novel series of high affinity h5HT(7) ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*(3), 677-80.
120. Rui Y.; Kuki A.; Hong Y.; Peng Z.; Luthin D. R. Aminoalkylpyrrolidine Serotonin Receptor Ligands And Compositions, Their Pharmaceutical Uses, And Methods For Their Synthesis. **2002**, WO 2002036560.
121. Isaac M. B.; Xin T.; O'Brien A.; St Martin D.; Naismith A.; MacLean N.; Wilson J.; Demchyshyn L.; Tehim A.; Slassi A. 1-(Bicyclopiperazinyl)ethylindoles and 1-(homopiperazinyl)ethyl-indoles as highly selective and potent 5-HT(7) receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*(17), 2451-4.

122. Parikh V.; Welch W. M.; Schmidt A. W. Discovery of a series of (4,5-dihydroimidazol-2-yl)-biphenylamine 5-HT₇ agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 20;13(2), 269-71.
123. Paillet-Loilier M.; Fabis F.; Lepailleur A.; Bureau R.; Butt-Gueulle S.; Dauphin F.; Lesnard A.; Delarue C.; Vaudry H.; Rault S. Novel aminoethylbiphenyls as 5-HT₇ receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17(11), 3018-22.
124. Wlodecki B.; Bright G. M. Quinoline Derivatives. **2004**, US6894062.
125. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#p7>
126. Gund, P. Evolution of the Pharmacophore Concept in Pharmaceutical Research. w *Pharmacophore perception, development, and use in drug design. Vol. 2 of IUL Biotechnology Series.*, 1 ed.; Internat'l University Line: La Jolla, **1999**; pp. 3-11.
127. Wilcox R. E.; Ragan J. E.; Pearlman R. S.; Brusniak M. Y.; Eglen R. M.; Bonhaus D. W.; Tenner T. E., Jr.; Miller J. D. High-affinity interactions of ligands at recombinant guinea pig 5HT₇ receptors. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2001**, 15(10), 883-909.
128. Vermeulen E. S.; Schmidt A. W.; Sprouse J. S.; Wikstrom H. V.; Grol C. J. Characterization of the 5-HT(7) receptor. Determination of the pharmacophore for 5-HT(7) receptor agonism and CoMFA-based modeling of the agonist binding site. *J. Med. Chem.* **2003**, 46(25), 5365-74.
129. Snyder, J. P.; Rao, S. N.; Koehler, K. F.; Vedani, A.; Pellicciari, R. APOLLO Pharmacophores and the pseudoreceptor concept. In *Trends in QSAR and Molecular Modeling, ESCOM: Leiden: 2009*; pp. 44-51.
130. Lovell P. J.; Bromidge S. M.; Dabbs S.; Duckworth D. M.; Forbes I. T.; Jennings A. J.; King F. D.; Middlemiss D. N.; Rahman S. K.; Saunders D. V.; Collin L. L.; Hagan J. J.; Riley G. J.; Thomas D. R. A novel, potent, and selective 5-HT(7) antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl) phenol (SB-269970). *J. Med. Chem.* **2000**, 43(3), 342-5.
131. Krobert K. A.; Levy F. O. The human 5-HT₇ serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, 135(6), 1563-71.
132. Paluchowska M. H.; Mokrosz M. J.; Bojarski A.; Wesolowska A.; Borycz J.; Charakchieva-Minol S.; Chojnacka-Wojcik E. On the bioactive conformation of NAN-190 (1) and MP-3022 (2), 5-HT(1A) receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, 42(24), 4952-60.
133. Liu L. T.; Hong P.; Huang H.; Chen S.; Wang C. J.; Wen Y. Asymmetric syntheses of *trans*-3,4-disubstituted 2-piperidinones and piperidines. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12 419-26.
134. Brewster J. H.; Fusco A. M.; Carosino L. E.; Corman B. G. Reduction of Phthalic Acid and Its Derivatives by Zinc. *J. Org. Chem.* **1962**, 28 498-501.
135. Mokrosz J. L.; Paluchowska M. H.; Chojnacka-Wójcik E.; Filip M.; Charakchieva-Minol S.; Dereń-Wesołek A.; Mokrosz M. J. Structure-Activity Relationship Studies of CNS Agents. 13. 4-[3-Benzotriazol-1-yl)propyl]-1-(2-methoxyphenyl)piperazine, a New Putative 5-HT_{1A} Receptor Antagonist, and Its Analogs. *J. Med. Chem.* **1994**, 37 2754-60.
136. Paluchowska M. H.; Bugno R.; Charakchieva-Minol S.; Bojarski A. J.; Tatarczynska E.; Chojnacka-Wojcik E. Conformational restriction in novel NAN-190 and MP-3022 analogs and their 5-HT(1A) receptor activity. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2006**, 339(9), 498-506.

137. Katritzky A. R.; Rachwal B.; Hughes C. V.; Wang Z. Q. The Reactions of Benzotriazole with Unsaturated Aldehydes and Ketones in the Presence or Absence of Amines. *Pol. J. Chem.* **1992**, *66* 1633-52.
138. Paluchowska M. H.; Bugno R.; Nędza K.; Boksa J. Structural modifications of some arylpiperazine ligands towards improved selectivity for 5-HT₇ receptors; *The Fifth Multidisciplinary Conference on Drug Research*, Darlowko, **2006**, *Book of Abstract*, s. 85.
139. Friary R.; Sunday B. R. A Direct Preparation of 3-Hydroxy-1,2-benzisoxazoles. *J. Heterocyclic Chem.* **1979**, *16* 1277-8.
140. Yevich J. P.; New J. S.; Smith D. W.; Lobeck W. G.; Catt J. D.; Minielli J. L.; Eison M. S.; Taylor D. P.; Riblet L. A.; Temple D. L., Jr. Synthesis and biological evaluation of 1-(1,2-benzisothiazol-3-yl)- and (1,2-benzisoxazol-3-yl)piperazine derivatives as potential antipsychotic agents. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*(3), 359-69.
141. Cooke M. P.; Houpis I. N. Metal-halogen exchange-initiated cyclization of iodo carbonyl compounds. *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*(41), 4987-90.
142. Katzung, B. G. Basic & Clinical Pharmacology, *McGraw-Hill Professional*: **1995**; pp. 123.
143. <http://accelrys.com/products/discovery-studio>
144. Związki magnezoorganiczne, w *Preparatyka i elementy syntezy organicznej*, I ed.; PWN: Warszawa, **1983**; pp. 395-410.
145. <http://www.chemsw.com/13071.htm>
146. Nowak M.; Kolaczowski M.; Pawlowski M.; Bojarski A. J. Homology Modeling of the Serotonin 5-HT_{1A} Receptor Using Automated Docking of Bioactive Compounds with Defined Geometry. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*(1), 205-14.
147. <http://www.biosolveit.de/FlexX/>
148. http://www.acdlabs.com/products/chem_dsn_lab/chemsketch/
149. Bojarski A. J.; Cegla M. T.; Charakchieva-Minol S.; Mokrosz M. J.; Mackowiak M.; Misztal S.; Mokrosz J. L. Structure-activity relationship studies of CNS agents. Part 9: 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptor affinity of some 2- and 3-substituted 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carbolines. *Pharmazie*. **1993**, *48*(4), 289-94.
150. Duszynska B.; Bojarski A. J.; Boksa J.; Lenda T.; Kamińska D.; Cybulski M.; Kaczmarek Ł. S. Searching for lead molecules as potential new CNS agents in the serotonin 5-HT screening assay; *The Sixth Multidisciplinary Conference on Drug Research*, Krasiczyn, **2008**, *Book of Abstract*, s. 23-24.
151. Cheng Y.; Prusoff W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*(23), 3099-108.



Instytut Farmakologii PAN
Kraków 2009