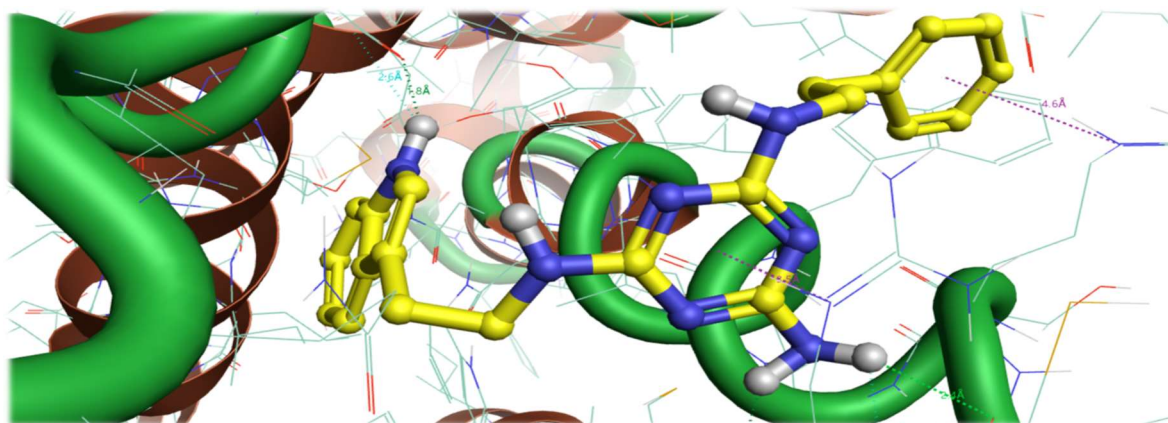




ROZPRAWA DOKTORSKA

**POSZUKIWANIE NOWYCH LIGANDÓW RECEPTORÓW 5-HT_{1A} / 5-HT₇
DZIAŁAJĄCYCH NA OŚRODKOWY UKŁAD NERWOWY Z GRUPY
DŁUGOŁAŃCUCHOWYCH ARYLOPIPERAZYN I AMINOTRIAZYN**



DAMIAN KUŁAGA

KRAKÓW 2023



Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

Katedra Chemii i Technologii Organicznej

mgr inż. Damian Kułaga

POSZUKIWANIE NOWYCH LIGANDÓW RECEPTORÓW 5-HT_{1A} / 5-HT₇

DZIAŁAJĄCYCH NA OŚRODKOWY UKŁAD NERWOWY Z GRUPY

DŁUGOŁAŃCUCHOWYCH ARYLOPIPERAZYN I AMINOTRIAZYN

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. inż. Radomir Jasiński, prof. PK

Promotor pomocniczy: dr inż. Jolanta Jaśkowska

Kraków 2023

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania następującym osobom, które były zaangażowane w powstanie niniejszej pracy doktorskiej:

Katedra Chemii i Technologii Organicznej, Politechnika Krakowska:

Panu dr hab. inż. Radomirowi Jasińskiemu, prof. PK za opiekę merytoryczną w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej

Pani dr Jolancie Jaśkowskiej za zaproponowanie tematyki badawczej, poświęcony czas, cenne rady oraz opiekę merytoryczną i organizacyjną na każdym etapie prowadzenia badań

Panu dr Pawłowi Śliwie za cenne uwagi oraz wprowadzenie w świat modelowania molekularnego

Celemu zespołowi Chemii i Technologii Leków za pomoc przy syntezie chemicznej oraz miłą atmosferę pracy

Zakład Chemii Leków, IF-PAN Kraków:

Panu prof. Andrzejowi J. Bojarskiemu za cenne uwagi oraz konsultację merytoryczną w obszarze chemii medycznej

Panu dr Grzegorzowi Satale za przeprowadzenie badań radioizotopowych dla wszystkich związków objętych niniejszą pracą a dla wybranych związków badań biofunkcjonalnych

Panu dr hab. Rafałowi Kurczabowi za cenne uwagi oraz opiekę merytoryczną podczas stażu naukowego w IF-PAN Kraków

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, CM-UJ:

Panu dr hab. Gniewomirowi Lataczowi za przeprowadzenie badań ADME-Tox in vitro

Katedra i Zakład Chemii Medycznej, UMLub:

Pani dr Annie Boguszewskiej – Czubarze za przeprowadzenie badań toksykologicznych in vitro/in vivo

Składam również serdeczne podziękowania jednostkom finansującym badania w tym **Narodowemu Centrum Badań i Rozwoju** oraz **Akademickiemu Centrum Komputerowemu „CYFRONET”**.

Streszczenie

Odkrycie receptorów serotoninowych w tym receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT₇ oraz poznanie ich funkcji przyczyniło się do opracowania wielu leków działających na ośrodkowy układ nerwowy stosowanych w leczeniu depresji, schizofrenii lub choroby afektywnej dwubiegunowej. W ciągu ostatnich lat, naukowcom udało się zidentyfikować dodatkowo nowe zastosowanie receptora 5-HT₇ w leczeniu nowotworów np. potrójnie negatywnego raka piersi lub też nie-drobnokomórkowego raka płuc. Mając na uwadze strukturalne podobieństwo miejsca wiążącego obu tych receptorów, bardzo często obserwuje się dualne działanie ligandów wykazujących aktywność do wspomnianych białek. Zaprojektowanie związków wykazujących pojedyncze działanie na receptor 5-HT₇ stanowi otwarty problem i jednocześnie wyzwanie w dzisiejszej chemii medycznej.

Mając powyższe na uwadze, głównym założeniem w niniejszej rozprawie doktorskiej było przeprowadzenie strukturalnych modyfikacji ligandów z grupy długołańcuchowych pochodnych arylopipezyn i aminotriazyn pozwalających na zredukowanie powinowactwa do receptora 5-HT_{1A}, celem otrzymania biblioteki związków o podwyższonej aktywności tylko do receptora 5-HT₇. W pracy eksperymentalnej położono również nacisk na opracowanie wydajnej, ekologicznej i ekonomicznej metody syntezy pozwalającej w krótkim czasie na otrzymanie zaprojektowanych związków.

Badania rozpoczęto od zaproponowania metody syntezy ipsapironu jako selektywnego, częściowego agonisty receptora 5-HT_{1A}. Ustalając odpowiednie warunki reakcji obejmujące wybór właściwej zasady, katalizatora przeniesienia międzyfazowego oraz czynnika przenoszącego energię mikrofalową, opracowano metodę, która następnie została zaadaptowana do otrzymania bibliotek kilku serii związków. Projektując pierwszą serię związków, otrzymano pochodne ipsapironu o wysokiej aktywności głównie do receptora 5-HT_{1A} oraz D₂. Związki drugiej serii, stanowiące pochodne długołańcuchowych arylopipezyn z terminalnym motywem aminotriazyny, podobnie jak poprzednie również wykazywały powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}/D₂. Rozbudowa ligandów serii drugiej o dodatkowy fragment tryptaminy (**seria 3**) skutkowało znaczącym wzrostem powinowactwa do receptora 5-HT₇ oraz wciąż utrzymującą się aktywnością 5-HT_{1A}/D₂. Skrócenie łącznika alkilowego z czterech atomów węgla do dwóch spowodowało zauważalne zmniejszenie powinowactwa 5-HT_{1A}/D₂, co ciekawe, całkowite wyeliminowanie łącznika (**seria 4**) skutkowało utratą aktywności do wszystkich badanych receptorów w tym 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇.

Kolejne przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że otwarcie pierścienia piperazyny (**seria 5**) przywraca aktywność badanych związków tylko do receptora 5-HT₇. Przeprowadzone badania chemiczno-farmakologiczne wsparte technikami modelowania molekularnego oraz 3D-QSAR umożliwiły zidentyfikowanie kluczowych fragmentów strukturalnych warunkujących selektywność i aktywność do receptora 5-HT₇. Dla wybranych związków zostały przeprowadzone testy wyznaczające funkcję wewnętrzną receptora 5-HT_{1A} lub 5-HT₇. Obiecujące związki przebadano pod kątem wczesnych parametrów ADME-Tox *in vitro* oraz *in vivo*.

Przeprowadzone badania ujawniły, że mimo podobieństwa miejsca wiążącego obu receptorów, możliwym jest zaprojektowanie selektywnych i aktywnych związków wykazujących powinowactwo do receptora 5-HT₇. Związki te można otrzymać na drodze ekologicznej i ekonomicznej reakcji bezrozpuszczalnikowej, wspieranej polem promieniowania mikrofalowego. Przeprowadzone multidyscyplinarne badania zostały opisane w cyklu sześciu publikacji o zasięgu międzynarodowym a otrzymane wyniki, stanowią punkt wyjścia do opracowania nowych antagonistów receptora 5-HT₇ oraz ich oceny na modelach komórkowych *in vitro* oraz zwierzęcych *in vivo*.

Abstract

The discovery of serotonin receptors including the 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors and the understanding of their functions have contributed to the development of many drugs that act on the central nervous system for the treatment of depression, schizophrenia or bipolar affective disorder. In recent years, scientists have additionally succeeded in identifying new uses for the 5-HT₇ receptor in the treatment of cancer, for example: triple-negative breast cancer or non-small cell lung cancer. Due to the structural similarity of the binding site of these two receptors, dual action is observed. Designing compounds that exhibit a single action on the 5-HT₇ receptor is a challenge and still open problem in current medicinal chemistry.

With this in mind, the main goal in this dissertation was to carry out structural modifications that help to reduce the affinity for the 5-HT_{1A} receptor in order to obtain a library of compounds with enhanced activity only to the 5-HT₇ receptor. Research also emphasized the development of an efficient, environmentally friendly and economical synthesis method allowing the designed compounds to be obtained in a short time.

The research began with the development of a method for the synthesis of ipsapirone as a selective partial agonist of the 5-HT_{1A} receptor. Determining the appropriate synthesis conditions (including the selection of the best base, phase transfer catalyst and microwave energy transfer agent), a method was developed, which was then used to obtain a library of several series of compounds. By designing the first series of compounds, ipsapirone derivatives with high activity mainly to the 5-HT_{1A} and D₂ receptor were obtained. The compounds of the second series, which are aminotriazine derivatives like the previous ones, also showed affinity for the 5-HT_{1A}/D₂ receptor. Spatial expansion of the ligands of the second series by an additional tryptamine fragment (series 3) resulted in a significant increase in affinity for the 5-HT₇ receptor and still retained 5-HT_{1A}/D₂ activity. Shortening the carbon linker from four carbon atoms to two resulted in a noticeable decrease in 5-HT_{1A}/D₂ affinity, but unfortunately, complete elimination of the carbon linker (series 4) resulted in a loss of activity to all receptors tested. Only the opening of the piperazine ring (series 5) restored the activity of the tested compounds to the 5-HT₇ receptor. Chemical-pharmacological studies supported by molecular modeling and 3D-QSAR techniques enabled the identification of structural fragments determining selectivity and activity to the 5-HT₇ receptor. Assays determining the intrinsic function of the 5-HT_{1A} or 5-HT₇ receptor were

performed for selected compounds. Promising compounds were tested for their early ADME-Tox parameters *in vitro* and *in vivo*.

The studies revealed that despite the similarity of the binding site of the two receptors, it is possible to design selective and active compounds with affinity for the 5-HT₇ receptor. These compounds can be obtained by an eco-friendly and economical solvent-free reaction supported by microwave irradiation. The multidisciplinary research conducted has been described in a series of six publications. These results, also provide a starting point for the development of new 5-HT₇ receptor antagonists and their evaluation on *in vitro* cellular and *in vivo* animal models.

Wykaz skrótów

Aliquat 336 – mieszanina chlorku trioktylometyloamoniowego i tridecyloamoniowego

TCT – chlorek cyjanurowy

DMF – *N,N*-dimetyloformamid

CH₃CN – acetonitryl

Et₃N – trietyloamina

API – aktywna substancja farmaceutyczna (*ang. active pharmaceutical ingredient*)

PTC – katalizator przeniesienia międzyfazowego (*ang. phase-transfer catalyst*)

GPCR – receptor sprzężony z białkiem G (*ang. G Protein-Coupled Receptor*)

cAMP – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan

LCAP – długołańcuchowe arylopiiperazyny (*ang. long chain arylpiperazines*)

REM – faza snu związana z szybkim ruchem gałek ocznych (*ang. rapid eye movement*)

SRI – inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny (*ang. serotonin reuptake inhibitor*)

SERT – transporter serotoninowy (*ang. serotonin transporter*)

FST – test szybkiego pływania (*ang. fast swim test*)

CADD – komputerowe wspomaganie projektowania leków (*ang. computer-aided drug design*)

SBDD – projektowanie w oparciu o znaną strukturę białka (*ang. structure-based drug design*)

LBDD – projektowanie w oparciu o znaną strukturę liganda (*ang. ligand-based drug design*)

GABA – kwas γ -aminomasłowy (*ang. γ -aminobutyric acid*)

ADME-Tox – skrót opisujący losy leku w organizmie: A – wchłanianie (*ang. adsorption*), D – dystrybucja (*ang. distribution*), M – metabolizm (*ang. metabolism*), E – wydalanie (*ang. excretion*), Tox – toksyczność (*ang. toxicity*)

FDA – amerykańska agencja żywności i leków (*ang. food and drug administration*)

EWG – podstawniki elektorno-akceptorowe (*ang. electron withdrawingl group*)

EDG – podstawniki elektrono-donorowe (*ang. electron donating group*)

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

HPLC/MS – wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrem mas
(*ang. high performance liquid chromatography with mass spectometry*)

^1H NMR – protonowa spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang. ^1H nuclear magnetic resonance*)

^{13}C NMR – węglowa spektroskopia magnetycznego rezonansu magnetycznego (*ang. ^{13}C nuclear magnetic resonance*)

8-OH-DPAT – 8-hydroksy-2-(di-*N*-propylamino)tetralina

LSD - dietyloamid kwasu D-lizergowego

5-CT – 5-karboksamido tryptamina

TMh – transbłonowa heliksa (*ang. transmembrane helix*)

CYP – oznaczenie poszczególnych izoform (a także kodujących genów) cytochromu P450

MLM – mysie mikrosomy wątrobowe (*ang. mouse liver microsomes*)

oun – ośrodkowy układ nerwowy

SAR – analiza zależności struktura-aktywność (*ang. structure-activity relationship*)

MW – promieniowanie mikrofalowe

Oznaczenia aminokwasów

F – fenyloalanina (Phe)

W – tryptofan (Trp)

N – asparagina (amid kwasu asparaginowego) (Asn)

Q – glutamina (Gln)

I – izoleucyna (Ile)

D – kwas asparaginowy (Asp)

R – arginina (Arg)

E – kwas glutaminowy (Glu)

L – leucyna (Leu)

S – seryna (Ser)

Spis treści

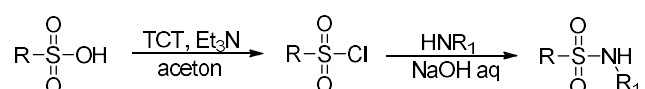
1.	WPROWADZENIE	12
1.1.	<i>Zastosowanie syntezy mikrofalowej w chemii organicznej, medycznej oraz inżynierii chemicznej</i> 12	
1.2.	<i>Receptory serotoninowe jako punkty uchwytu leków</i>	17
1.2.1.	<i>Receptor 5-HT_{1A} - funkcja i znaczenie terapeutyczne</i>	17
1.2.2.	<i>Receptor 5-HT_{1A} – przegląd wybranych ligandów</i>	18
1.2.3.	<i>Receptor 5-HT₇ - funkcja i znaczenie terapeutyczne</i>	26
1.2.4.	<i>Receptor 5-HT₇ – przegląd wybranych ligandów</i>	26
1.3.	<i>Projektowanie związków w oparciu o: strukturę receptora oraz strukturę ligandów</i>	32
2.	CEL I ZAKRES PRACY	34
3.	METODOLOGIA BADAŃ	37
3.1.	<i>Synteza Ipsapironu</i>	37
3.2.	<i>Projektowanie i synteza długołańcuchowych arylopipezyn (Seria 1)</i>	38
3.3.	<i>Projektowanie i synteza hybrydowych arylopipezyn i aminotriazyn (Seria 2)</i>	39
3.4.	<i>Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn (Seria 3)</i>	40
3.5.	<i>Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn (Seria 4)</i>	42
3.6.	<i>Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn (Seria 5)</i>	43
3.6.1.	<i>Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn – Seria 5a</i>	43
3.6.2.	<i>Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn – Seria 5b</i>	45
3.6.3.	<i>Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn – Seria 5c</i>	47
3.7.	<i>Testy radioreceptorowe</i>	48
3.8.	<i>Testy funkcjonalne</i>	48
3.9.	<i>Badania ADME-Tox⁴</i>	49
4.	OPIS UZYSKANÓW WYNIKÓW	51
4.1.	<i>Opracowana metoda syntezy Ipsapironu (publikacja D01)</i>	52
4.2.	<i>Charakterystyka związków w serii 1 (publikacja nr D02 i D03)</i>	54
4.3.	<i>Charakterystyka związków w serii 2 (publikacja D04)</i>	58
4.4.	<i>Charakterystyka związków w serii 3 (publikacja D04)</i>	60
4.5.	<i>Charakterystyka związków w serii 4 (publikacja D04)</i>	63
4.6.	<i>Charakterystyka związków w serii 5a (publikacja nr D04 i D05)</i>	63
4.7.	<i>Charakterystyka związków w serii 5b (publikacja D05)</i>	71
4.8.	<i>Charakterystyka związków w serii 5c (publikacja D06)</i>	72
5.	PODSUMOWANIE	75
6.	DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTA	79
7.	BIBLIOGRAFIA	86
	Pełna treść cyklu publikacji objętych pracą doktorską (D01 – D06)	100

1. WPROWADZENIE

1.1. Zastosowanie syntezy mikrofalowej w chemii organicznej, medycznej oraz inżynierii chemicznej

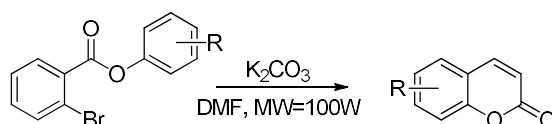
Historia syntezy wspieranej promieniowaniem mikrofalowym (*ang. Microwave-Assisted Organic Synthesis, MAOS*) rozpoczęła się w 1986 roku kiedy to dzięki użyciu domowej kuchenki mikrofalowej udało się otrzymać zaskakująco szybko (wraz z wysoką wydajnością) produkty reakcji Dielsa-Aldera bądź kondensacji Claisena.¹ Od tamtej pory synteza mikrofalowa coraz bardziej upowszechniła się w chemii organicznej/medycznej, a w szczególności znalazła zastosowanie do syntezy peptydów², reakcji sprzęgania krzyżowego³ oraz do syntezy szeroko pojętych związków heterocyklicznych⁴ zawierających w swojej strukturze np. azot.⁵ Niewątpliwą zaletą prowadzenia syntez z udziałem promieniowania mikrofalowego jest m.in. znaczne skrócenie czasu syntezy, zwiększenie wydajności produktu, możliwość zredukowania lub całkowitego wyeliminowania toksycznych rozpuszczalników i reagentów, zwiększenie selektywności procesu, a także poprawa czystości uzyskanych związków w porównaniu do klasycznego ogrzewania. Wspomniane zalety pozwalają wpisać syntezy w obecności promieniowania mikrofalowego w kanony zielonej chemii (*ang. green chemistry*).⁶ Efektywny przebieg reakcji wspomaganych promieniowaniem mikrofalowym tłumaczony jest głównie poprzez wydajny transfer ciepła generowany przez tzw. ogrzewanie dielektryczne (*ang. dielectric heating*). W trakcie działania promieniowania mikrofalowego, polarne składniki mieszaniny reakcyjnej (dipole lub jony) orientują się zgodnie z kierunkiem i zwrotem promieniowania elektromagnetycznego powodując rotację cząsteczek. Rotujące cząsteczki ulegają licznym zderzeniom oraz tarcu co powoduje zamianę ich energii kinetycznej na ciepło. W konsekwencji mieszanina reakcyjna ulega szybkiemu ogrzaniu w całej swojej objętości, a nie punktowo jak ma to miejsce w ogrzewaniu konwencjonalnym.⁷⁻⁹ Opisany efekt termiczny uzupełniany jest przez niektórych autorów poprzez tzw. efekt elektromagnetyczny (lub efekt nietermiczny) związany z formowaniem się tzw. *hot spotów* w kontakcie promieniowania mikrofalowego z materiałą, wzrostem transportu reagentów w mieszaninie reakcyjnej w szczególności prowadzonej w warunkach bezrozpuszczalnikowych, zmianą selektywności reakcji na skutek wzrostu szybkości ogrzewania mieszaniny reakcyjnej, a także wzrostem momentu dipolowego reagujących cząsteczek w stanie przejściowym w stosunku do stanu podstawowego.¹⁰

Przykładem zastosowania syntezy w polu promieniowania mikrofalowego może być sposób otrzymywania sulfonamidów opisany przez De Luca *i współ.*¹¹ Wychodząc z kwasu sulfonowego autorzy poddali go chlorowaniu za pomocą chlorku cyjanurowego z utworzeniem chlorku sulfonylowego a następnie kondensacji z odpowiednią aminą pierwszo- lub drugorzędową (**Schemat 1**). Dzięki zastosowaniu reakcji w polu promieniowania mikrofalowego (P = 50 W) udało się zredukować czas syntezy z 20 godzin do 20 minut dla etapu tworzenia chlorku sulfonylowego oraz z 5 godzin do 10 minut dla etapu syntezy sulfonamidu.



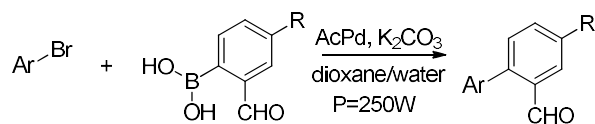
Schemat 1. Synteza sulfonamidów wg. De Luca *i współ.*¹¹

Dao *i współ.*¹² badali możliwość zastosowania promieniowania mikrofalowego w syntezie pochodnych kumaryn w reakcji cyklizacji pochodnych 2-bromobenzoesu fenylu (**Schemat 2**). Stosując bardzo łagodne warunki reakcji tj. węglan potasu jako zasadę, DMF jako rozpuszczalnik oraz moc mikrofal P = 100 W, udało się otrzymać serię pochodnych kumaryn z wydajnością nawet do 72 %.



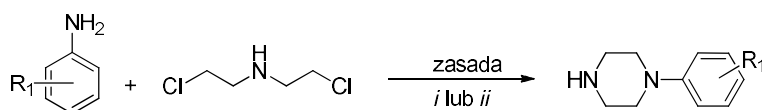
Schemat 2. Przykład reakcji cyklizacji wg. Dao *i współ.*¹²

Kolejny przykład reakcji gdzie możliwe jest zastosowanie promieniowania mikrofalowego to reakcje krzyżowe służące do tworzenia nowego wiązania C-C, które są niezwykle użyteczne w chemii medycznej.¹³ W przypadku reakcji Suzuki, Sharma *i współ.*¹⁴ opracowali wydajną metodę syntezy policyklicznych aromatycznych węglowodorów gdzie w warunkach promieniowania mikrofalowego, skrócono czas syntezy z 12 – 24 godzin do 20 minut z zachowaniem wysokich wydajności reakcji na poziomie powyżej 76 % (**Schemat 3**).



Schemat 3. Przykład reakcji Suzuki wg. Sharma *i* współl.¹⁴

Synteza arylopiperazyn – użytecznych związków w chemii organicznej^{15,16}, to jeszcze jeden przykład możliwości zastosowania promieniowania mikrofalowego. Klasyczna metoda syntezy polega na kondensacji odpowiednio podstawionych anilin z chlorowodorkiem bis(2-chloroetylo)aminy w środowisku zasadowym. Umiarkowane wydajności otrzymywano w przypadku prowadzenia reakcji w eterze bis(2-metoksyetylowym) lub alkoholu, natomiast dobre wydajności uzyskiwano w przypadku użycia chlorobenzenu jako rozpuszczalnika. Alternatywnie możliwym jest prowadzenie reakcji w obecności promieniowania mikrofalowego (P = 700 W) w ciągu 1 minuty. Zamiast stosując klasyczne rozpuszczalniki, możliwe jest także zastąpienie klasycznych rozpuszczalników cieczami jonowymi. W takich warunkach otrzymywano końcowe produkty z wydajnością nawet 92 % (**Schemat 4**).¹⁷



Schemat 4. Ścieżka syntetyczna otrzymywania 1-arylopiperazyn. R₁ – H, 3-Cl, 4-Cl, 2-CN, 3-CF₃, 4-CH₃, 4-COCH₃; *i* – rozpuszczalnik np. alkohol; *ii* – rozpuszczalnik lub ciecz jonowa, MW, P = 700 W, 1 min.

Przedstawione powyżej kilka przykładów zastosowania syntezy w warunkach mikrofalowych stanowi jedynie niewielki ułamek reakcji jaki jest spotykany w chemii organicznej. We wszystkich przytoczonych przykładach mimo, że udało się skrócić czas syntezy to wciąż stosuje się znaczne ilości rozpuszczalników. Możliwe jest znaczne zredukowanie ich ilości lub całkowite wyeliminowanie stosując wariant reakcji bezroztworowych wspieranych polem promieniowania mikrofalowego. Takie podejście jest o wiele bardziej przyjazne środowisku i jednocześnie pozwala obniżyć koszty całego procesu syntezy. Reakcje bezroztworowe wspierane polem promieniowania mikrofalowego znane są od lat i obejmują reakcje takie jak: utlenianie, redukcja, kondensacja, syntezę związków heterocyklicznych, a także reakcje otrzymywania amin, enamin, imin

i innych.¹⁸ Z racji tego, że typowy rozpuszczalnik został wyeliminowany, pojawia się problem dobrego kontaktu i wymieszania reagentów pozostających w układzie dwóch lub trzech niemieszających się fazach. Dzięki zastosowaniu katalizatorów przeniesienia międzyfazowego (PTC) możliwe jest zajście reakcji w układzie heterogenicznym poprzez transport jednego z reagentów z jednej fazy do drugiej gdzie w łatwy sposób reaguje z drugim reagentem.¹⁹⁻²² Znane są dwa warianty prowadzenia katalizy przeniesienia międzyfazowego – w układzie dwufazowym (ciecz-ciecz; ciało stałe-ciecz i gaz-ciecz) oraz trójfazowym (gdy katalizator PT osadzony jest na stałym nośniku – ciecz-ciecz-ciało stałe, gdy katalizator PT tworzy odrębną fazę – ciecz-ciecz-ciecz). Do najczęstszych PTC, które stosowane są w syntezie należy wymienić przede wszystkim czwartorzędowe sole amoniowe jak np. TBAB (bromek tetrabutylamoniowy) lub BTEAB (bromek benzylotrietylamoniowy) a także etery koronowe (np. 18-korona-6) oraz glikole polietylenowe wraz z pochodnymi.²³ Obecnie, postulowane są najczęściej dwa mechanizmy katalizy międzyfazowej tj. mechanizm wg. Starksa stosowany głównie do opisu prostych reakcji substytucji z udziałem organicznych lub nieorganicznych anionów, oraz mechanizm wg Mąkoszy, który jest charakterystyczny dla reakcji zachodzących w obecności silnych zasad nieorganicznych jak np. NaOH za pomocą których generowane są aniony organiczne *in situ*. Mąkosza zakłada istnienie międzyfazy gdzie dochodzi do utworzenia pary jonowej: kation PTC-karboanion o właściwościach lipofilowych i która to para z łatwością migruje w głąb fazy organicznej co umożliwia zajście właściwej reakcji.^{23,24}

Przykładem reakcji bezrozpuszczalnikowych wspieranych polem promieniowania mikrofalowego może być synteza estrów izosorbidu, które mają zastosowanie w przemyśle skrobiowym. Stosując krótkie czasy reakcji (5 – 30 min), udało się zwiększyć wydajność otrzymywanych estrów z 10 – 45 % w przypadku konwencjonalnego ogrzewania do nawet 98 % w przypadku reakcji w obecności promieniowania mikrofalowego.²⁵ Inny z kolei przykład, który można tutaj przytoczyć jest synteza diarylo α -tetralonów w wyniku addycji Michaela izoforonu oraz odpowiednio podstawionych chalkonów. Stosując PTC jako mieszaninę Aliquat'u 336 i etanolanu sodu oraz promieniowanie mikrofalowe o mocy P = 300 W udało się zwiększyć wydajność otrzymywanych produktów o 30 % przy zredukowaniu czasu syntezy z 24 godzin w przypadku ogrzewania klasycznego do 5 minut w przypadku reakcji w obecności promieniowania mikrofalowego.²⁶ Z kolei Bougrin *i współl.*²⁷ porównywali możliwość prowadzenia reakcji kondensacji sacharyny z pochodnymi chlorku kwasu krotonowego w warunkach klasycznych oraz z udziałem reakcji

bezrozpuszczalnikowych wpieranych polem promieniowania mikrofalowego. Reakcje prowadziły do otrzymania pożądaných produktów w obu przypadkach, jednak zastosowanie wariantu bezrozpuszczalnikowego w obecności promieniowania mikrofalowego znacznie skróciło czas reakcji z 24 godzin (ogrzewanie konwencjonalne) do 90 sekund (MW). Zanotowano również wzrost wydajności z 78 – 87 % do 95 – 97 % odpowiednio dla ogrzewania konwencjonalnego oraz mikrofalowego.

Bezrozpuszczalnikowa metoda syntezy związków organicznych, wspierana polem promieniowania mikrofalowego jest dynamicznie rozwijana w zespole Chemii i Technologii Leków w Katedrze Chemii i Technologii Organicznej, Politechniki Krakowskiej, gdzie w pracach tych brał czynny udział autor niniejszego autoreferatu. Jaśkowska *i współl.* opisali metodę syntezy API znanych leków przeciwpsychotycznych w tym olanzapiny²⁸ aripiprazolu^{29,30} lub też trazodonu.^{31,32} Reakcje przebiegały najlepiej w środowisku węglanu potasu, TBAB jako PTC oraz DMF/CH₃CN lub wody w optymalnej ilości 10% mas., które nie pełniły roli rozpuszczalnika, lecz stanowiły jedynie czynnik ułatwiający transfer energii mikrofalowej. W tych warunkach, wspomniane API są otrzymywane ze średnio 80 % wydajnością w czasie nie dłuższym niż kilka minut. Opracowaną metodę można również zastosować do syntezy biblioteki nowych związków o potencjalnej aktywności biologicznej.^{33,34}

Powyższe przykłady zastosowania promieniowania mikrofalowego, a także prowadzenia reakcji bezrozpuszczalnikowych wpieranych tym promieniowaniem, stanowią dowód na ich użyteczność nie tylko w chemii organicznej/medycznej ale zakres ich zastosowania można rozszerzyć na inżynierię chemiczną. Celem inżynierii chemicznej jest m.in. opracowanie takich metod syntetycznych, dzięki którym możliwe będzie otrzymywanie użytecznych związków (np. API) w sposób szybki, wydajny, tani oraz przede wszystkim bezpieczny dla środowiska. W przypadku wczesnego etapu odkrywania leków, metody syntezy, które w krótkim czasie pozwalają otrzymać związki z wysoką wydajnością, odgrywają istotną rolę w związku z koniecznością szybkiej syntezy biblioteki związków potrzebnych do wstępnego przesiewu pod kątem bioaktywności jak i dalszych etapów rozwoju cząsteczek o potencjalnych właściwościach leczniczych.

1.2. Receptory serotoninowe jako punkty uchwytu leków

Serotonina (5-hydroksytryptamina, 5-HT) jest naturalną biogenną monoaminą, pełniącą rolę neurotransmitera w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Będąc neurotransmiterem, spełnia szereg funkcji w tym: regulacja temperatury ciała³⁵, regulacja snu³⁶, cyklu dobowego³⁷, odpowiada także za zachowania seksualne³⁸ i nastroj³⁹. Co ciekawe, aż 95 % serotoniny produkowane jest w komórkach enterochromafilnych jelit gdzie spełnia tam funkcje regulacyjne w tym reguluje ciśnienie krwi⁴⁰, skurcze mięśni gładkich⁴¹ czy też masę kostną organizmu.⁴² Serotonina jest naturalnym ligandem receptorów serotoninowych, których do tej pory zidentyfikowano siedem typów (5-HT₁ – 5-HT₇), podzielone na 15 podtypów. Receptory 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄ – 5-HT₇ są sprzężone z białkiem G – tzw. aminergiczne GPCR⁴³, natomiast receptor 5-HT₃ jest kanałem jonowym.⁴³ Badania przedkliniczne sugerują, że blokowanie lub stymulowanie poszczególnych podtypów receptorów serotoninowych może wpływać na działanie przeciwdepresyjne, przeciwlękowe lub też działanie prokognitatywne.⁴⁴

1.2.1. Receptor 5-HT_{1A} - funkcja i znaczenie terapeutyczne

Receptor 5-HT_{1A} (5-HT_{1A}R), jest jednym z najwcześniej odkrytych i najszerzej przebadanym wśród rodziny receptorów serotoninowych. Jego lokalizacja w mózgu obejmuje rejony: limbiczne, przegrody bocznej oraz jądra szwu.^{45,46} Receptor ten stanowi dwie podgrupy – presynaptyczne autoreceptory oraz postsynaptyczne heteroreceptory. Z racji tego, receptor 5-HT_{1A} może tłumić globalne uwalnianie serotoniny do szczeliny synaptycznej (funkcja autoreceptorów) jak i pośredniczyć w przekazywaniu sygnału nerwowego wskutek wiązania uwolnionej serotoniny przez heteroreceptory.⁴⁷ Jak już to zostało wspomniane wcześniej, receptor ten jest sprzężony z białkiem G (G_{i/o}) i ujemnie reguluje aktywność cykazy adenylowej. W konsekwencji następuje hamowanie tworzenia się cAMP oraz inhibicję kinazy białkowej A (PKA).^{45,46}

W pierwszych latach badań nad receptorami 5-HT wykazano, że agoniści receptora 5-HT_{1A} np. buspiron, wykazują działanie przeciwdepresyjne i przeciwlękowe.⁴⁸⁻⁵¹ Udowodniono, że jednoczesne stosowanie agonistów receptora 5-HT_{1A} oraz leków z grupy SRI, powoduje zwiększenie skuteczności terapii przeciwdepresyjnej z jednoczesnym skróceniem czasu wystąpienia początkowych efektów. Ponadto wydaje się, że agoniści

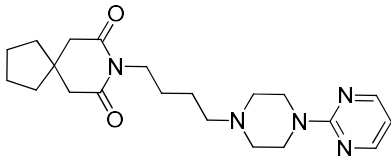
receptora 5-HT_{1A} również mają swoje zalety w łagodzeniu skutków ubocznych, z powodu działania przeciwwymiotnego. Receptor 5-HT_{1A} wraz z receptorem 5-HT_{2A} oraz D₂ – receptor dopaminowy są preferowanym celem terapeutycznym w leczenie schizofrenii.^{52,53} Wykazano, że agoniści 5-HT_{1A}R łagodzą skutki uboczne efektów pozapiramidowych stosowanych neuroleptyków a także poprawiają stan emocjonalny pacjentów ze zdiagnozowaną schizofrenią. Z kolei antagoniści i antagoniści 5-HT_{1A}R mają pozytywny wpływ na własności kognitywne oraz procesy pamięciowe.⁵⁴ W przypadku choroby Parkinsona zbadano, że stymulowanie receptora 5-HT_{1A} jest korzystne w kontekście leczenia tej choroby ponieważ zaobserwowano poprawę objawów motorycznych spowodowanych degradacją lub uszkodzeniem neuronów dopaminergicznych, zmniejszenie dyskinez oraz redukcję epizodów depresyjnych, często towarzyszących chorobie Parkinsona.⁵⁴

1.2.2. Receptor 5-HT_{1A} – przegląd wybranych ligandów

Z racji tego, że receptory serotoninowe, a w szczególności 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇, wykazują pewne podobieństwo sekwencyjne (około 50%) w obrębie typów, a także podtypów, spodziewać się można, że mogą charakteryzować się pewnym wspólnymi cechami w obrębie kieszeni wiążącej.⁵⁵ W konsekwencji jeden ligand może wiązać się z różnymi typami receptorów np. 5-HT_{1A}/5-HT₇ lub 5-HT₆/5-HT₇ i innymi – w takim wypadku mówi się o *multifunkcyjnym profilu farmakologicznym* danego związku. W niniejszym krótkim przeglądzie, opisane zostaną ligandy wykazujące powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}, niemniej jednak należy mieć na uwadze, że te same związki mogą wykazywać aktywność również do innych receptorów.

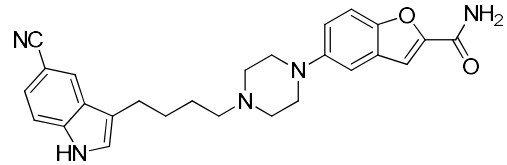
Z chemicznego punktu widzenia ligandy receptora 5-HT_{1A} można podzielić głównie na: pochodne arylopipezyn, arylopiperydyn oraz 2-aminotetraliny, z których pochodne arylopipeazy, a w szczególności długołańcuchowe arylopipezyny (LCAPs), są najintensywniej badane i najwięcej leków z tej grupy zostało wprowadzone do lecznictwa. Przykładem takich leków, które można w tym miejscu wymienić to: buspiron, vilazodon, vortiooksetyna, flibanseryna, brekspiprazol, aripiprazol lub kariprazyna (**Rysunek 1**). W budowie strukturalnej tych związków zasadniczo można wyróżnić trzy elementy: 1) arylopipezynę; 2) łącznik węglowy oraz 3) terminalny układ heterocykliczny, aromatyczny, cykloalifatyczny lub alifatyczny bezpośrednio przyłączony do łańcucha węglowego lub poprzez wiązanie aminowe, amidowe, imidowe lub inne. Buspiron (*Buspar*)

to jeden z najstarszych leków z grupy długołańcuchowych arylopiperazyn, przedstawiciel azapironów o działaniu przeciwlękowym.⁵⁶ Początkowo sądzono, że właściwości przeciwlękowe związane są z działaniem antagonistycznym na receptor D₂, jednak później okazało się, że za ten efekt odpowiada agonizm receptora 5-HT_{1A}.⁵⁶ Wilazodon (*Viibryd*) jest lekiem od 2011 roku stosowanym w leczeniu depresji⁵⁷ będącym jednocześnie selektywnym inhibitorem zwrotnym serotoniny (SSRI) oraz częściowy antagonistą 5-HT_{1A}.⁵⁷ Jako częściowy agonista, aktywuje autoreceptory 5-HT_{1A} oraz postsynaptyczne heteroreceptory. Klinicznie zostało dowiedzione, że vilazodon jako lek dualny działa szybciej i skuteczniej w porównaniu do typowych SSRI.⁵⁸ Wortioksetyna (*Trintellix*) opracowany przez Lunbeck oraz Tekadę w 2013 roku to atypowy lek przeciwdepresyjny cechujący się multifunkcyjnym profilem działania. Pod względem strukturalnym, związek ten różni się od pozostałych ze względu na brak obecności łącznika węglowego oraz układu terminalnego. W przeciwieństwie do wilazodonu, oprócz działania agonistycznego na receptor 5-HT_{1A} oraz hamującego SERT, wortioksetyna wykazuje działanie antagonistyczne na receptor 5-HT₃ oraz 5-HT₇ i dodatkowo działa jako częściowy agonista receptora 5-HT_{1B}. Zbadane zostało, że lek ten nie tylko działa na system serotonergiczny, ale także moduluje wydzielanie noradrenaliny, dopaminy, histaminy, acetylocholiny, GABA oraz wpływa na układ glutaminergiczny.⁵⁹ Ciekawym lekiem z grupy długołańcuchowych arylopiperazyn jest flibanseryna (*Addyi*). Początkowo związek ten wprowadzony był do leczenia depresji, jednak późniejsze badania pokazały, że flibanseryna może być stosowana do leczenia zaburzeń libido u kobiet. Ligand ten wykazuje wysokie powinowactwo do receptorów serotoninowych w mózgu działając jako agonista receptora 5-HT_{1A} oraz antagonistą receptora 5-HT_{2A}. Wykazano również, że słabiej działa w funkcji antagonisty receptora dopaminowego D₄ oraz serotoninowego 5-HT_{2B} i 5-HT_{2C}.^{60,61} Jednym z najnowszych leków zaakceptowanych przez FDA (w 2015 roku) do leczenia schizofrenii jest kariprazyna (*Vraylar*). Oprócz terapii schizofrenii możliwe jest również leczenie napadów maniakałnych kojarzonych z chorobą afektywno-dwubiegunową. Związek ten wykazuje powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} w funkcji częściowego agonisty, oraz do receptorów dopaminowych D₂ i D₃ również w funkcji częściowego agonisty.⁶² W tym samym roku FDA również zaakceptowała brekspiprazol (jako alternatywa dla arypipirazolu) do leczenia schizofrenii. Oba związki cechują się multifunkcyjnym profilem działania wykazujących powinowactwo do receptorów 5-HT (w tym 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}), dopaminowych (D₂, D₃, D₄), adrenergicznych (α_1 , α_2).⁶³



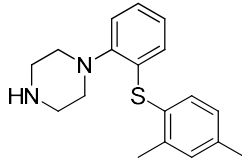
BUSPIRON^{64,65}

5-HT_{1A} $K_i = 21$ nM (częściowy agonista)
 5-HT₇ $K_i = 381$ nM



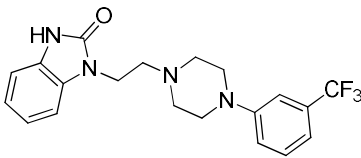
WILAZODON⁶⁶

5-HT_{1A} $IC_{50} = 0,2$ nM (częściowy agonista)
 SERT $IC_{50} = 0,5$ nM (inhibitor)
 5-HT₇ $IC_{50} = 3900$ nM
 D₂ $IC_{50} = 666$ nM



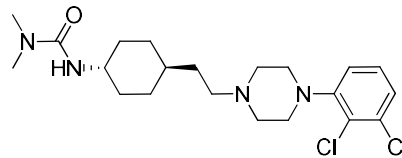
WORTIOKSETYNA⁵⁹

5-HT_{1A} $K_i = 15$ nM (agonista)
 SERT $K_i = 1,6$ nM (inhibitor)
 5-HT_{1B} $K_i = 33$ nM (częściowy agonista)
 5-HT₃ $K_i = 3,7$ nM (antagonista)
 5-HT₇ $K_i = 19$ nM (antagonista)



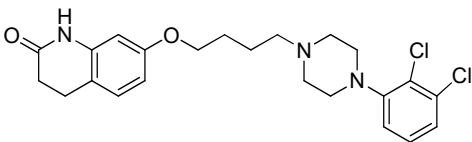
FLIBANSERYNA⁶⁷

5-HT_{1A} $K_i = 19$ nM (agonista)
 5-HT_{2A} $K_i = 133$ nM (antagonista)



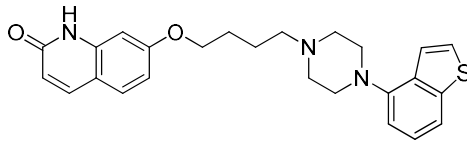
KARIPRAZYNA⁶⁵

5-HT_{1A} $K_i = 2,6$ nM (częściowy agonista)
 5-HT_{2A} $K_i = 18,8$ nM (antagonista)
 5-HT₇ $K_i = 111$ nM
 D₂ $K_i = 0,49$ nM (częściowy agonista)



ARYPIPAZOL^{65,68}

5-HT_{1A} $K_i = 1,7$ nM (częściowy agonista)
 5-HT_{2A} $K_i = 3,4$ nM (antagonista)
 5-HT₇ $K_i = 10,3$ nM (częściowy agonista)
 D₂ $K_i = 0,34$ nM (częściowy agonista)



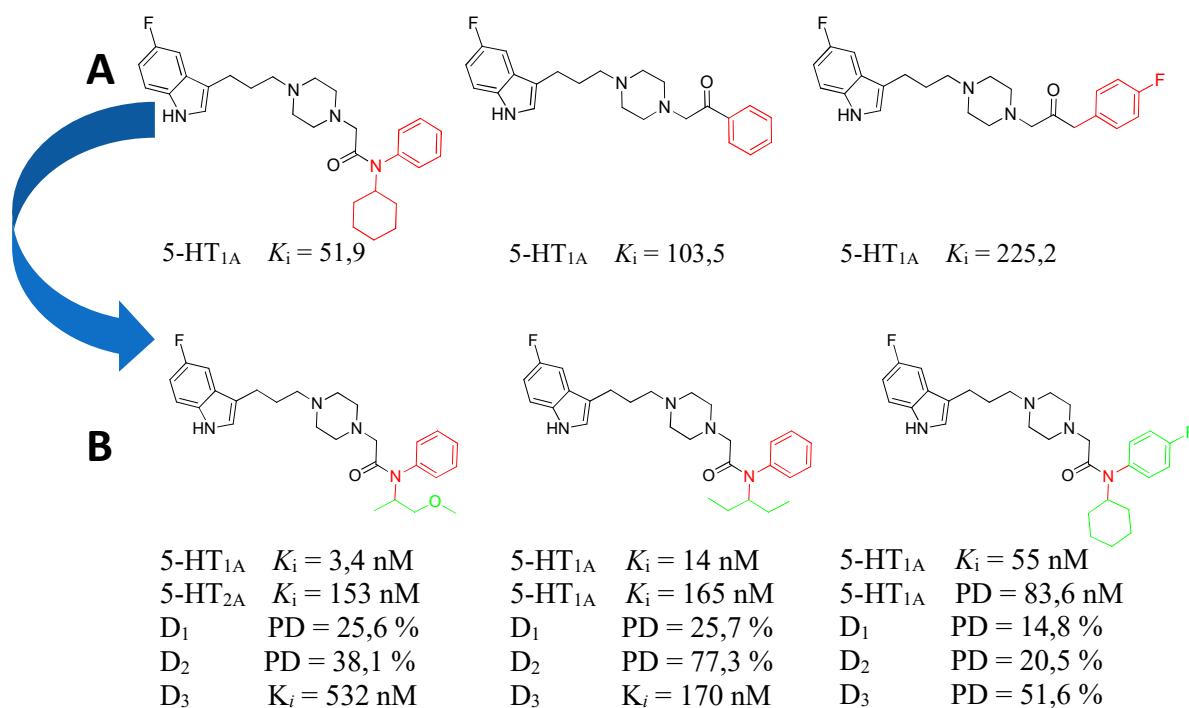
BREKSPIPAZOL⁶⁹

5-HT_{1A} $K_i = 0,12$ nM (częściowy agonista)
 5-HT_{2A} $K_i = 0,47$ nM (antagonista)
 5-HT₇ $K_i = 3,7$ nM (antagonista)
 D₂ $K_i = 0,30$ nM (częściowy agonista)

Rysunek 1. Przykładowe struktury leków zaakceptowanych przez FDA, będące ligandami receptora 5-HT_{1A} wraz z profilem farmakologicznym.

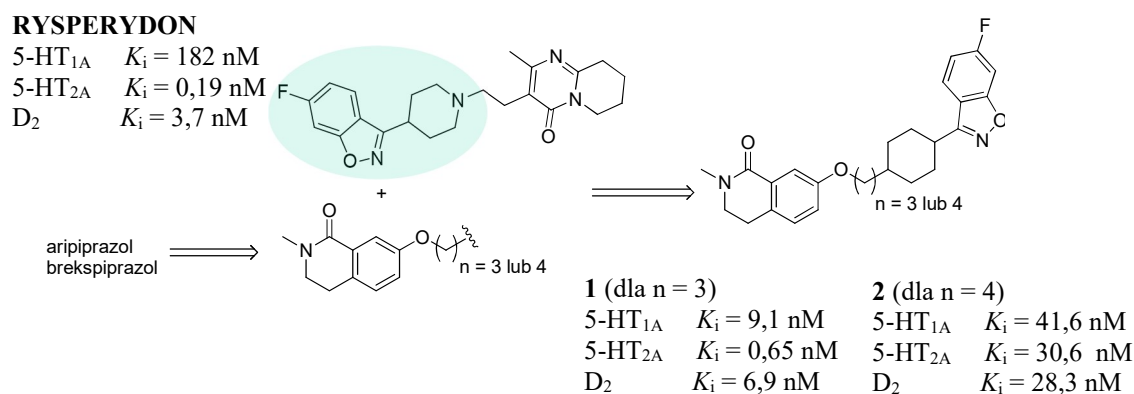
W przypadku związków należących do grupy LCAPs, będące w fazie testów przedklinicznych, trzy fragmenty strukturalne tj. arylopiiperazyne/arylopiperydyna, łańcuch węglowy oraz układ terminalny są zwykle modyfikowane celem zwiększenia powinowactwa do wybranego receptora lub też osiągnięcia zaplanowanej aktywności multifunkcyjnej.

W 2013 roku, chińska grupa badawcza pod kierownictwem Wei Fu⁷⁰ korzystając z metod modelowania molekularnego, zaprojektowała serię agonistów wykazujących powinowactwo głównie do receptora 5-HT_{1A}. Powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} mieściło się w zakresie $K_i = 51,9 - 351,7$ nM. Seria tych związków stała się punktem wyjściowym do zaprojektowania kolejnej grupy⁷¹ o znacznie wyższym powinowactwie do wspomnianego receptora, uzyskując wartości K_i nawet do 3,4 nM. Dodatkowo postanowiono zbadać powinowactwo do innych receptorów – dopaminowych D₁, D₂, D₃ oraz serotoninowego 5-HT_{2A}. Okazało się, że większość związków rzeczywiście cechowała się dużą selektywnością oraz wysokim powinowactwem (**Rysunek 2**).



Rysunek 2. A – Przykładowa seria ligandów wykazujących powinowactwo do 5-HT_{1A}R otrzymana w wyniku wirtualnego screeningu; **B** – Przykładowa seria selektywnych ligandów wykazujących powinowactwo do 5-HT_{1A}R otrzymana w wyniku modyfikacji strukturalnych serii związków **A**. PD – procent wyparcia radioliganda.

W chemii medycznej, jednym ze sposobów odkrywania nowych związków jest bazowanie na znanych lekach np. rysperydonie. Wykorzystując motyw izochinolinonu, który jest podobny do chinolinonu obecnego w strukturze aripiprazolu lub brekspiprazolu, zespół badawczy Chen Yin⁷² opracował nowe, hybrydowe związki o działaniu przeciwpsychotycznym (**Rysunek 3**). W pracy uwzględniano ocenę wpływu różnych arylopiperazyn/arylopiperydyn a także długość łańcucha alkilowego na powinowactwo do: 5-HT_{1A}R, 5-HT_{2A}R, D₂R.



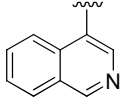
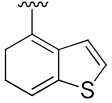
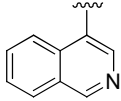
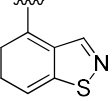
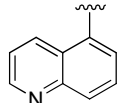
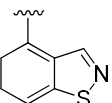
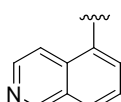
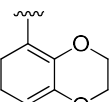
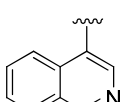
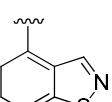
Rysunek 3. Ideowy schemat otrzymanych związków hybrydowych o działaniu przeciwpsychotycznym przez Chen Yin.⁷²

Delikatnie modyfikując rdzeń układu terminalnego aripiprazolu lub brekspiprazolu a następnie sprzęgając go poprzez propylowy lub butylowy łańcuch węglowy z arylopiperydyną obecną w rysperydonie (lek przeciwpsychotyczny⁷³) naukowcom udało się uzyskać interesujące, przykładowe związki (**1**) i (**2**), o podobnym profilu receptorowym co oryginalny rysperydon ale ze zwiększonym powinowactwem do 5-HT_{1A}R. Zauważono, że wydłużanie łańcucha węglowego obniża powinowactwo do wszystkich badanych receptorów natomiast badając wpływ różnych arylopiperazyn lub arylopiperydyn na powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A}R, 5-HT_{2A}R, D₂R okazało się, że najlepszą była ta pochodząca z rysperydonu.

W 2016 roku, Zajdel *i* współ.⁷⁴ opatentował grupę chinolinowych oraz izochinolinowych sulfonamidów będących pochodnymi cyklicznych amin alifatycznych (**Tabela 1**). Związki te charakteryzują się szerokim profilem farmakologicznym wykazując powinowactwo do następujących receptorów: 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇, D₂. W testach

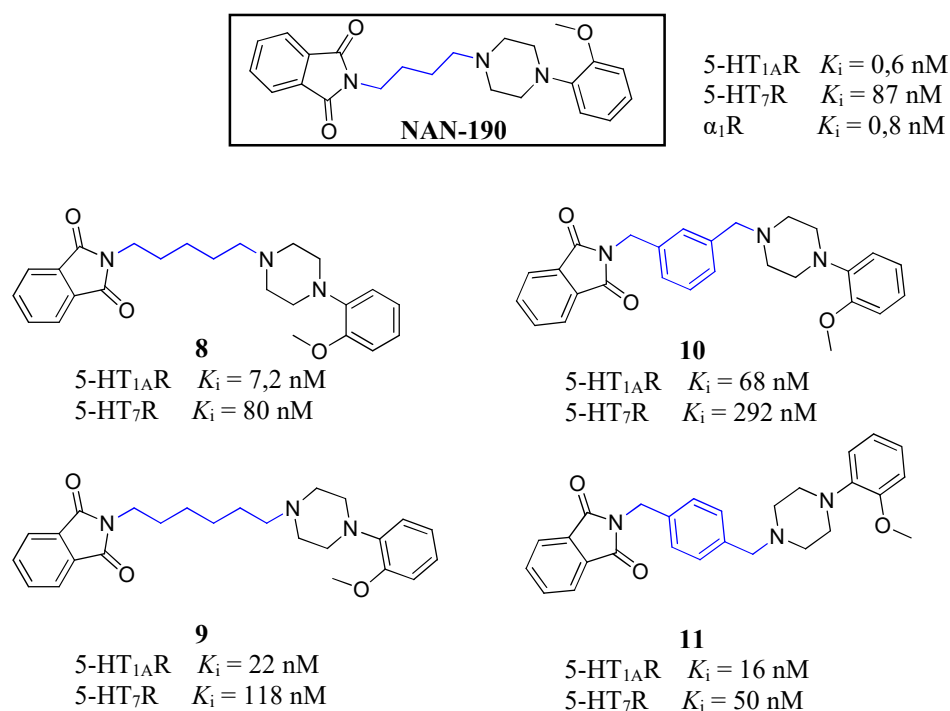
behawioralnych, wszystkie badane ligandy wykazywały aktywność przeciwpsychotyczną i pro-kognitywną przy czym związki: **(3)** (częściowy agonista 5-HT_{1A}R) i **(4)** były najbardziej aktywne. Ze względu na swoje właściwości farmakologiczne, związek **(3)** uznano za potencjalny kandydat na lek, który nie wykazywał kardi toksyczności ani tendencji do indukowania katalepsji.⁷⁵

Tabela 1. Profil receptorowy wybranych chinolinowych / izochinolinowych sulfonamidów

Nr	*	R ₁	R ₂	K _i [nM]				
				5-HT _{1A} R	5-HT _{2A} R	5-HT ₆ R	5-HT ₇ R	D ₂ R
3	S			18	9	116	19	11
4	S			37	13	181	10	<1
5	S			37	5	400	12	<1
6	S			1	NT	3264	279	38
7	R			14	15	40	3	<1

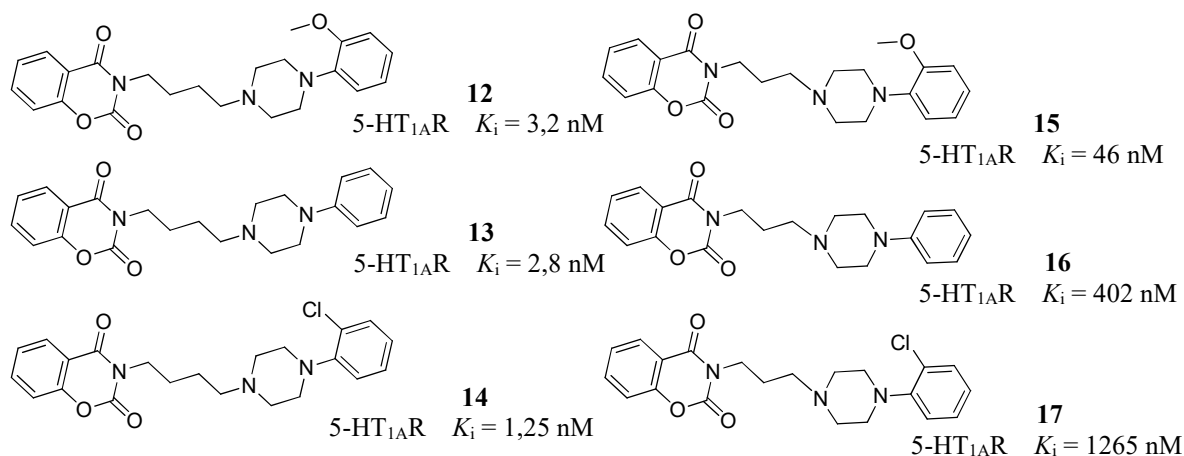
Jeśli chodzi o przykłady związków wykazujących powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}, warto wspomnieć o pochodnych ftalimidu⁷⁶, benzoksazyno-2,4-dionu oraz salicylamidu. Pochodne zawierające układ ftalimidu (**Rysunek 4**) będący cyklicznym imidem, są analogami znanego NAN-190, który jest antagonistą receptora 5-HT_{1A} (K_i = 0,6 nM)⁷⁶, niemniej jednak wykazuje również silne powinowactwo do receptora adrenergicznego α₁ (K_i = 0,8nM)⁷⁷ a także nieco słabsze do receptora 5-HT₇ (K_i = 87 nM).⁷⁶ Wydłużenie łańcucha węglowego w cząsteczce NAN-190 o jedną grupę metylenową (łańcuch pentyłowy) lub o dwie (łańcuch heksylowy), spowodowało nieznaczne osłabienie wiązalności

do receptora 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇. W przypadku usztywnienia łańcucha, poprzez wprowadzenie łącznika *m*-ksylenowego oraz *p*-ksylenowego, również obserwowano osłabienie wiązalności do obu receptorów, przy czym wiązalność liganda z łącznikiem *p*-ksylenowym była wyższa niż z łącznikiem *m*-ksylenowym. Dodatkowo, bardziej liniowy ligand (**11**) wykazywał najwyższą wiązalność do receptora 5-HT₇, tj. zarówno niż NAN-190 oraz wszystkie pozostałe badane związki.



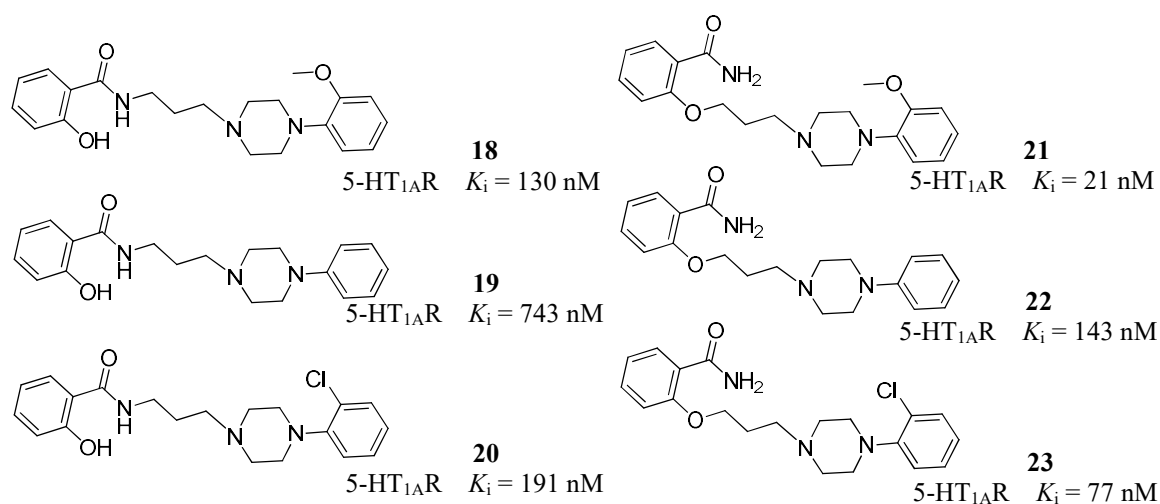
Rysunek 4. Modyfikacje strukturalne NAN-190 w obrębie linkera węglowego.

Mając na uwadze, że układ benzoksazyno-2,4-dionu jest, strukturalnie podobny do ftalimidu, spodziewać by się można, że i analog NAN-190 z benzoksazyno-2,4-dionem w części terminalnej, również będzie wykazywać podobne powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} (**Rysunek 5**). Faktycznie okazuje się, że związek (**12**)⁷⁸ będący częściowym agonistą wykazuje powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}, jednak wiąże się z nim nieco słabiej ($K_i = 3,2$ nM)⁷⁸ niż w przypadku NAN-190. Wymiana 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny na 1-fenylopiperazynę spowodowała lekki wzrost w powinowactwie ($K_i = 2,8$ nM) natomiast wymiana na 1-(3-chlorofenylo)piperazynę spowodowała dalszy wzrost w powinowactwie do 5-HT_{1A}R ($K_i = 1,25$ nM). Skrócenie łańcucha butylowego do propylowego (związki (**15**), (**16**), (**17**)) powoduje osłabienie wiązalności do receptora 5-HT_{1A}.⁷⁹



Rysunek 5. Pochodne benzoksazyno-2,4-dionu.

Hydroliza długołańcuchowych arylopiperazyn z układem benzoksazyno-2,4-dionu w części terminalnej prowadzi do otrzymania grupy *N*-pochodnych salicylamidu (**Rysunek 6**). Grupa badawcza prof. Kowalskiego^{79,80} prowadziła badania mająca na celu porównanie powinowactwa ligandów z grupy *N*- i *O*-pochodnych salicylamidu (**Rysunek 6**). Okazało się, że ligandy będące *O*-pochodnymi salicylamidu (związki **(21-23)**) wykazywały wyższe powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} niż *N*-pochodne salicylamidu (związki **(18-20)**).



Rysunek 6. *N*- i *O*-pochodne salicylamidu.

1.2.3. Receptor 5-HT₇ - funkcja i znaczenie terapeutyczne

Receptor 5-HT₇ (5-HT₇R) jest jednym z najpóźniej odkrytych z rodziny receptorów serotoninowych. Wykazuje ekspresję zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym jak i w poszczególnych organach poza układem nerwowym. Największe jego zagęszczenie w mózgu wykazano w rejonach wzgórza, podwzgórza oraz w jądrze grzbietowym, jądrze migdałowatym oraz w hipokampie. Poza mózgiem, receptor został zidentyfikowany w nerkach, wątrobie, trzustce, śledzionie, żołądku, oraz w jelitach.⁸¹ Podstawowa ścieżka przekazywania sygnału poprzez receptor 5-HT₇ polega na związaniu receptora z ligandem a następnie fosforylację podjednostki G połączoną z jej dysocjacją na: podjednostkę G_s oraz heterodimer G₁₂. W kolejnym etapie białko G_s (kanoniczna sygnalizacja) zostaje zaktywowane co powoduje uruchomienie izoformy CA (cyklazy adenylowej) prowadząc do wewnętrznego wzrostu stężenia cAMP. cAMP indukuje ekspresję PKA a ta z kolei wpływa na dalszą fosforylację innych białek np. szlaku Ras, ERK, Akt co w konsekwencji prowadzi do przesyłania sygnału do dalszych struktur komórkowych.⁸²

Jedną z pierwszych poznanych funkcji receptora 5-HT₇ jest regulacja cyklu okołodobowego a w konsekwencji regulacja snu w fazie REM.^{81,83} Oprócz tego udowodniono, że receptor 5-HT₇ pełni również kluczową rolę w procesach zapamiętywania i uczenia się^{84,85} a także termoregulacji.⁸⁶ Wyniki badań przedklinicznych wskazują na możliwość zastosowania receptora w leczeniu depresji⁸⁷, schizofrenii^{87,88}, lęku⁸⁸, bólu neuropatycznego^{89,90} a nawet epilepsji⁹¹. Ponadto, w ostatnich latach dowiedziono, że receptor ten może stać się interesującym celem w poszukiwaniu związków o działaniu przeciwnowotworowym np. w leczeniu potrójnie ujemnego raka piersi⁹², niedrobnokomórkowego raka płuc⁹³ lub też raka prostaty.⁹⁴

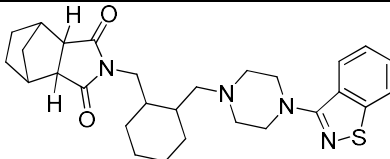
1.2.4. Receptor 5-HT₇ – przegląd wybranych ligandów

Jak to zostało już wspomniane w poprzednim paragrafie, podobieństwa w homologii receptorów serotoninowych w mniejszym lub większym stopniu będą warunkować wiązanie się jednego związku z wieloma receptorami 5-HT i/lub z innymi aminergicznymi GPCR. Warto tutaj wspomnieć, że na rynku nie ma żadnego leku wykazującego selektywne działanie na receptor 5-HT₇, natomiast do fazy badań klinicznych zakwalifikowano do tej pory JNJ-18038683 (5-HT₇R K_i = 6,5 nM, 5-HT_{1A}R K_i = 316 nM)⁹⁵ jako selektywny

i potencjalny środek podnoszący funkcje poznawcze oraz stabilizujący nastrój w chorobie afektywnej dwubiegunowej.⁹⁶

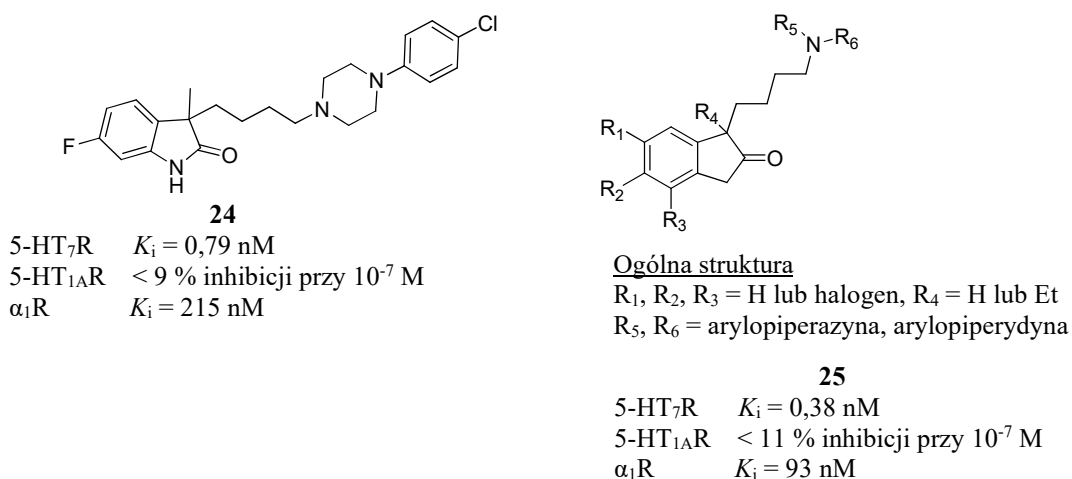
Podobnie jak w przypadku ligandów 5-HT_{1A}, spora grupa ligandów 5-HT₇ należeć będzie również do pochodnych arylopipezazyn oraz arylopiperydyn oraz do ich długołańcuchowych analogów. Niemniej jednak oprócz tej grupy, warto wymienić tutaj inne np. pochodne tryptaminy⁹⁷, ergoliny⁹⁷, 2-aminotetraliny⁹⁷, arylosulfonamidy⁹⁸, pochodne aminotriazyn⁹⁹, aminopirydyn¹⁰⁰ i aminopirymidyn.¹⁰⁰ Lurazydon (**Tabela 2**) oraz wortioksetyna (opisana w rozdziale 1.2.3) to przykłady nowych leków zaakceptowanych przez FDA o działaniu przeciwdepresyjnym; lurazydon zaś wykazuje dodatkowo działanie przeciwpsychotyczne.¹⁰¹ Oba związki charakteryzują się multifunkcyjnym działaniem. Lurazydon należy do pochodnych benzoizotiazolu i wykazuje powinowactwo do następujących receptorów: 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇, D₂ oraz adrenergicznych.¹⁰¹ W badaniach na zwierzętach lurazydon wykazywał szerszy profil aktywności. Oprócz działania przeciwdepresyjnego i przeciwpsychotycznego, obserwowano efekt przeciwdrgawkowy¹⁰¹ oraz przeciwlękowy.¹⁰¹ Dzięki silnemu antagonizmowi 5-HT₇R i/lub agonizmowi 5-HT_{1A}R lurazydon wykazywał właściwości usprawniające funkcje poznawcze u myszy.¹⁰²

Tabela 2. Profil farmakologiczny lurazydonu¹⁰²

						
K _i [nM]						
5-HT _{1A} R	5-HT _{2A} R	5-HT ₇ R	D ₂ R	α ₁ R	α _{2A} R	α _{2C} R
6,75	2,03	0,49	1,68	47,9	40,7	10,8
częściowy agonizm	antagonizm	antagonizm	antagonizm	-	-	-

Przykładem ligandów należących do długołańcuchowych arylopipezazyn lub arylopiperydyn wykazujących powinowactwo do receptora 5-HT₇ są związki opracowane

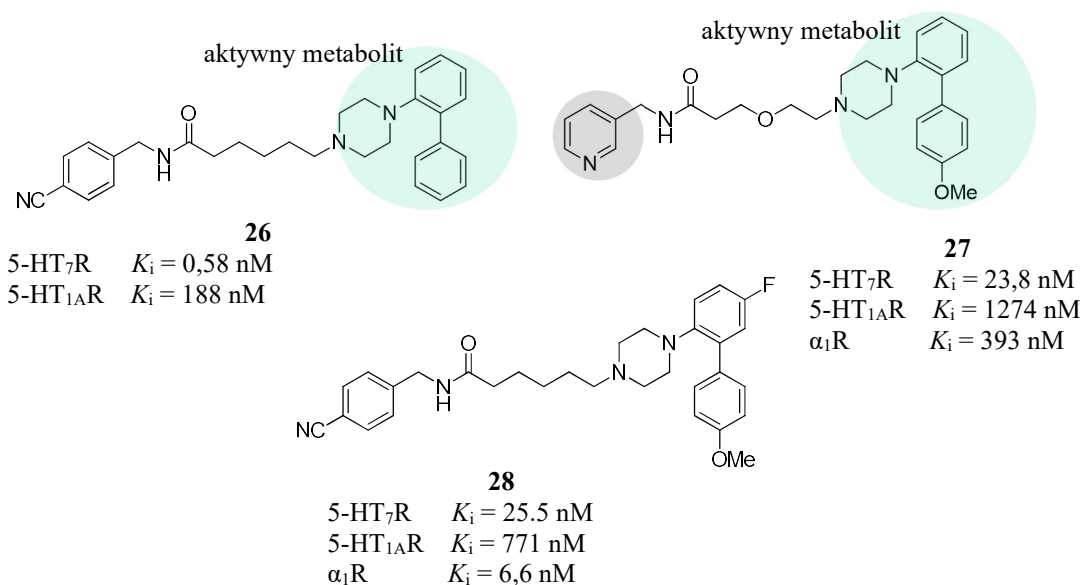
przez firmę Egis Pharmaceuticals z układem terminalnym w postaci indolin-2-onu (**Rysunek 7**). Przykładowy związek (**24**) wykazywał dobrą selektywność i aktywność do receptora (5-HT₇R $K_i = 0,79$ nM) w trybie antagonisty, jednak słaby profil farmakokinetyczny zainspirował naukowców do dalszej optymalizacji. Modyfikacje strukturalne zakładały: wprowadzenie zasadowych grup, podstawników alkilowych w pozycję trzecią indolin-2-onu oraz w prowadzenie jednego lub więcej halogenów w pierścień indolu. Finalnie otrzymano bibliotekę związków, z których część z nich wykazywało powinowactwo do receptora 5-HT₇ w nanomolarnych stężeniach, a także względnie wysoką selektywności względem receptora 5-HT_{1A} oraz α_1 (reprezentatywny związek (**25**)). Niestety pojawił się problem ze stabilnością metaboliczną oraz związki nie wykazywały aktywności przeciwdepresyjnej w teście FST *in vivo*.^{103,104}



Rysunek 7. Struktury długołańcuchowych arylopiperazyn/arylopiperydyn opracowanych przez Egis Pharmaceutical¹⁰⁴

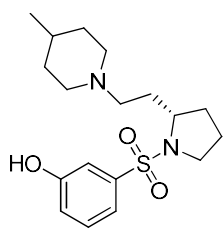
Prace zespołu Lacity z Uniwersytetu w Bari^{105,106} doprowadziły do odkrycia związku (**26**), który po podaniu dootrzewnowym ulegał rozpadowi do aktywnego metabolitu tj. 1-(2-bifenylo)piperazyny (**Rysunek 8**).¹⁰⁷ Naukowcy doszli do wniosku, że finalny efekt farmakologiczny jest wypadkową działania aktywnego metabolitu oraz oryginalnego związku, wobec tego postanowiono zaprojektować nową grupę związków (**Rysunek 8**) o podwyższonej stabilności metabolicznej w oparciu o zmniejszenie lipofilowości. Wymiana podstawnika cyjanofenyłowego na mniej lipofilowy pierścień pirydylowy, wprowadzenie linkera etoksyetylowego oraz wprowadzenie podstawnika *p*-metoksyłowego skutkowało otrzymaniem serii wciąż aktywnych i selektywnych związków do receptora

5-HT₇, jednak problem szybkiego metabolizmu nadal był aktualny (np. ligand **(27)**). Dalsze modyfikacje strukturalne polegające na dekoracji układu bifenylowego podstawnikami sterycznymi finalnie doprowadziły do zwiększenia stabilności metabolicznej niestety kosztem utraty selektywności w stosunku do α₁R (np. ligand **(28)**).

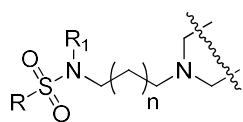


Rysunek 8. Przykładowe związki z rdzeniem arylopiperazyny opracowane na Uniwersytecie w Bari^{105,108}

Zaprojektowane arylosulfonamidy przez zespół Zajdel *i współ.* z Uniwersytetu Jagiellońskiego, to przykład ligandów 5-HT₇R strukturalnie podobnych do tych opracowanych przez GlaxoSmithKline, uznawanych za jedne z pierwszych selektywnych antagonistów receptora 5-HT₇ (np. SB-269970, **(29)**) (**Rysunek 9**).¹⁰⁹ W 2011 roku Zajdel *i współ*⁹⁸ zaproponowali nową serię arenowych oraz chinolinowych sulfonamidów, gdzie strukturalnym modyfikacjom ulegał łącznik węglowy oraz układ arylopiperazyny wymieniany na 1,2,3,4-tetrahydroizochinolinę (THIC), 4,5,6,7-tetrahydrotioeno[3,2-c]pirydynę (THTP) oraz perihydroizochinolinę (PHIQ). Wyniki badań pokazały, że obecność 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny pozytywnie wpłynęła na powinowactwo do 5-HT_{1A}R a także 5-HT_{2A}R oraz 5-HT₆R, podczas gdy rdzeń PHIQ był preferowany dla receptora 5-HT₇ (związek **(30)**). Ponadto, wzrost długości łańcucha alkilowego również korzystnie wpływał na powinowactwo do 5-HT₇, podobnie jak wprowadzenie hydrofobowych ugrupowań do atomu azotu grupy sulfonamidowej.



29 (SB-269970)¹⁰⁹
 5-HT₇R $K_i = 1,25$ nM
 5-HT_{1A}R $K_i > 1000$ nM
 5-HT_{2A}R $K_i > 1000$ nM
 5-HT₆R $K_i = 6300$ nM
 D₂R $K_i = 316$ nM

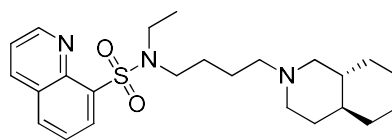


Ogólna struktura

n = 0-3

R = Ph, 2-naftył, chinolina,
 izochinolina

R₁ = H, Et, Et-NH₂, Pr-NH₂
 Amina = arylopiperazyna,
 THIC, THTP, PHIQ

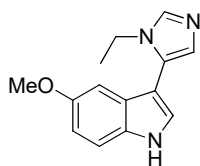


30

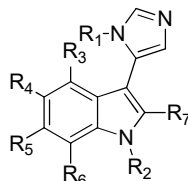
5-HT₇R $K_i = 13$ nM
 5-HT_{1A}R $K_i = 1099$ nM
 5-HT_{2A}R $K_i = 6281$ nM
 5-HT₆R $K_i = 1959$ nM
 α_1 R $K_i = 316$ nM

Rysunek 9. Przykładowe arylosulfonamidy opracowane przez zespół prof. Zajdła⁹⁸

Zupełnie odmienną grupą niskozasadowych związków, niezawierających motywu arylopiperazyny, a wciąż wykazującą powinowactwo do receptora 5-HT₇ są pochodne 5-arylo-1-alkilimidazoli z wiodącym motywem indolu opisanych przez Hogendorfa *i współ.* (**Rysunek 10**).¹¹⁰ Analiza SAR ujawniła, kilka kluczowych informacji. W celu zachowania wysokiej aktywności do receptora 5-HT₇ powinny być spełnione następujące warunki: obecność wolnej grupy NH w indolu, obecność przestrzennych oraz lipofilowych podstawników w C-5 indolu oraz obecność małych alkilowych podstawników w pierścieniu imidazolu. Badane związki (np. (**31**) i (**32**)) wykazywały agonizm względem receptora 5-HT₇, charakteryzowały się dobrą rozpuszczalnością i stabilnością metaboliczną a także niską cytotoksycznością wobec linii komórkowych HEK-293 / HepG2. Badania *in vivo* wykazały, że związek (**31**) poprawiał zdolności kognitywne u myszy.¹¹⁰

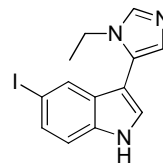


31
 5-HT₇R $K_i = 30$ nM
 5-HT_{1A}R $K_i = 660$ nM
 5-HT_{2A}R $K_i > 1000$ nM
 5-HT₆R $K_i = 6918$ nM
 D₂R $K_i > 1000$ nM



Ogólna struktura

R₁ = Me, Et, *n*-Pr, *n*-Bu, allył
 R₂ = H, Me; R₃ = H, Br;
 R₄ = H, OMe, F, Cl, Br, I, CN,
 Me, OBn, CONH₂; R₅ = H, Br
 R₆ = H, F; R₇ = H, Me

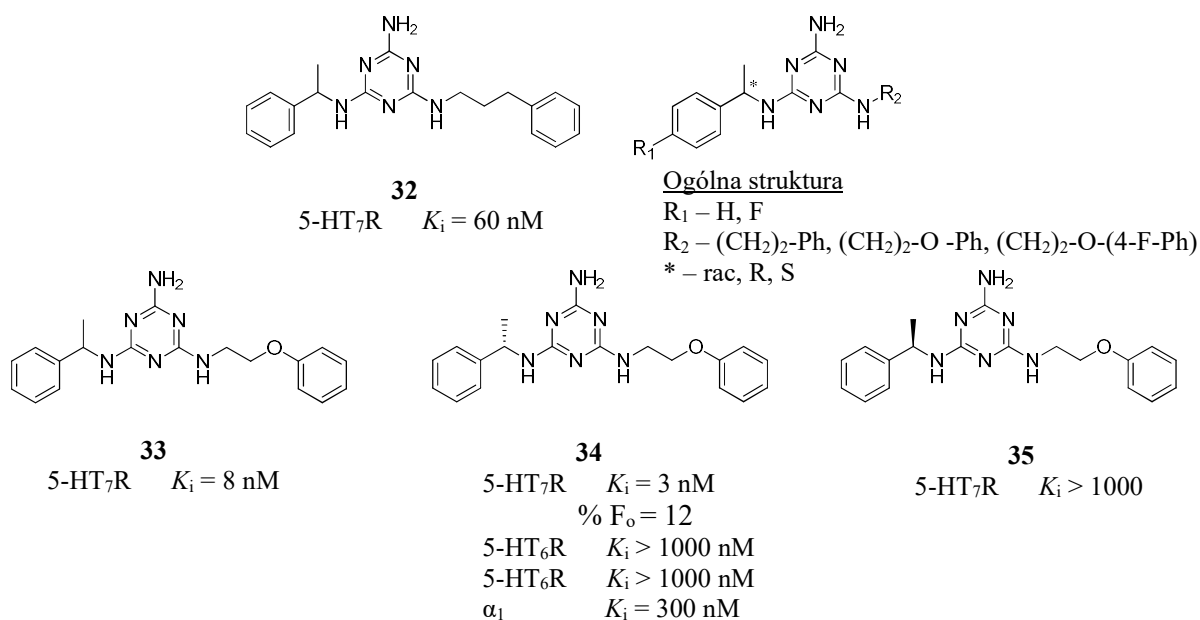


32

5-HT₇R $K_i = 6$ nM
 5-HT_{1A}R $K_i > 1000$ nM
 5-HT_{2A}R $K_i > 1000$ nM
 5-HT₆R $K_i > 1000$ nM
 D₂R $K_i = 4897$ nM

Rysunek 10. Przykładowe niskozasadowe związki opracowane przez Hogendorfa *i współ.*¹¹⁰

Kolejną interesującą grupą związków pozbawionych motywu arylopiiperazyny lub arylopiperydyny są pochodne aminotriazyny (**Rysunek 11**). Związki te, wykazują antagonistyczny tryb wiązania z receptorem. R.J Mattson *i współl.*⁹⁹ zaproponowali związek (**32**) (5-HT₇R, $K_i = 60$ nM) jako strukturę wyjściową do dalszej optymalizacji. Wprowadzając podstawniki fenoksyalkilowe (wraz z podstawionym pierścieniem) udało się zwiększyć powinowactwo do 5-HT₇R nawet trzydziestokrotnie. Z racji tego, że w strukturze obecne było centrum chiralne (ligand (**33**)), wyższa aktywność została przypisana tylko izomerom *S* (ligand (**34**)) w stosunku do nieaktywnego związku (**35**). Problem pojawił się na etapie biodostępności *in vivo* – związki wykazywały niską biodostępność na poziomie % F_o = 12. Wprowadzając atom fluorowca udało się ominąć ten problem – % F_o wzrósł do 57.



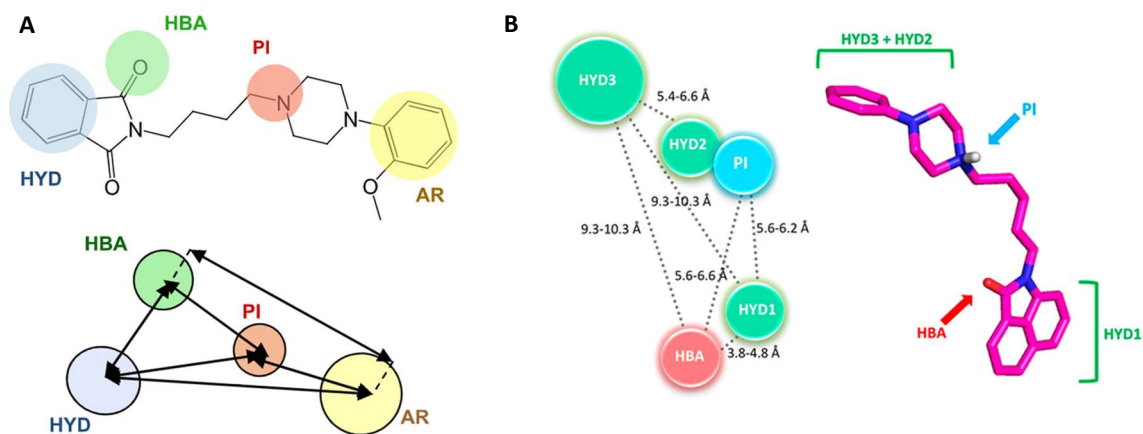
Rysunek 11. Przykładowe pochodne aminotriazyn.⁹⁹

1.3. Projektowanie związków w oparciu o: strukturę receptora oraz strukturę ligandów

Dzięki zastosowaniu komputerowych metod projektowania leków (CADD), proces odkrywania związków biologicznie aktywnych uległ skróceniu poprzez wyeliminowanie struktur o małym potencjale biologicznym. Dodatkowo metody komputerowe pozwoliły na lepsze zrozumienie interakcji jakie zachodzą na poziomie kompleksu ligand – receptor.

Obecnie dominują dwie strategie projektowania leków – w oparciu o znaną strukturę białka (SBDD) lub w oparciu o znane ligandy (LBDD). W przypadku SBDD dysponując strukturą krystaliczną białka lub też modelem homologicznym (gdy struktura jest niedostępna) receptora możliwe jest poznanie topologii miejsca wiążącego, a także jego charakteru elektrostatycznego, hydrofobowego lub hydrofilowego. Informacje te pozwalają na zaprojektowanie takich cząsteczek, które będą dopasowywać się do miejsca wiążącego i oddziaływać z nim poprzez swoiste interakcje np. mostek solny, wiązania wodorowe, wiązania hydrofilowe typu π - π , kation- π , lub też słabe oddziaływania typu van der Walsa.¹¹¹

Projektowanie w oparciu o znane ligandy zakłada istnienie biblioteki aktywnych oraz nieaktywnych struktur, a znajomość struktury krystalicznej lub homologicznej nie jest konieczna. Na tej podstawie budowany jest model farmakoforowy (**Rysunek 12**), który według definicji stanowi zestaw specyficznych cech strukturalnych oraz elektronowych niezbędnych do zaistnienia oddziaływania z receptorem, powodując aktywację lub zahamowanie działania biologicznego.¹¹² Na przeciągu kilkudziesięciu lat, powstało wiele modeli farmakoforowych opisujących aktywne ligandy do receptora 5-HT_{1A} – zarówno prostych^{113,114} jak i bardziej złożonych.¹¹⁵ Model Lepailleur’a na przykładzie NAN-190 (**Rysunek 12A**), zakłada istnienie czterech punktów umieszczonych pod odpowiednim kątem oraz w odpowiedniej odległości. Tymi punktami są: protonowane centrum zasadowe np. zasadowy azot piperazyny, zdolny do tworzenia mostka solnego z receptorem; akceptor wiązania wodorowego np. grupa karbonyłowa ftalimidu; obszar hydrofobowy np. pierścień aromatyczny ftalimidu oraz arylopiperazyny. Zespół López-Rodrigues¹¹⁶ zaproponował w 2003 roku model farmakoforowy dla receptora 5-HT₇ zbudowany na bazie znanych antagonistów (**Rysunek 12B**, pochodne naftolaktamów) tegoż receptora. Podobnie jak w poprzednim przypadku, model ten jest również wielopunktowy i składa się z kilku obszarów hydrofobowych, akceptora wiązania wodorowego, oraz z centrum zasadowego.



Rysunek 12. Modele farmakoforowe wraz z zaznaczonymi odległościami poszczególnych elementów: **A)** receptora 5-HT_{1A}, opracowanego przez Lepailleur'a; **B)** receptora 5-HT₇ opracowanego przez López-Rodríguez'a. HYD / AR – obszar hydrofobowy, HBA – akceptor wiązania wodorowego, PI – centrum zasadowe.

2. CEL I ZAKRES PRACY

Poszukiwanie nowych metod syntezy oraz projektowanie długołańcuchowych arylopipezyn jako nowych ligandów receptorów serotoninowych od lat są przedmiotem zainteresowania Zespołu Chemii i Technologii Leków w Katedrze Chemii i Technologii Organicznej Politechniki Krakowskiej, której członkiem jest autor niniejszego autorefatu.^{76,78,79} W toku wieloletnich badań, udało się opracować wydajne metody syntezy olanzapiny, trazodonu oraz arypiprazolu – przykładowych leków stosowanych w leczeniu zaburzeń umysłowych. Możliwym było wyeliminowanie klasycznego ogrzewania (nawet do 24 godzin) substratów z udziałem dużych ilości toksycznych rozpuszczalników, przy zastosowaniu katalizy przeniesienia międzyfazowego a dzięki zastosowaniu promieniowania mikrofalowego, udało się skrócić czas syntezy do kilku minut. Niewątpliwym atutem tej metody jest zredukowanie ilości rozpuszczalników lub całkowite ich wyeliminowanie, otrzymując jednocześnie produkt końcowy z wysoką czystością i wydajnością.^{28,30} Z racji wysokiego potencjału, metodę tę postanowiono zaadoptować również do syntezy związków będących jeszcze w fazie badań klinicznych m.in. ipsapironu.

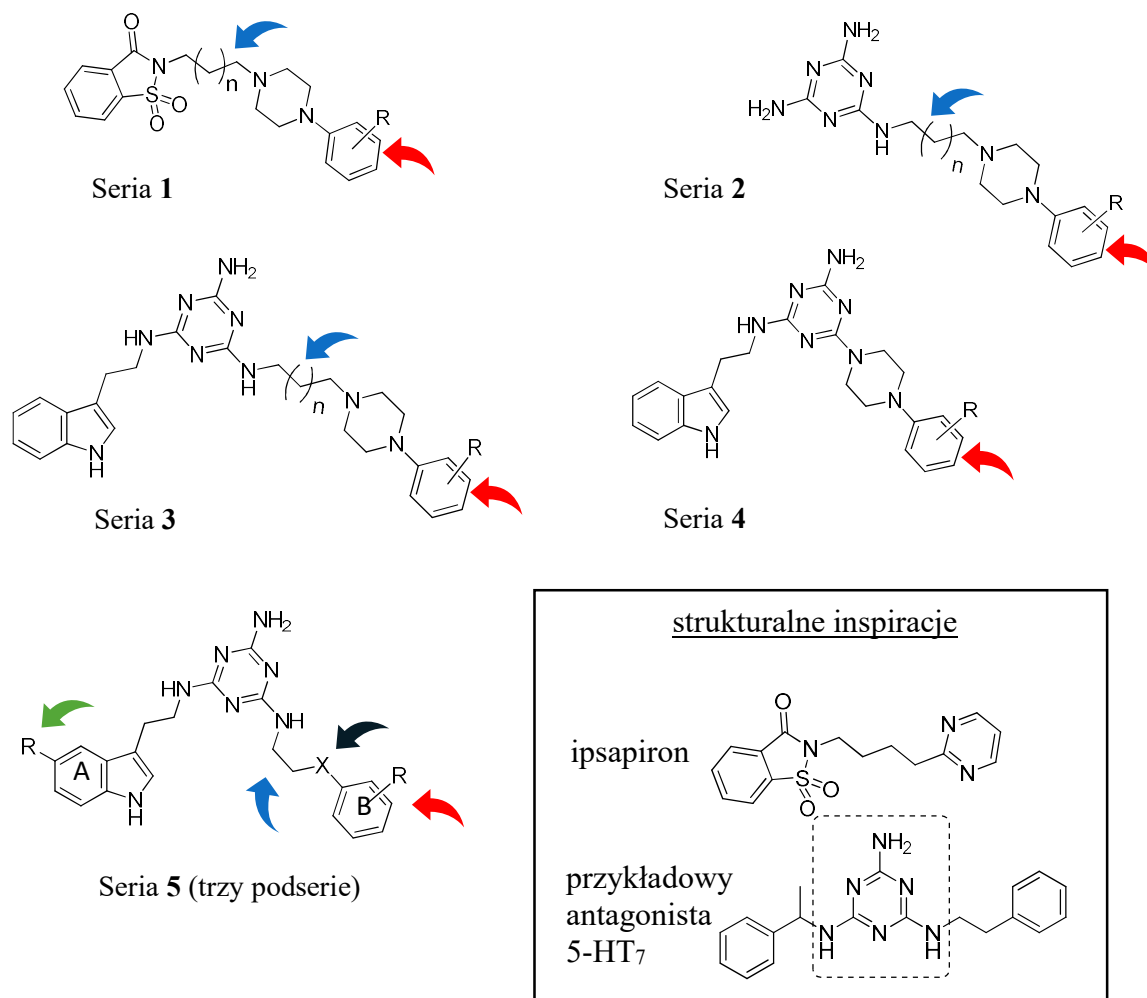
Ipsapiron, należy do rodziny długołańcuchowych arylopipezyn z grupy azapironów. Jest częściowym agonistą receptora 5-HT_{1A} ($K_i = 6 \text{ nM}$)¹¹⁷, wykazuje działanie przeciwdepresyjne i przeciwłękowe wciąż pozostając na etapie badań naukowych.¹¹⁸ W kontekście syntezy, ipsapiron otrzymywany jest zazwyczaj na drodze dwuetapowej reakcji *N*-alkilowania, bądź wieloetapowej syntezy z udziałem toksycznych rozpuszczalników oraz reagentów pomocniczych.¹¹⁹ Każda z tych metod jest mało efektywna, bowiem wydajność otrzymywania ipsapironu nie przekracza 40 %, a także jest mało przyjazna dla środowiska. W literaturze naukowej istnieje kilka analogów ipsapironu różniących się długością łańcucha węglowego oraz arylopipezynami.¹²⁰⁻¹²² Niestety niekompletne dane (powinowactwo do receptorów) nie pozwalają na przeprowadzenie szczegółowej analizy SAR i w konsekwencji wyznaczenia kluczowych elementów strukturalnych odpowiedzialnych za aktywność. Z racji interesujących właściwości biologicznych oraz problematycznego aspektu syntezy, ipsapiron stał się strukturą wyjściową (ang. *hit compound*) do podjęcia dalszych prac nad syntezą samego ipsapironu oraz nowych jego analogów (**Seria 1**).

Opracowanie selektywnych ligandów receptora 5-HT₇ jest trudnym wyzwaniem ze względu na podobieństwo strukturalne w kieszeni wiążącej w obrębie rodziny receptorów 5-HT, a w szczególności do receptora 5-HT_{1A}. Nawiązując do poprzednich paragrafów,

istnieje wiele ligandów wykazujących mieszane powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇, a często również do innych receptorów. 2-amino-1,3,5-triazyna wydaje się być interesującym, słabo przebadanym motywem charakterystycznym dla selektywnych ligandów receptora 5-HT₇.⁹⁹ Mając to na uwadze, postanowiono wykorzystać ten fakt by opracować hybrydowe związki zawierające motyw triazyny jak również arylopiiperazyny połączone ze sobą łańcuchem węglowym (**Seria 2**). W dalszej kolejności rozbudowywano układ triazyny o tryptaminę (**Seria 3**) skracając i następnie usuwając łącznik węglowy (**Seria 4**) oraz finalnie otwierając mostek etylowy arylopiiperazyny (**Seria 5**, składająca się z trzech podserii). Celem tych modyfikacji było zwiększenie powinowactwa względem receptora 5-HT₇ kosztem wyeliminowania powinowactwa do receptora 5-HT_{1A}. Z uwagi na to, że opisana metoda otrzymywania znanych ligandów 5-HT₇ z grupy aminotriazyn⁹⁹, które były inspiracją do prowadzenia niniejszych badań, przebiega w warunkach klasycznych, w niniejszej pracy postanowiono nacisk na syntezę nowych związków wyłącznie na drodze reakcji bezrozpuszczalnikowej wspieranej polem promieniowania mikrofalowego.

Podsumowując, celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, synteza oraz ocena właściwości biologicznych pochodnych ipsapironu wykazujących powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} i następnie modyfikacja struktury tak aby otrzymać ligandy o zwiększonym powinowactwie tylko do receptora 5-HT₇ (**Rysunek 13**). Badania kolejno obejmowały następujące zadania:

- Dobór najlepszych parametrów syntezy w tym udział różnych zasad, rozpuszczalników, mocy mikrofal oraz czasu prowadzenia syntezy dla modelowej reakcji otrzymywania ipsapironu
- Synteza, oczyszczanie oraz charakterystyka spektralna i chromatograficzna zaprojektowanych związków **serii 1-5**
- Badanie powinowactwa otrzymanych związków w poszerzonym panelu receptorowym (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ oraz D₂)
- Testy funkcjonalne
- Wyczerpująca analiza SAR
- Dywagacje na gruncie modelowania molekularnego (dokowanie oraz dynamika molekularna) w celu wyznaczenia kluczowych elementów strukturalnych warunkujących aktywność biologiczną
- Ocena ADME-Tox *in vitro* oraz *in vivo* dla wybranych związków

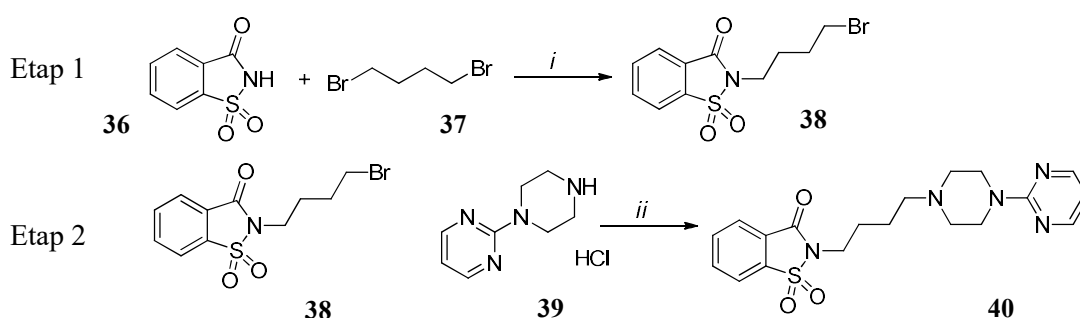


Rysunek 13. Ligandy serii 1 – 5, z zaznaczeniem miejsca modyfikacji strukturalnych. Kolory: **niebieski** – ocena długości łącznika węglowego, **czzerwony** – zbadanie wpływu rodzaju i miejsca podstawnika w pierścieniu aromatycznym, **czarny** – zbadanie wpływu heteroatomu, **zielony** – zbadanie wpływu podstawników EWG oraz EDG.

3. METODOLOGIA BADAŃ

3.1. Synteza Ipsapironu¹

Ipsapiron (**40**) otrzymywano na drodze dwuetapowej reakcji *N*-alkilowania. Pierwszy etap stanowił reakcję *N*-alkilowania sacharyny (**36**) 1,4-dibromobutanem (**37**), a następnie powstały produkt **38** poddawany był reakcji z chlorowodorkiem 1-(2-pirymidylo)piperazyny (**39**) zgodnie ze Schematem 5.



Schemat 5. Dwuetapowa ścieżka otrzymywania ipsapironu. *i* – K₂CO₃, TBAB, DMF, MW P = 300 W; *ii* – zasada, TBAB, DMF lub ACN, MW P = 300 W

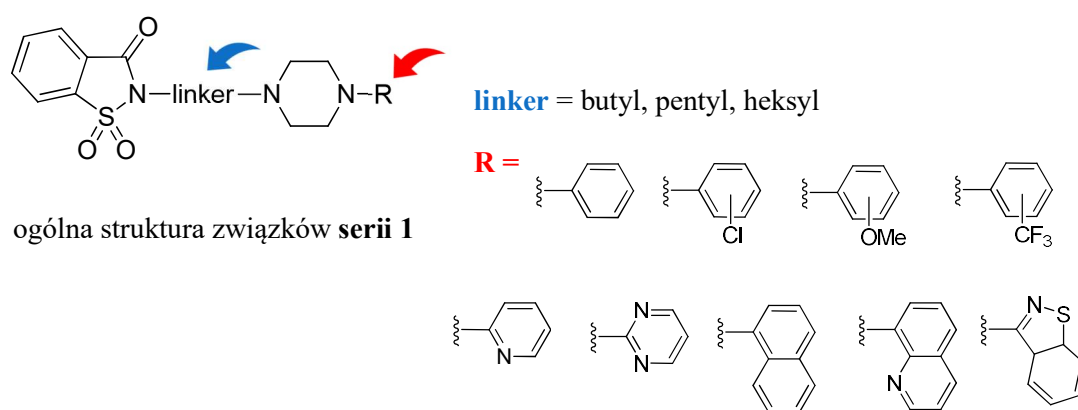
W przypadku etapu pierwszego, badano wpływ ilości użytego węglanu potasu oraz zmiennej ilości 1,4-dibromobutanu (**37**) na wydajność otrzymywania 1-bromobutylosacharyny (**38**). Z kolei w przypadku etapu drugiego ocenie poddano wpływ różnych zasad np. K₂CO₃, NaOH, Ca(OH)₂, trietyloaminy oraz różnych rozpuszczalników-czynników ułatwiających transfer energii mikrofalowej np. dimetyloformamidu lub acetonitrylu na wydajność otrzymywania ipsapironu (**40**). Ponadto, ipsapiron (**40**) otrzymywano również metodą „*one-pot*”, polegającą najpierw na reakcji sacharyny (**36**) z 1,4-dibromobutanem (**37**) a następnie bezpośrednim dodaniu chlorowodoru 1-(2-pirydylo)piperazyny (**39**) bez wydzielania produktu pośredniego **38**. Podobnie jak poprzednio, oceniano wpływ różnych zasad oraz czasu prowadzenia syntezy na wydajność otrzymywanego ipsapironu (**40**).

¹ badania własne doktoranta

3.2. Projektowanie i synteza długłańcuchowych arylopiiperazyn (*Seria 1*)¹

Projektowanie nowych pochodnych ipsapironu (**40**) rozpoczęto od: (1) przeglądu piśmiennictwa znanych pochodnych ipsapironu (**40**) (cztery znane ligandy)¹²⁰⁻¹²², (2) wyznaczenia biokonformacji ipsapironu (**40**) przy użyciu metod komputerowych celem oceny jego ułożenia w kieszeni wiążącej receptora 5-HT_{1A}. Większość prac naukowych związanych z oceną aktywności biologicznej LCAPs dotyczy ligandów z linkerem etylowym, propylowym lub butylowym. Ligandy z łańcuchem pentylovym lub heksylowym są praktycznie nie znane aczkolwiek wykazano, że są również aktywne⁷⁶ podobnie jak te z krótszym łańcuchem. Mając to na uwadze, zaprojektowano 1 serię związków (**Rysunek 14**) cechujących się: różną długością łańcucha węglowego, różnymi podstawnikami arylopiiperazyny. Dla aktywnych związków została wyznaczona funkcja wewnętrzna określająca agonizm lub antagonizm badanych ligandów. Oprócz tego, korzystając z metody dokowania, zaproponowano biokonformację ligandów a także porównano je z biokonformacją ipsapironu (**40**).

Synteza związków **serii 1** przebiegała w sposób analogiczny do dwuetapowej reakcji otrzymywania ipsapironu (**40**) (**Schemat 5**). W pierwszym etapie otrzymano odpowiednią 1-bromoalkilosacharynę, a następnie poddano ją reakcji z właściwą arylopiiperazyną. Reakcje prowadzono w warunkach bezrozpuszczalnikowych, wspieranych polem promieniowania mikrofalowego (P = 50 W) z udziałem węglanu potasu, TBAB oraz 5 % mas. DMF lub ACN jako czynnika ułatwiającego transfer energii mikrofalowej w ciągu 2,5 min.

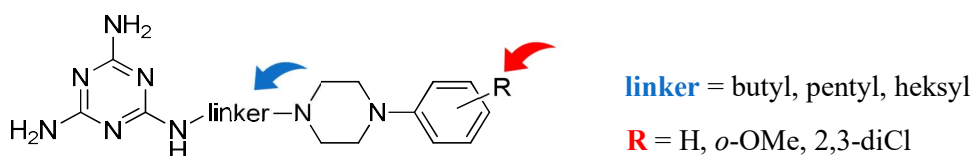


Rysunek 14. Modyfikacje strukturalne zaplanowane w ramach syntezy **serii 1** związków

¹ badania własne doktoranta

3.3. Projektowanie i synteza hybrydowych arylopiiperazyn i aminotriazyn (*Seria 2*)¹

Seria 2, zakłada syntezę związków będących hybrydą arylopiiperazyny oraz aminotriazyny połączonych ze sobą łącznikiem węglowym o różnej długości (**Rysunek 15**). Na podstawie analizy SAR związków **serii 1**, w przypadku motywu arylopiiperazyny do dalszych prac wyłonione zostały: 1-fenylopiiperazyna, 1-(2-metoksyfenylo)-piiperazyna oraz 1-(2,3-dichlorofenylo)-piiperazyna. Dwie ostatnie arylopiiperazyny stanowią dość często powtarzający się motyw, który można spotkać m.in. w lekach jak np. NAN-190 lub arypiprazol. Rdzeń aminotriazyny został z kolei wybrany z powodu wysokiej selektywności i aktywności pochodnych aminotriazyn wykazujących powinowactwo do receptora 5-HT₇. Dla tej serii zaproponowany został również łańcuch węglowy o długości od czterech do sześciu atomów węgla jak dla poprzedniej serii związków. Wyznaczono biokonformację za pomocą metod modelowania molekularnego.

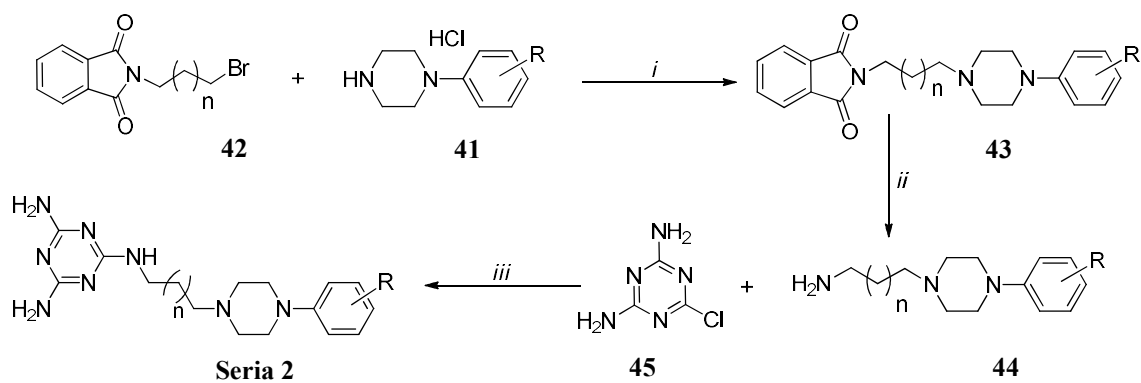


ogólna struktura związków **serii 2**

Rysunek 15. Modyfikacje strukturalne zaplanowane w ramach syntezy **serii 2** związków

Synteza zaprojektowanych związków (**Schemat 6**) polegała w pierwszym etapie na *N*-alkilowaniu odpowiednich arylopiiperazyn **41** wcześniej przygotowanym 1-bromoalkiloftalimidem (**42**). Reakcje prowadzone były w sposób klasyczny we wrzącym acetornitrylu a środowisko zasadowe stanowił natomiast węglan potasu. Otrzymane produkty **43** poddawano je reakcji z metyloaminą uzyskując pierwszorzędowe aminy **44**. Aminy te z kolei reagowały z komercyjnie dostępną 2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazyną (**45**) otrzymując właściwe związki finalne **serii 2**. Związki te zostały otrzymane na drodze reakcji bezrozpuszczalnikowych, wspieranych polem promieniowania mikrofalowego w sposób analogiczny do związków **serii 1**.

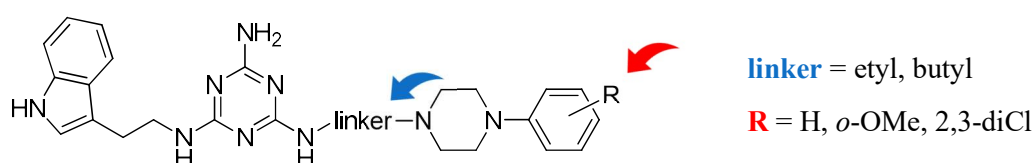
¹ badania własne doktoranta



Schemat 6. Ścieżka syntetyczna otrzymywania związków **serii 2**. *i* – K_2CO_3 , ACN, refluks, 12 godz; *ii* – $MeNH_2$, NaOH, 5-12 godz; *iii* – K_2CO_3 , TBAB, DMF, MW P = 50 W, 2.5 min.
 R = H, *o*-OMe, 2,3-diCl; *n* = 2-4

3.4. Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn (**Seria 3**)¹

Serotonina z chemicznego punktu widzenia jest pochodną tryptaminy i z tego powodu w **serii 3** postanowiono rozbudować wybrane związki z **serii 2** o tryptaminę (**Rysunek 16**). W przypadku tych cząsteczek, łańcuch węglowy ograniczono do dwóch (tylko jeden ligand o R = H) oraz czterech atomów węgla. Dłuższy łącznik alkilowy powodował pogorszenie się parametrów ADME (np. lipofilowość) *in silico*. Dla wybranych związków zbadana została funkcja wewnętrzna względem receptora 5-HT₇ oraz wyznaczono wybrane parametry ADME-Tox *in vitro*. Aktywność biologiczna została wytłumaczona korzystając z metod modelowania molekularnego.



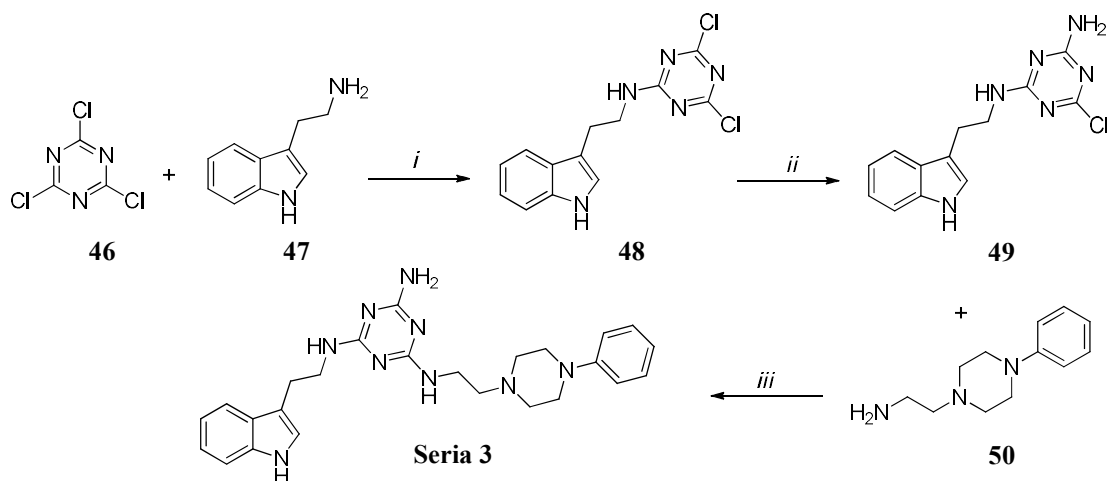
ogólna struktura związków **serii 3**

Rysunek 16. Modyfikacje strukturalne zaplanowane w ramach syntezy **serii 3** związków

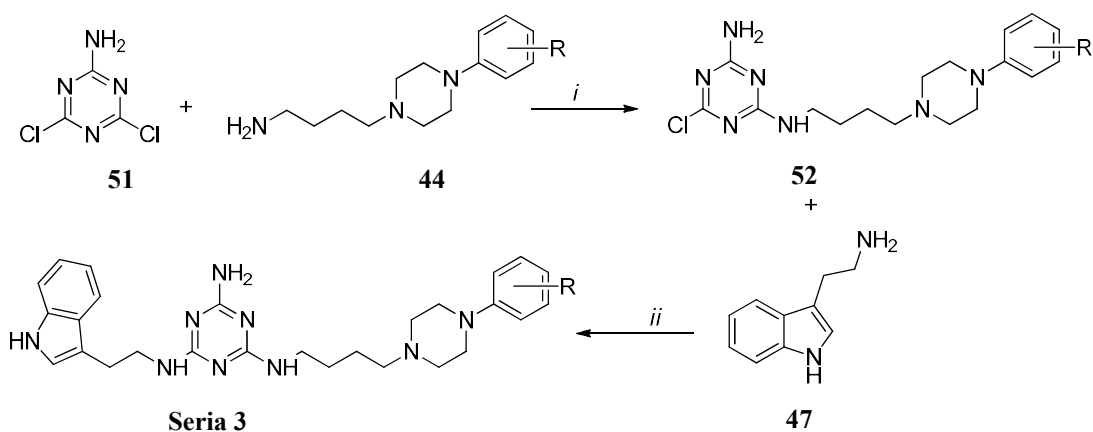
Synteza tej serii związków rozpoczyna się otrzymaniem substratu wyjściowego koniecznego do dalszych przekształceń **49**. Chlorek cyjanurowy (**46**) poddawano reakcji

¹ badania własne doktoranta

z tryptaminą (**47**) w 0°C w ciągu 30 minut. Następnie produkt przejściowy **48** reagował z wodą amoniakalną w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin. Tak otrzymany substrat wyjściowy **49** poddawano kondensacji z komercyjnie dostępną 2-(4-fenylpiperazyn-1-yl)-etanoaminą (**50**) (**Schemat 7**) lub aminami pierwszorzędowymi otrzymanymi w wyniku syntezy Gabriela (analogicznie do **serii 2**). Reakcję prowadzono w warunkach mikrofalowych analogicznie jak w przypadku syntezy związków końcowych **serii 2**. Nieoczekiwanym okazało się, że aminy z łańcuchem butylowym nie ulegały zaplanowanej reakcji. Dla tych związków, wprowadzono zatem alternatywną ścieżkę syntetyczną (**Schemat 8**). W pierwszej kolejności zsyntezowano 4,6-dichloro-1,3,5-triazyno-2-aminę (**51**), a następnie otrzymany produkt reagowano z aminami pierwszorzędowymi **44** we wrzącym 1,4-dioksanie. Wydzielone produkty **52** poddawano reakcji kondensacji z tryptaminą (**47**) stosując syntezę bezropuszczalnikową wspieraną polem promieniowania mikrofalowego (analogicznie jak poprzednie serie).



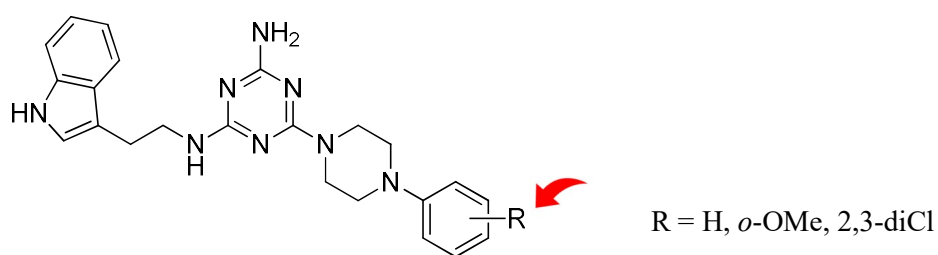
Schemat 7. Ścieżka syntetyczna otrzymywania związków **serii 3**. *i* – DIPEA, THF, 0°C, 30 min, *ii* – NH₃ aq., THF, *iii* – K₂CO₃, TBAB, DMF, MW P = 50 W, 2,5 min.



Schemat 8. Alternatywna ścieżka syntetyczna otrzymywania związków **serii 3**. *i* – DIPEA, 1,4-dioksan, refluks, 20 min, *ii* – K₂CO₃, TBAB, DMF, MW P = 50 W, 2,5 min. R = H, *o*-OMe, 2,3-diCl.

3.5. Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn (**Seria 4**)¹

Interesujące wyniki SAR związane ze zwiększonym powinowactwem do receptora 5-HT₇ stały się inspiracją do zaprojektowania kolejnej, małej serii związków, gdzie wyeliminowany został całkowicie łącznik węglowy, łącząc sztywniej arylopiperazynę z rdzeniem triazyny (**Rysunek 17**).



ogólna struktura związków **serii 4**

Rysunek 17. Modyfikacje strukturalne zaplanowane w ramach syntezy **serii 4** związków

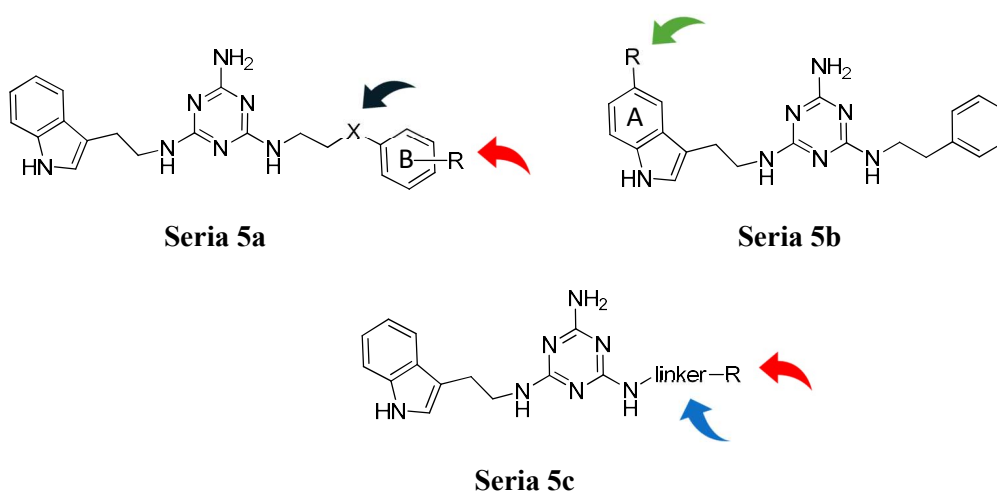
Synteza tej grupy związków polegała na przeprowadzeniu jednoetapowej reakcji pomiędzy substratem wyjściowym **49** a komercyjną arylopiperazyną **41**. Reakcje prowadzono

¹ badania własne doktoranta

w warunkach bezrozpuszczalnikowych analogicznie jak do poprzednich serii związków finalnych.

3.6. Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn (*Seria 5*)¹

Ze względu na brak aktywności oraz usztywnienie układu cząsteczek **serii 4**, projektując **serię 5** postanowiono otworzyć mostek etylowy piperazyny i sprawdzić jak ta modyfikacja wpłynie na powinowactwo i selektywność do receptora 5-HT₇. Obiecujące wyniki stały się bazą do poszerzenia badań projektując sporą bibliotekę związków, gdzie podstawiano pierścienie A oraz B (**Rysunek 13**) różnymi podstawnikami oraz oceniono długość łącznika alkilowego i znaczenie obecności samego pierścienia aromatycznego (pierścien B). Obiecujące związki zostały przebadane pod kątem wybranych parametrów ADME-Tox *in vitro* oraz *in vivo*. Aktywność została również wytłumaczona na podstawie metod modelowania molekularnego z zakresu dokowania oraz dynamiki molekularnej. W celu ułatwienia czytelnikowi analizy niniejszego autoreferatu, **seria 5** została podzielona na trzy mniejsze podserie odpowiednio **5a** – **5c** zgodnie z rysunkiem poniżej.

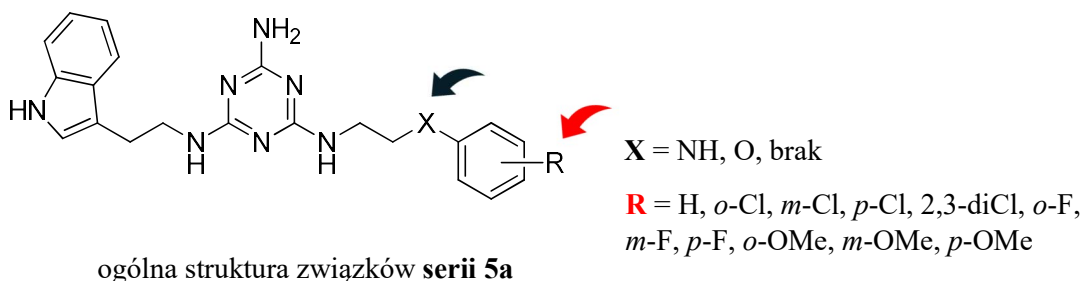


3.6.1. Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn – *Seria 5a*¹

Jak już zostało to wspomniane powyżej, **seria 5a** (**Rysunek 18**) zakłada syntezę związków z łącznikiem etylowym pomiędzy dwoma azotami w miejscu piperazyny, co można traktować jako „otwarty mostek etylowy piperazyny”. Zabieg ten, miał na celu

¹ badania własne doktoranta

zmniejszenie sztywności układu. W badaniach, oceniony został również wpływ heteroatomu (X) lub też jego braku pomiędzy łącznikiem etylowym a pierścieniem aromatycznym na selektywność i powinowactwo do receptora 5-HT₇ z uwzględnieniem także podstawienia samego pierścienia aromatycznego (zbadano pozycję *orto*, *meta* oraz *para*).

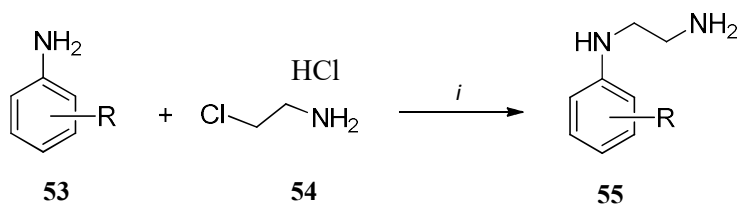


Rysunek 18. Modyfikacje strukturalne zaplanowane w ramach syntezy **serii 5a** związków.

Otrzymywanie związków z **serii 5a** zakłada w pierwszej kolejności syntezę amin aromatycznych **55** oraz **61** (poza komercyjnie dostępnymi pochodnymi fenyloetyloaminy):

Pochodne aminoetyloaniliny:

Pochodne aminoetyloaniliny **55** otrzymywane były w jednoetapowej reakcji pomiędzy odpowiednio podstawioną aniliną **53** a chlorowodorkiem 2-chloroetyloaminy (**54**). Reakcja przebiegała we wrzącym toluenie przez 20 godzin (**Schemat 9**).

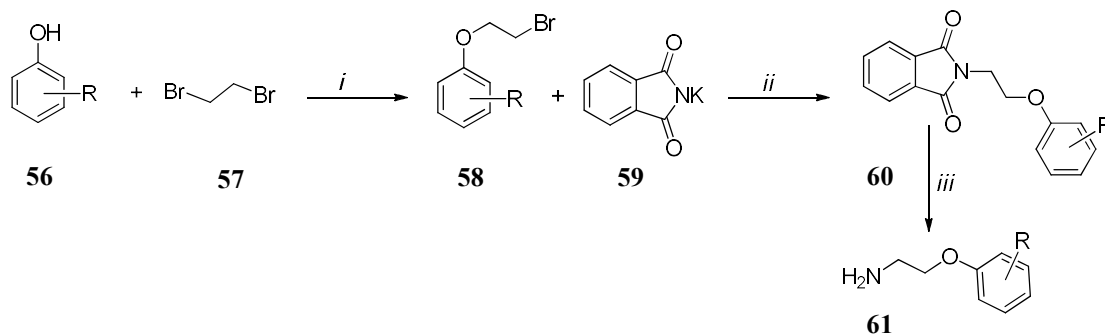


Schemat 9. Ścieżka syntetyczna otrzymywania aminoetyloanilin. *i* – toluen, refluks, 20 godzin. R = H, *o*-Cl, *m*-Cl, *p*-Cl, *o*-F, *m*-F, *p*-F, *o*-OMe, *m*-OMe, *p*-OMe.

Pochodne aminoetylofenolu:

Podstawione fenole **56** poddawane były reakcji *O*-alkilowania za pomocą 1,2-dibromoetanu (**57**) w warunkach zasadowych przez 20 godzin. Otrzymane produkty **58** ogrzewane były z ftalimidkiem potasu (**59**) otrzymując ftalimidopochodne produkty przejściowe **60**, które

następnie poddawano reakcji hydrolizy prowadzące do otrzymania pierwszorzędowych amin aromatycznych **61** (Schemat 10).



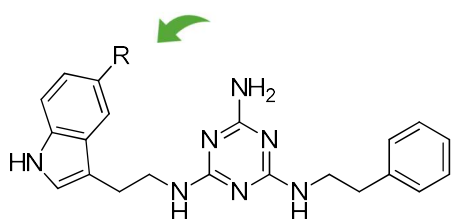
Schemat 10. Ścieżka syntetyczna otrzymywania aminoetylofenoli. *i* – NaOH, H₂O, temp.pok, 20 godzin; *ii* – KI, DMF, 50 °C; *iii* – MeNH₂, NaOH, temp.pok. R = H, *o*-OMe, 2,3-diCl.

Synteza finalnych związków polegała na opisaney wcześniej reakcji bezropuszczalnikowej wspieranej polem promieniowania mikrofalowego pomiędzy substratem **49**, a odpowiednimi aminami (**55** i **61**) oraz komercyjnie dostępnymi fenyletyloaminy o podstawniku R = H, *o*-OMe, 2,3-diCl w sposób analogiczny do poprzednich związków.

3.6.2. Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn – Seria **5b**¹

Dane literaturowe dowodzą, że modyfikacja pierścienia indolu (a w szczególności pozycja C-5) może poprawić powinowactwo do receptora 5-HT₇.^{89,110} Z racji tego, że w strukturze badanych związków znajduje się motyw tryptaminy, postanowiono zaprojektować związki zawierające podstawniki EWG oraz EDG w pozycji C-5 indolu celem oceny ich wpływu na powinowactwo do receptora 5-HT₇ (**Rysunek 19**).

¹ badania własne doktoranta

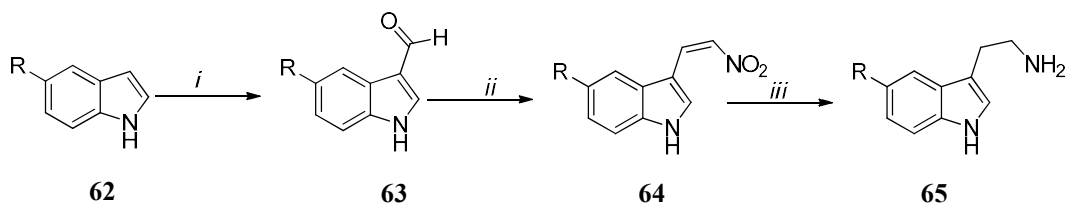


R = CN, F, Cl, Br, OMe,

ogólna struktura związków serii **5b**

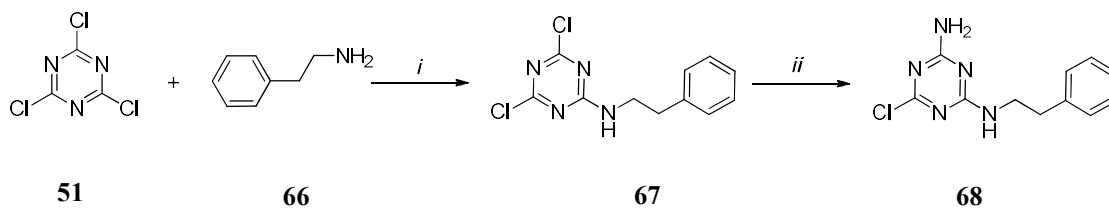
Rysunek 19. Modyfikacje strukturalne zaplanowane w ramach syntezy **serii 5b** związków.

Synteza finalnych związków polegała w pierwszej kolejności na syntezie substratów (**Schemat 11** i **Schemat 12**). Podstawione C-5 tryptaminy **65** jako pierwsze z substratów zostały otrzymane w wyniku następującego ciągu reakcji chemicznych: (i) formylowania Vilsmeier-Haack z komercyjnie dostępnych C-5 podstawionych indoli **62**, (ii) otrzymane produkty **63** poddano reakcji kondensacji Henry'ego otrzymując nitrowinyłowe pochodne **64**, które następnie (iii) zredukowano otrzymując podstawione tryptaminy **65**. W przypadku podstawnika CN, prowadzona była dwustopniowa redukcja, celem ochrony grupy nitrylowej.



Schemat 11. Ścieżka syntetyczna otrzymywania pochodnych tryptamin. *i* – DMF, POCl₃, 0°C później temp. pok, 1 godzina; *ii* – octan amonu, nitrometan, MW, 20 min; *iii* – LiAlH₄, THF, temp. pok, 3 dni, (w przypadku gdy R = CN, najpierw NaBH₄, DMF/MeOH, temp. pok, później Zn, HCl, refluks), R = CN, F, Br, Cl, OMe, Me.

Synteza drugiego substratu składa się z dwóch etapów reakcji. W pierwszym etapie chlorek cyjnanowy (**51**) poddawany był kondensacji z fenyletyloaminą (**66**) w obecności DIPEA w THF w temperaturze 0°C. W drugim etapie, powstały produkt przejściowy **67** reagował z wodą amoniakalną gdzie uzyskano półprodukt **68**.

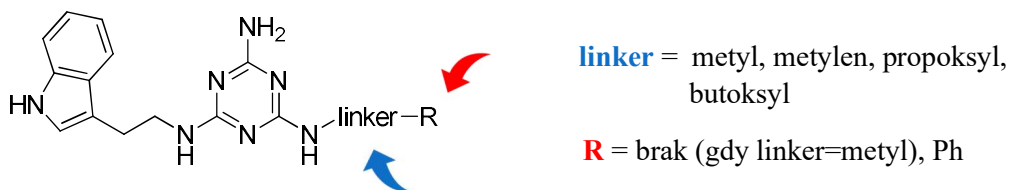


Schemat 12. Ścieżka syntetyczna otrzymywania drugiego substratu związków **serii 5b**. *i* – DIPEA, THF, 0°C, 2 godz.; *ii* woda amoniakalna, temp. pok, 5 godz.

Związki finalne **serii 5b** syntezowane były w takich samych warunkach jak dla poprzednich serii opisanych powyżej gdzie podstawione tryptaminy **65** alkilowane były z substratem **68** w warunkach bezrozpuszczalnikowych wpieranych polem promieniowania mikrofalowego.

3.6.3. Projektowanie i synteza pochodnych aminotriazyn – **Seria 5c**¹

Badając nowe pochodne aminotriazyn bez motywu piperazyny, zrodziło kolejne pytanie – jak bardzo kluczową rolę pełni pierścień aromatyczny połączony z rdzeniem triazyny za pomocą linkera oraz jaka powinna być długość takiego linkera. Aby odpowiedzieć na to pytanie, zaprojektowana została kolejna **seria 5c** zawierająca związki o różnej długości łańcucha węglowego oraz te bez podstawnika aromatycznego (**Rysunek 20**).



ogólna struktura związków **serii 5c**

Rysunek 20. Modyfikacje strukturalne zaplanowane w ramach syntezy **serii 5c** związków.

Związki **serii 5c** syntezowano w warunkach bezrozpuszczalnikowych wpieranych polem promieniowania mikrofalowego w sposób analogiczny do poprzednich, poddając reakcji substrat wyjściowy **49** z odpowiednio komercyjnymi aminami.

¹ badania własne doktoranta

Wszystkie związki końcowe dla **serii 1–5** zostały scharakteryzowane pod względem czystości metodami chromatograficznymi TLC i HPLC/MS. Struktura związków została potwierdzona za pomocą ^1H NMR i ^{13}C NMR.

3.7. Testy radioreceptorowe²

Wszystkie otrzymane związki końcowe zostały przebadane pod kątem powinowactwa ich do receptora 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇. W celu określenia selektywności badanych związków, przeprowadzono dodatkowe testy określające ich powinowactwo do konkurencyjnych receptorów w tym 5-HT_{2A}, 5-HT₆ oraz D₂.¹¹⁰ Testy przeprowadza się przez inkubację badanych związków (w różnym zakresie stężeń) z komórkami lub hydrolizatami zawierającymi znane stężenie znakowanego radioliganda. Stopień wyparcia radioliganda przez badany związek jest następnie przeliczany na wartość IC₅₀ a następnie stała powinowactwa K_i przeliczana jest za pomocą równania Cheng-Prusoffa.¹²³ W eksperymencie zastosowano następujące radioligandy: [^3H]-8-OH-DPAT dla 5-HT_{1A}R, [^3H]-ketanseryna dla 5-HT_{2A}R, [^3H]-LSD dla 5-HT₆R, [^3H]-5-CT dla 5-HT₇R i [^3H]-raklopryd dla D₂R.

3.8. Testy funkcjonalne³

Dla wybranych związków z **serii 1, 3 i 5** zostały przeprowadzone testy mające na celu wyznaczenia potencjału agonistycznego (aktywacja receptora) lub agonistycznego (hamowanie receptora) poprzez monitorowanie aktywności cykazy adenylowej (cAMP) przy użyciu kriokonserwowanych komórek linii HEK293 z ekspresją receptora 5-HT₇ lub CHO-K1 z ekspresją receptora 5-HT_{1A}.¹¹⁰

3.9. *Badania ADME-Tox*⁴

Dla wybranych związków z **serii 1, 3 i 5** zostały przeprowadzone testy^{107,124,125} oceniające stabilność metaboliczną (z zaproponowaniem głównych metabolitów), aktywność izoenzymamów CYP3A4, CYP2D6 oraz CYP2C9. Hepatotoksyczność wyznaczano na linii komórkowej hepG2 w teście MTT, natomiast kardiotoxyczność oraz ekotoksyczność *in vivo* zbadano przy użyciu modelu zwierzęcego ryby Zebrafish (*Danio rerio*).¹²⁶

Ocena stabilności metabolicznej wyznaczana była poprzez dwu-godziną inkubację badanych związków z MLM. Po tym czasie próbki poddane były analizie LCMS, gdzie oceniano zawartość procentową związku oryginalnego w stosunku do ilość utworzonych metabolitów.^{107,124,125}

Potencjalne interakcje lek-lek oceniane były za pomocą luminescencyjnego testu CYP3A4, CYP2D6 i CYP2C9 P450-Glo™ (Promega) w zakresie stężeń badanego związku 0.1µM do 25µM. Jako związki referencyjne stosowano w przypadku CYP3A4 – ketokonazol, CYP2D6 – chinidynę, CYP2C9 – sulfafenazol.^{107,124,125}

3.10. *Modelowanie molekularne*¹

Aktywność związków z **serii 1–5** została wytłumaczona za pomocą metod komputerowego wspomaganie projektowania leków w tym dokowania (Maestro, Schrodinger), dynamiki molekularnej (Maestro, Schrodinger) oraz 3D-QSAR (Flare/Forge, Cresset). W przypadku dokowania, brak struktury krystalicznej receptora 5-HT_{1A} (model ukazał się dopiero w 2021 roku) oraz 5-HT₇ (model ukazał się dopiero w 2022 roku), wymusił, że prace rozpoczęto od zbudowania właściwych modeli homologicznych a następnie poddania ich walidacji (procedura została opisana w publikacji **D02 i D05** gdzie budowę homologów zrealizowano za pośrednictwem serwera SWISS-MODEL).¹²⁷ Dokując badane związki do odpowiednich modeli homologicznych, wyznaczone zostały interakcje biorące udział w tworzeniu kompleksu ligand-receptor. Ponadto, wyznaczona została możliwa biokonformacja oraz ułożenie ligandów w kieszeni wiążącej receptorów. Co więcej,

^{2,3} badania wykonywane we współpracy z Instytutem Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie przeprowadzone przez dr Grzegorza Satałę

⁴ badania wykonywane we współpracy z: (1) Katedrą Technologii i Biotechnologii Środków Lecznicych CM-UJ przeprowadzone przez dr hab. Gniewomira Latacza oraz (2) Katedra i Zakład Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie przeprowadzone przez dr n. med. Annę Boguszewską-Czubarę

¹ badania własne doktoranta

korzystając z oprogramowania Flare/Forge (Cresset) w sposób wizualny ustalono jak dane modyfikacje chemiczne mają wpływ na aktywność związków biorące również pod uwagę elektrostatykę, hydrofobowość lub budowę przestrzenną liganda lub miejsce wiążące w receptorze – 3D-QSAR.

4. OPIS UZYSKANÓW WYNIKÓW

Wyniki badań zostały opisane w cyklu sześciu publikacji (**D01-D06**), które zostały zamieszczone na końcu niniejszej rozprawy doktorskiej. Celem ułatwienia czytelnikowi analizy wyników i korelując je z cyklem publikacji, poniżej stabelaryzowano numerację bibliotekę związków końcowych autoreferatu w odniesieniu do numeracji w danej publikacji.

Numer w rozprawie	Numer w publikacji	Numer publikacji	Numer w rozprawie	Numer w publikacji	Numer publikacji	Numer w rozprawie	Numer w publikacji	Numer publikacji
69	5a	D02	93	17	D03	117	28	D04
70	5b	D02	94	18	D03	118	10	D05
71	5c	D02	95	19	D03	119	11	D05
72	5d	D02	96	21	D03	120	12	D05
73	5e	D02	97	10	D04	121	27	D04
74	5f	D02	98	11	D04	122	14	D05
75	6a	D02	99	12	D04	123	15	D05
76	6b	D02	100	13	D04	124	5d	D06
77	6c	D02	101	14	D04	125	30	D04
78	6d	D02	102	15	D04	126	31	D04
79	6e	D02	103	16	D04	127	5c	D06
80	6f	D02	104	17	D04	128	33	D04
81	7a	D02	105	18	D04	129	34	D04
82	7b	D02	106	20	D04	130	1	D05
83	7c	D02	107	21	D04	131	2	D05
84	7d	D02	108	22	D04	132	3	D05
85	7e	D02	109	19	D04	133	4	D05
86	7f	D02	110	23	D04	134	5	D05
87	5	D03	111	24	D04	135	6	D05
88	7	D03	112	25	D04	136	5a	D06
89	10	D03	113	26	D04	137	5b	D06
90	12	D03	114	7	D05	138	5e	D06
91	13	D03	115	8	D05	139	5f	D06
92	14	D03	116	9	D05			

4.1. Opracowana metoda syntezy Ipsapironu (publikacja **D01**)

Ipsapiron (**40**), po raz pierwszy otrzymany został na drodze dwuetapowej reakcji prowadzonej w warunkach bezrozpuszczalnikowych wspieranych polem promieniowania (Schemat 5). W pierwszym etapie oceniany był wpływ nadmiaru czynnika alkilującego oraz węgla potasu na wydajność powstającego produktu pośredniego (**38**) (Tabela 3). TBAB jako katalizator przeniesienia między fazowego stosowany był w ilości 0,1 eq i stanowił element niezmienny podczas przeprowadzanych badań w tym etapie. Prace rozpoczęto od stałej ilości węgla potasu (3 eq.) oraz zmiennej ilości 1,4-dibromobutanu (w zakresie od 1,1 do 3,0 eq.), zachowując stałą moc mikrofal $P = 300$ W.

Tabela 3. Wpływ ilości 1,4-dibromobutanu (**37**) oraz zasady na wydajność reakcji *N*-alkilowania sacharyny

nr reakcji	1,4-dibromobutan (eq)	K ₂ CO ₃ (eq)	wydajność (%)
1	1.1	3	45
2	2.0	3	67
3	2.5	3	79
4	3.0	3	80
5	2.5	1.0	70
6	2.5	1.5	94
7	2.5	2.0	85
8	2.5	2.5	80

Okazało się, że optymalna ilość czynnika alkilującego wynosi 2,5 eq. lub 3,0 eq, jednak z racji utrudnionego procesu usuwania nadmiaru czynnika alkilującego, do dalszych prac uznano 2,5 eq jako optymalna ilość, która pozwalała na uzyskanie produktu pośredniego **38** z wydajnością 79 % w ciągu 50 sekund (numer reakcji 3). Kolejnym krokiem dla etapu pierwszego było ustalenie ilości węgla potasu. Wykonano kilka prób, gdzie okazało się, że optymalna ilość K₂CO₃ wynosi 1,5 eq (nr reakcji 6).

Mając ustalone parametry, podjęto próby syntezy ipsapironu (**40**), który stanowił etap drugi procesu (Schemat 5). Dla tego etapu oceniany był wpływ różnych zasad (K₂CO₃, Ca(OH)₂, NaOH, Et₃N), rozpuszczalników – czynników przenoszących energię mikrofalową (DMF, ACN) oraz czasu prowadzonej syntezy na wydajność otrzymywania ipsapironu (**40**)

(Tabela 4). TBAB jako katalizator przeniesienia między fazowego stosowany był w ilości 0,1 eq i stanowił element niezmienny podczas przeprowadzanych badań, podobnie jak moc promieniowania mikrofalowego, która wynosiła 300 W.

Tabela 4. Wpływ różnych zasad oraz rozpuszczalników (DMF/CH₃CN) na wydajność otrzymywania ipsapironu (**40**)

nr reakcji	zasada (3 eq)	DMF (% mas.) ^a	ACN (% mas.) ^b	wydajność (%) ^c
9	K ₂ CO ₃	1	-	85
10	K ₂ CO ₃	-	1	0
11	K ₂ CO ₃	-	-	43
12	Et ₃ N	1	-	83
13	Et ₃ N	-	1	0
14	Et ₃ N	-	-	35
15	NaOH	1	-	0
16	NaOH	-	1	0
17	Ca(OH) ₂	1	-	75
18	Ca(OH) ₂	-	1	0

^aczas reakcji do 2 min.

^bczas reakcji do 10 min.

^cchlorowodorek wykrystalizowany z acetonu

Poddając ocenie wpływu różnych zasad, ogrzewając mieszaninę reakcyjną w ciągu 1 – 2 minut, zaobserwowano, że słabe zasady nieorganiczne (K₂CO₃/Ca(OH)₂) oraz jedna zasada organiczna (Et₃N) są wystarczająco dobre by uzyskać ipsapiron (**40**) z wysoką wydajnością (≥ 75 %), jednak ze względu na toksyczność trietyloaminy nie zaleca się jej użycie. Stosując mocną zasadę tj. wodorotlenek sodu lub wodorotlenek potasu, nie uzyskiwano ipsapironu (**40**), obserwowano natomiast tworzenie się polarnych produktów ubocznych. Z kolei używając wodorotlenek wapnia co prawda udało uzyskać się ipsapiron (**40**) z dobrą wydajnością (75 %), to jednak proces ogrzewania należało prowadzić przez 2 minuty. Najlepszą zasadą ponownie okazał się być węglan potasu. Oceniając czynnik przenoszącego energię mikrofalową użyty w ilości 1 % mas. Okazało się, że stosując jedynie DMF udało otrzymać się ipsapiron (**40**) z wydajnością 85 %. Bez względu na rodzaj zastosowanej zasady, prowadząc syntezę w obecności ACN nie uzyskiwano pożądanego

produktu nawet mimo wydłużenia czasu ogrzewania do 10 minut. Interesującym natomiast okazał się fakt, że istnieje możliwość całkowitego wyeliminowania DMF. W takich warunkach ipsapiron (**40**) był uzyskiwany z nieco niższą wydajnością – 43 %.

Bardzo dobre wyniki badań dały podstawę do próby otrzymania ipsapironu (**40**) metodą *one-pot*, polegającej na bezpośredniej reakcji pomiędzy sacharyną (**36**) a 1,4-dibromobutanem (**37**) (czas ogrzewania 50 sekund). Następnie, bez wydzielania produktu pośredni **38** reagował z właściwą arylopiperazyną (**39**) w ciągu kolejnych 120 sekund (Tabela 5). Początkowo w reakcji stosowano 3 eq węglanu potasu oraz 1 % mas. DMF. W tych warunkach ipsapiron (**40**) otrzymywany był z wydajnością 52 %. Zmieniając zasadę na wodorotlenek wapnia uzyskano nieco wyższą wydajność bo 60 %. Najwyższą wydajność (67 %) w przypadku tej metody uzyskano gdy trietyloamina została zastosowana jako środowisko zasadowe oraz wydłużając jednocześnie czas syntezy do 10 minut.

Tabela 5. Wpływ różnych zasad na wydajność ipsapironu (**40**) metodą „*one-pot*”

nr reakcji	zasada (3 eq)	wydajność (%) ^a
19	K ₂ CO ₃ ^b	52
20	Et ₃ N ^c	67
21	Ca(OH) ₂ ^b	60

^achlorowodorek wykryszalizonany z acetonu

^bczas reakcji do 2 min.

^cczas reakcji do 10 min.

Po przeprowadzeniu badań, uznano trzykrotny nadmiar molowy węglanu potasu, katalityczną ilość DMF (1% mas.) oraz TBAB (0,1eq.) jako najlepsze reagenty pomocnicze dzięki którym można otrzymać ipsapiron (**40**) z bardzo dobrą wydajnością. Mając na względzie uzyskane wyniki, dalsze prace syntetyczne prowadzono głównie z udziałem tych warunków.

4.2. Charakterystyka związków w *serii 1* (publikacja nr **D02** i **D03**)

Dwie kolejne publikacje z prezentowanego cyklu dotyczą opisu serii pochodnych ipsapironu (**40**), gdzie badany był wpływ długości łańcucha węglowego oraz wpływ różnych arylopiperazyn na powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}/5-HT₇ oraz konkurencyjnych receptorów. Wszystkie związki zostały przebadane w testach radioizotopowych a dla

wybranych wyznaczona została funkcja wewnętrzna oceniająca ich potencjał agonistyczny lub antagonistyczny. Ipsapiron (**40**) oraz jego aktywne pochodne zostały przebadane pod kątem wyznaczenia biokonformacji oraz oddziaływań jakie tworzą z receptorem.

Tabela 6. Wyniki stałej powinowactwa K_i dla badanych związków **serii 1** oraz wyznaczenie funkcji wewnętrznej dla wybranych związków

Nr	linker	R	K_i [nM]					Funkcja
			5-HT_{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT₇	D ₂	
69	butyl	Ar	3	474	4664	631	249	-
70	butyl	<i>o</i> -OMe-Ar	8	382	161	96	7	-
71	butyl	2,3-diCl-Ar	1	2580	2662	372	26	-
72	butyl	<i>p</i> -Cl-Ar	78	318	2729	536	571	-
73*	butyl	<i>m</i> -CF ₃ -Ar	100	2250	-	-	113	-
74	butyl	2-pirymidynylo	15	14980	16800	1406	1224	-
75	pentyl	Ar	16	313	1836	148	165	-
76	pentyl	<i>o</i> -OMe-Ar	3	584	1991	125	20	-
77	pentyl	2,3-diCl-Ar	29	126	197	149	17	-
78	pentyl	<i>p</i> -Cl-Ar	101	139	703	191	254	-
79	pentyl	<i>m</i> -CF ₃ -Ar	21	162	1354	35	34	-
80	pentyl	2-pirymidynylo	6	6306	7097	2673	954	-
81	heksyl	Ar	20	321	971	192	48	-
82	heksyl	<i>o</i> -OMe-Ar	10	764	779	105	1	-
83	heksyl	2,3-diCl-Ar	5	209	920	119	132	-
84	heksyl	<i>p</i> -Cl-Ar	84	299	72	487	28	-
85	heksyl	<i>m</i> -CF ₃ -Ar	25	167	52	58	7	agonista ¹
86	heksyl	2-pirymidynylo	56	3530	5708	2515	3274	-
87	heksyl	<i>o</i> -Cl-Ar	26	266	459	120	45	-
88	heksyl	<i>m</i> -Cl-Ar	21	361	372	233	39	-
89	heksyl	3,4-diCl-Ar	54	283	132	258	105	-
90	heksyl	<i>m</i> -OMe-Ar	19	342	921	305	113	-

91	heksyl	<i>p</i> -OMe-Ar	327	na	na	na	950	-
92	heksyl	<i>o</i> -CF ₃ -Ar	156	922	1272	195	27	-
93	heksyl	1-naftylo	9	91	157	20	8	antagonista ¹
94	heksyl	8-chinolino	4	205	1716	21	15	antagonista ¹
95	heksyl	2-pirydylo	13	1290	2352	552	239	-
96	heksyl	3-benzoizotiazol	23	23	58	45	9	-

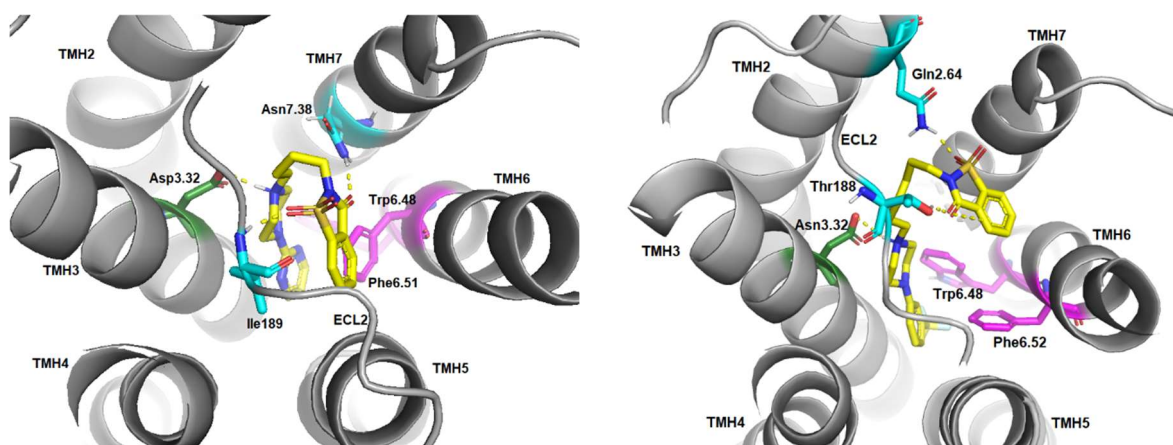
* – opisane w [122]; ¹ – w odniesieniu do receptora 5-HT_{1A}

Analizując wyniki badań radioizotopowych (**Tabela 6**), wyraźnie widać, że niemal wszystkie związki charakteryzują się wysokim lub umiarkowanym powinowactwem do receptora 5-HT_{1A} ($K_i < 100$ nM) zachowując wysoką selektywność wobec receptora 5-HT₇, gdzie tylko cztery ligandów wykazało wysokie powinowactwo ($K_i < 50$ nM). Ligandy natomiast wykazywały zwiększone powinowactwo do receptora dopaminowego D₂. Analizując wpływ różnej długości łącznika węglowego w obrębie całej grupy związków zawierających różne arylopiperyliny (**69 – 74**), (**75 – 80**), (**81 – 86**) stwierdzić można, że linker nie ma znacznego wpływu na powinowactwo związków do receptora 5-HT_{1A}. W przypadku receptora 5-HT₇ wydaje się, że wydłużenie może pozytywnie wpływać na powinowactwo, jednak zmiany te nie są na tyle znaczące aby badane związki osiągnęły powinowactwo K_i poniżej 100 nM (wyjątek tutaj stanowi ligand **(70)** oraz grupa ligandów z podstawnikiem *m*-CF₃ w strukturze arylopiperyliny). Dla ligandów z niepodstawionym pierścieniem arylowym, wraz z wydłużeniem łańcucha obserwowano delikatny spadek powinowactwa do receptora 5-HT_{1A} (podczas gdy odnosząc się do D₂R, efekt był zupełnie odwrotny). W przypadku receptora 5-HT₇ wydłużenie łącznika węglowego o jedną grupę metylenową powodowało wzrost powinowactwa (ligand **(75)**), natomiast kolejne wydłużenie (ligand **(81)**) nie miało już znacznego wpływu na wzrost powinowactwa. Ciekawymi związkami okazały się być ligandy **(93)**, **(94)** oraz **(96)**. Cząsteczki te wykazywały powinowactwo do co najmniej trzech różnych receptorów, natomiast ligand **(96)** uznać można za multifunkcyjny ze względu na jego aktywność do wszystkich badanych receptorów. Ligandy **(85)**, **(93)** i **(94)** zostały przebadane pod kątem potencjalnego agonizmowi lub antagonizmowi w stosunku do receptora 5-HT_{1A}. Z racji tego, że badane związki strukturalnie przypominają agonistę ipsapiron, można by się spodziewać, że będą agonistami. Jak się okazuje, jedynie związek **(85)** powodował spadek produkcji cAMP, wobec czego przypisano mu właściwości agonisty. Ligandy **(93)** i **(94)** wykazywały potencjał antagonistyczny.

Nasuwa się zatem wniosek, że za wpływ powinowactwa do receptora 5-HT_{1A} bardziej odpowiada typ użytej arylopiperyliny aniżeli długość linkera węglowego. Dłuższy linker węglowy z kolei otwiera szersze możliwości publikacyjne ze względu na fakt, że ligandy o heksylowym łańcuchu (i dłuższym) nie są znane w literaturze naukowej.

Synteza powyższych ligandów przebiegała dość sprawnie. Oba etapy prowadzone były w warunkach bezrozpuszczalnikowych wspieranych polem promieniowania mikrofalowego (P = 50 W). W przypadku ligandów z łańcuchem heksylowym, dla pierwszego etapu stosowano DMF jako czynnik przenoszący energię mikrofalową, w przypadku zaś krótszych łączników stosowano DMF lub ACN. Związki finalne (etap drugi) z łańcuchem heksylowym otrzymywane były w obecności ACN, podczas gdy ich analogi z krótszym łańcuchem otrzymywane były w obecności DMF lub ACN. Wszystkie ligandy otrzymywano w ciągu 2 – 2,5 minut z wydajnością powyżej 50 % w przeliczeniu na postać chlorowodoru.

Wyniki modelowania molekularnego (dokowanie) wykazały, że ipsapiron (**40**) oraz jego nowo zsyntezowane aktywne analogi przyjmują konformację w receptorze 5-HT_{1A} typową jak większość azapironowych ligandów z rodziny LCAPs wykazujących aktywność do tego receptora (**Rysunek 21**).^{128,129}



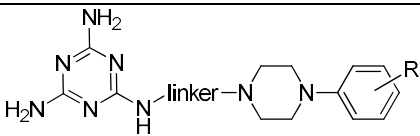
Rysunek 21. Ułożenie ipsapironu (**40**) (po lewej) oraz przykładowego, aktywnego analogu ipsapironu (**85**) (po prawej) w kieszeni wiążącej homologue receptora 5-HT_{1A}. Kluczowe aminokwasy zaznaczono kolorem, **cyjanowy** – imidowa kieszeń wiążąca, **fioletowy** – kieszeń wiążąca dla arylopiperyliny, **zielony** – mostek solny z resztą asparaginową Asp3.32.

Badane związki wykazują zgiętą konformację, gdzie arylopiperazyna skierowana jest do wnętrza receptora podczas gdy terminalny układ sacharyny skierowany jest ku zewnętrznej części receptora zajmując kieszeń wiążącą w obrębie TMh 3, TMh6 i TMh7. Pierścień arylowy oddziałuje za pomocą wiązań typu π - π np. z F6.51, F6.52 lub W6.48, podczas gdy grupa karbonylowa sacharyny tworzy wiązania wodorowe np. z N7.38, Q2.64 lub I189. Obserwowano tworzenie się również kluczowego¹³⁰ oddziaływania w postaci mostka solnego pomiędzy dodatnio sprotonowanym atomem azotu piperazyny a D3.32.

4.3. Charakterystyka związków w *serii 2* (publikacja **D04**)

Analizując wyniki badań (**Tabela 7**) zauważyć można, że podobnie jak w przypadku pochodnych sacharyny, również i ligandy *serii 2* wykazują wysokie powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} ($K_i < 100$ nM). Podobny efekt zauważalny również był w przypadku aktywności do receptora D₂. Niestety w przypadku powinowactwa do receptora 5-HT₇ nie uzyskano zadowalających rezultatów co więcej, wartości stałej powinowactwa K_i są wyższe niż w przypadku związków *serii 1*. Analizując wpływ długości łącznika węglowego na powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} zauważyć można, że jego skrócenie powoduje wzrost aktywności ligandów, poza ligandami z niepodstawioną arylopiperazyną (**97**), (**100**), (**103**) gdzie efekt był zupełnie odwrotny. Ligandy (**97**), (**100**), (**103**) cechowały się również najslabszym powinowactwem do niemal wszystkich badanych związków. Odwrotny efekt był z kolei obserwowany w przypadku wszystkich ligandów z podstawnikiem 2,3-diCl. Związki te wykazywały najniższą wartość K_i uzyskując bardzo wysokie powinowactwo do aż trzech badanych receptorów ($K_i < 25$ nM). Najslabsze powinowactwo dla wszystkich związków notowane było dla receptora 5-HT₆.

Tabela 7. Wyniki stałej powinowactwa K_i dla badanych związków **serii 2**



Nr	linker	R	K_i [nM]					Funkcja
			5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT ₇	D ₂	
97	butyl	H	56	2619	17350	1500	366	-
98	butyl	<i>o</i> -OMe	48	9581	10870	1447	46	-
99	butyl	2,3-diCl	7	24	136	167	7	-
100	pentyl	H	71	4408	9302	1039	1039	-
101	pentyl	<i>o</i> -OMe	12	6521	6652	947	38	-
102	pentyl	2,3-diCl	5	17	282	343	8	-
103	heksyl	H	82	3265	13650	984	1009	-
104	heksyl	<i>o</i> -OMe	4	1455	7704	713	20	-
105	heksyl	2,3-diCl	4	13	389	193	5	-

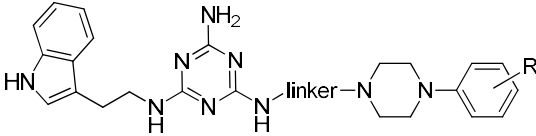
W odniesieniu do syntezy, związki zostały otrzymane na drodze kilkietapowej reakcji. W pierwszym etapie otrzymywano ftalimidoalkiloarylopiiperazyny **43** z wydajnością 83 – 93 %, które w kolejnym etapie przekształcono do pierwszorzędowych amin alifatycznych z wydajnością pomiędzy 90 % a 100 %. Ostatni etap stanowił już właściwą reakcję pomiędzy aminami **44** a komercyjnie dostępnym chlorkiem (**45**). Proces prowadzony był w warunkach bezrozpuszczalnikowych wspierany polem promieniowania mikrofalowego, korzystając z warunków podobnych jak dla syntezy ipsapironu (**40**), wydłużając czas syntezy do 2,5 minut oraz zwiększając do 5 % mas ilość DMF. Tym sposobem badane ligandy otrzymywane były z wydajnością 61% – 78 %.

W celu próby wyjaśnienia względnie niskiej aktywności przykładowego liganda (**97**), postanowiono zadokować go do modelu homologicznego receptora 5-HT₇ (zbudowanego na matrycy 5-HT_{1B}). Na pozór, ligand dokował się w analogiczny sposób opisany przez Kołaczkowskiego *i współ*¹³¹ jednak dokładniejsza analiza pokazała, że brak jest istotnego oddziaływania wodorowego z np. S5.42 lub Y.74 co może być powodem braku aktywności tego związku względem receptora 5-HT₇.

4.4. Charakterystyka związków w serii 3 (publikacja D04)

Rozbudowa wybranych cząsteczek z serii 2 o fragment tryptaminy spowodowała znaczący wzrost powinowactwa do receptora 5-HT₇ jednak wciąż z zachowaniem wiązalności z receptorem 5-HT_{1A}, oraz D₂ (Tabela 8). Na przykład dla związku (106, $K_i = 8$ nM) zaobserwowaliśmy prawie 190-krotny wzrost aktywności do receptora 5-HT₇ w stosunku do związku (97, $K_i = 1500$ nM). Skrócenie łącznika węglowego do dwóch atomów nie zmieniło powinowactwa do 5-HT₇R – ligandy (106) i (109) cechowały się taką samą wartością stałej powinowactwa K_i . Zabieg ten spowodował jednak zauważalny (prawie 14-krotny) spadek powinowactwa do receptora 5-HT_{1A} i D₂ sugerując, że krótszy łańcuch węglowy niekoniecznie wpływa na wzrost powinowactwa do 5-HT₇R ale wpływa na osłabienie wiązalności do receptora 5-HT_{1A} oraz D₂. W przeciwieństwie do poprzedniej serii związków, cząsteczki zawierające podstawniki z niepodstawioną arylopiperazyną okazały się być znacznie bardziej aktywne w stosunku do 5-HT₇R niż te, które w swojej strukturze je zawierają. Związki (107) i (108) wykazały potencjał antagonistyczny w stosunku do receptora 5-HT₇.

Tabela 8. Wyniki stałej powinowactwa K_i dla badanych związków serii 3

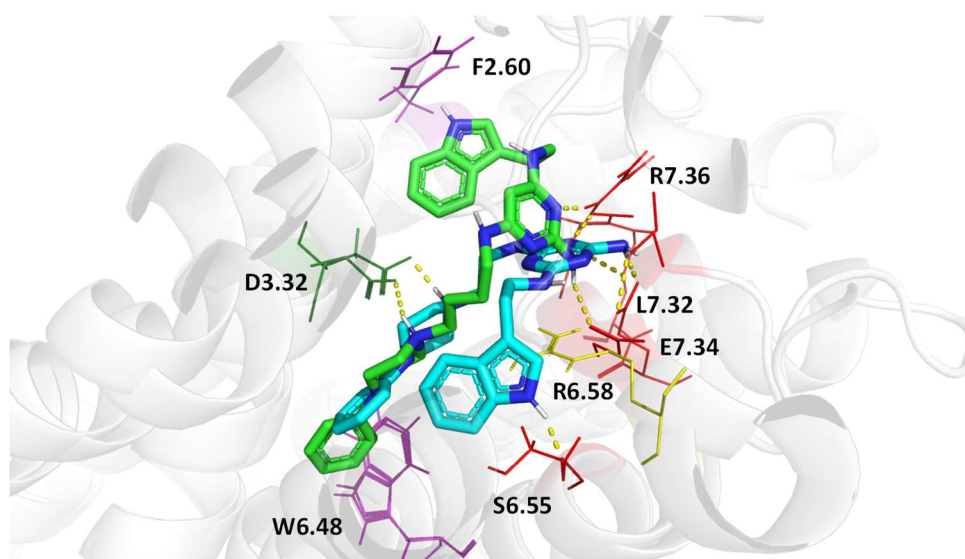
								
			K_i [nM]					
Nr	linker	R	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT ₇	D ₂	Funkcja
106	butyl	H	32	24	506	8	52	-
107	butyl	<i>o</i> -OMe	12	344	1706	156	13	-
108	butyl	2,3-diCl	73	222	109	109	39	antagonista ¹
109	etyl	H	405	67	277	8	418	antagonista ¹

¹ – w odniesieniu do receptora 5-HT₇

Syntezę tej grupy związków zaplanowano poprzez ciąg reakcji opisanych na Schemacie 7. Substrat (49) miał ulegać reakcji z aminami alifatycznymi 44 i 50 z otrzymaniem finalnych związków serii 3. Niestety, jedynie związek (109) udało się otrzymać na tej drodze z wydajnością 82 %. Ligandy z łącznikiem butylowym nie ulegały reakcji ani podczas ogrzewania mikrofalowego ani konwencjonalnego. Opracowano zatem

dla nich alternatywną ścieżkę syntetyczną opisaną na **Schemacie 8**. Reakcja syntezy substratów (**51**) i (**44**) była bardzo efektywna osiągając bowiem wydajność rzędu 85 – 90 % w zaledwie 20 minut. Otrzymane substraty **52** reagowały z tryptaminą (**47**) w warunkach mikrofalowych (analogicznie jak do **serii 2**) tworząc produkty finalne z wydajnością 38 – 64 %.

Mimo przestrzennego powiększenia się molekuł (**106**) i (**109**) w stosunku do związku **97**, to ligandy nadal zajmowały tę samą kieszeń wiążącą receptora 5-HT₇ (**Rysunek 22**). Dla obu związków arylopiperazyna zajmowała wewnętrzną część receptora oddziałując poprzez oddziaływanie typu π - π z F6.52 oraz W6.48. Obserwowano utworzenie kluczowego mostka solnego pomiędzy sprotonowanym azotem piperazyny oraz D3.32. Triazyna oraz indol ulega ugięciu i skierowany jest po zewnętrznej stronie receptora. Rdzeń triazynowy oddziałuje za pomocą wiązań wodorowych z R7.36, E7.34 oraz L7.32, podczas gdy indol tworzy słabe wiązanie typu π - π z F7.60 oraz F3.28. Dodatkowo dla związku (**109**) pojawiło się oddziaływanie stabilizujące typu π – kation pomiędzy pierścieniem indolu a R6.58.

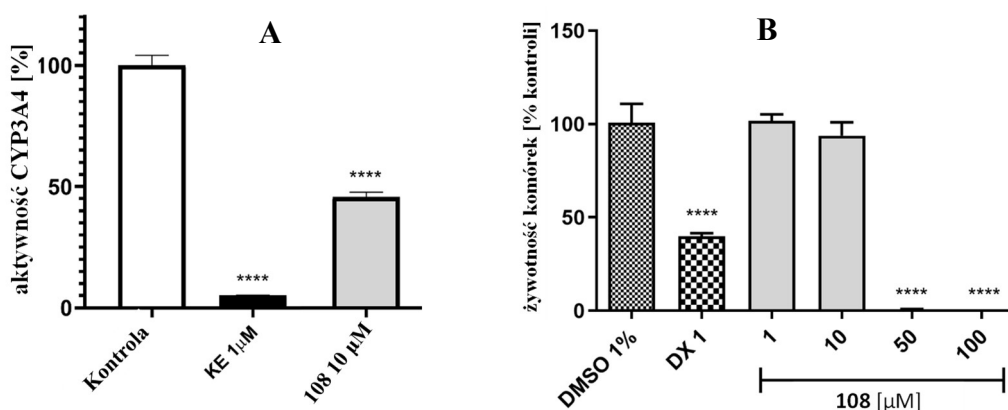


Rysunek 22. Reprezentatywne, aktywne związki **serii 3**: związek (**106**) (jasno zielony), związek (**109**) (cyjanowy). Kluczowe aminokwasy zaznaczono kolorem, **fioletowy** – hydrofobowa kieszeń wiążąca, **zielony** – mostek solny z D3.32, **czerwony** – akceptory wiązanie wodowego, **żółty** – interakcje typu π -kation

Ligand (**108**) dodatkowo oceniono pod kątem parametrów *in vitro* ADME-Tox. Do badań został wybrany związek z obecnymi atomami halogenu w strukturze, gdyż na podstawie danych literaturowych wynika, że takie związki wykazują lepsze parametry ADME.¹³² Na podstawie dwugodzinnej inkubacji z mysimi mikrosomami wątrobowymi ustalono, że niemal 40 % badanego związku nie uległo rozpadowi pod wpływem działania enzymów (**Tabela 9**) i dodatkowo zidentyfikowano 8 potencjalnych produktów rozpadu. Związek wykazuje umiarkowany potencjał do interakcji między lęgowych w porównaniu do ketokonazolu jako leku referencyjnego (**Rysunek 23.A**), natomiast w stężeniu dopiero 50 μM i wyższym wykazywał hepatotoksyczności na linii komórkowej HepG2 (**Rysunek 23.B**).

Tabela 9. Stabilność metaboliczna związku (**108**) wraz z zaproponowanymi ścieżkami metabolicznymi po inkubacji z MLM. Na czerwono zaznaczono główny metabolit.

Związek	(m/z)	% niezmet.	Masa cząsteczkowa metabolitu (m/z)	Szlak metaboliczny
108	554.22	39.95	552.23 (M1)	<i>odwodornienie</i>
			340.23 (M2)	<i>rozkład</i>
			570.30 (M3)	<i>hydroksylacja</i>
			586.25 (M4)	<i>podwójna hydroksylacja</i>
			356.24 (M5)	<i>rozkład i hydroksylacja</i>
			242.28 (M6)	<i>rozkład i odwodornienie</i>
			231.05 (M7)	<i>rozkład</i>
			586.25 (M8)	<i>podwójna hydroksylacja</i>

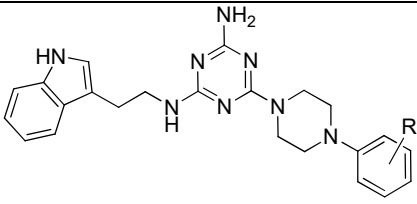


Rysunek 23. A – Wpływ związku (**108**) oraz ketokonazolu na aktywność CYP3A4. B – Wpływ związku (**108**) oraz doksorubicyny na żywotność komórek HepG2

4.5. Charakterystyka związków w serii 4 (publikacja D04)

Wyniki badań powinowactwa związków **serii 4** do 5-HT₇R okazały się być mocno zaskakujące. Całkowite wyeliminowanie łącznika węglowego spowodowało zupełną utratę aktywności do wszystkich badanych receptorów (**Tabela 10**). Prawdopodobnie ma to związek z utratą zdolności tworzenia kluczowego wiązania w postaci mostku solnego przez badane związki, co więcej wyniki dokowania molekularnego pokazały, brak charakterystycznych oddziaływań wodorowych jak np. R7.36 lub E7.34. Niemniej jednak zauważyć można, że podobnie jak dla poprzedniej serii, również i w tym przypadku ligand (**110**) bez podstawionej arylopiperazyny był względnie najaktywniejszy wśród badanej grupy związków.

Tabela 10. Wyniki stałej powinowactwa K_i dla badanych związków **serii 4**



K_i [nM]								
Nr	linker	R	5-HT_{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT₇	D ₂	Funkcja
110	-	H	12960	10640	3220	798	8333	-
111	-	<i>o</i> -OMe	12970	27660	2907	7872	13460	-
112	-	2,3-diCl	6806	7910	1781	1650	3207	-

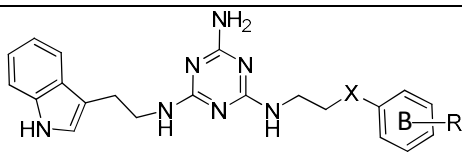
Związki otrzymano w reakcji pomiędzy substratem (**49**) a odpowiednimi, komercyjnie dostępnymi arylopiperazynami, korzystając z metodologii takiej samej jak dla poprzednich związków, otrzymując finalne ligandy z wydajnością 43 – 64%.

4.6. Charakterystyka związków w serii 5a (publikacja nr D04 i D05)

Otworzenie pierścienia piperazyny (ligandy (**113** – **123**)) spowodowało ponowny wzrost powinowactwa ale tylko do receptora 5-HT₇ co świadczy o tym, że przestrzeń pomiędzy rdzeniem triazyny a centrum aromatycznym powinien stanowić giętki łańcuch węglowy (**Tabela 11**). Oprócz otwarcia pierścienia piperazyny oceniano jaki jest wpływ podstawników X oraz R (w różnych pozycjach pierścienia) na powinowactwo do receptora

5-HT₇. Analizując wpływ obecności podstawnika X, najlepsze wyniki otrzymano gdy podstawnik ten był nieobecny – pochodne fenyloetyloaminy (ligandy (127 – 129)). W przypadku gdy X = NH okazuje się, że bez względu na badany podstawnik, położenie *para* pierścienia B jest najbardziej preferowane – ligandy cechują się najniższą wartością stałej powinowactwa ((116) $K_i = 19$ nM, (120) $K_i = 18$ nM, (123) $K_i = 756$ nM)) w obrębie badanej podgrupy. Trwające obecnie prace badawcze pokażą czy taki sam efekt będzie obserwowalny w przypadku gdy X = O lub jego braku. W odniesieniu do podstawnika R, ligandy z fluorem (bioizoster wodoru) były najbardziej aktywne, następnie te z chlorem i najslabiej aktywne ligandy z grupą OMe. Analogicznie jak dla serii 3 i 4, brak podstawników przy pierścieniu fenylowym również ma pozytywny wpływ na wiązalność do receptora 5-HT₇ (ligandy (113), (124), (127)). Wprowadzenie bardziej przestrzennych podstawników jak np. Ome (ligandy (121), (122)) powoduje utratę aktywności. Wszystkie ligandy z serii 5a nie wykazywały powinowactwa do receptora 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆ oraz D₂ wobec tego aktywne związki można uznać jednocześnie za selektywne względem tylko receptora 5-HT₇. Wybrane związki zostały przebadane w testach pomiaru funkcji wewnętrznej, gdzie skutecznie powodowały wzrost produkcji cAMP wobec czego uznane zostały za antagonistów receptora 5-HT₇.

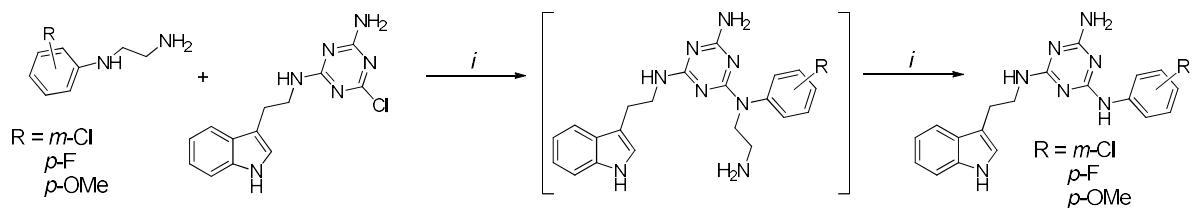
Tabela 11. Wyniki stałej powinowactwa K_i dla badanych związków serii 5a

									
K_i [nM]									
Nr	X	R	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT ₇	D ₂	Funkcja	
113	NH	H	38220	11050	4736	18	8749	antagonista ¹	
114	NH	<i>o</i> -Cl	30830	2125	892	423	4294	-	
115	NH	<i>m</i> -Cl	15630	1800	4022	131	1238	antagonista ^{1*}	
116	NH	<i>p</i> -Cl	16160	2698	641	19	-	antagonista ^{1*}	
117	NH	2,3-diCl	23590	18190	475	1576	5003	-	
118	NH	<i>o</i> -F	36510	1514	982	132	20410	antagonista ^{1*}	
119	NH	<i>m</i> -F	34580	1277	979	24	13760	antagonista ^{1*}	
120	NH	<i>p</i> -F	43250	3570	1630	18	2999	antagonista ^{1*}	
121	NH	<i>o</i> -OMe	37040	14390	2798	5823	3907	-	

122	NH	<i>m</i> -OMe	108900	2449	2790	1036	35960	-
123	NH	<i>p</i> -OMe	-	-	-	756	-	-
124	O	H	8047	1352	530	55	6428	-
125	O	<i>o</i> -OMe	3177	12830	1183	428	4402	-
126	O	2,3-diCl	1188	2637	771	474	4402	-
127	-	H	2836	1388	665	8	11490	antagonista ¹
128	-	<i>o</i> -OMe	10280	2749	585	196	13300	-
129	-	2,3-diCl	706	5967	575	61	3077	antagonista ¹

¹ – w odniesieniu do receptora 5-HT₇; * – dane nieopublikowane

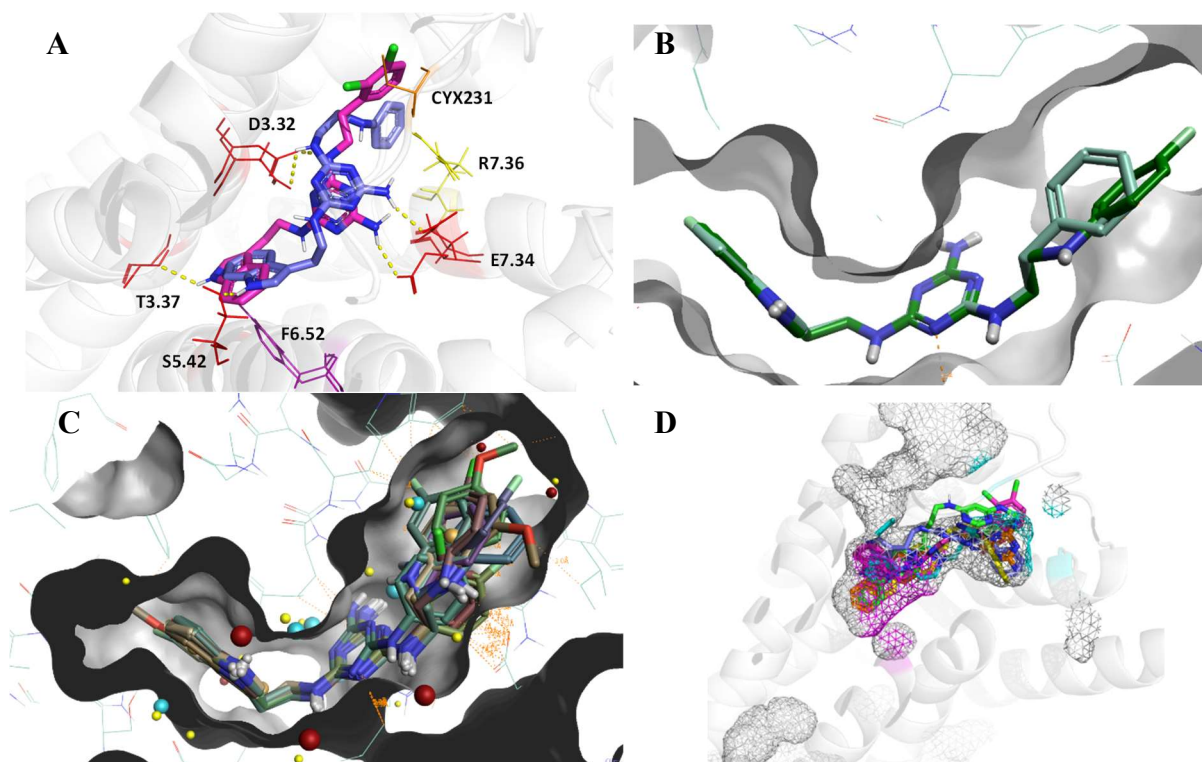
Synteza związków **serii 5b** polegała w pierwszej kolejności na przygotowaniu substratów: pochodnych aminoetyloanilin **55** oraz aminoetylofenoli **61**. Otrzymywanie aminoetyloanilin **55** przebiega w jednym etapie i obejmuje reakcję odpowiednio podstawionej aniliny z chlorowodorkiem 2-chloroetyloaminy. Proces prowadzi się we wrzącym toluenie w ciągu 20 godzin. W tych warunkach właściwe aminy **55** otrzymywane były z wydajnością 62 – 70 %. Synteza aminoetylofenoli **61** była nieco bardziej złożona. W pierwszej kolejności odpowiednio podstawione fenole alkilowane były za pomocą 1,2-dibromoetanu następnie produkty przejściowe reagowały z ftalimidkiem potasu by finalnie ulec hydrolizie pod wpływem metyloaminy i NaOH. Reakcje prowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Groszek *i wspol.*¹³³ Z kolei pochodne fenyletyloaminy użyte były jako komercyjnie dostępne związki. Mając przygotowane wszystkie aminy, poddano je reakcji z substratem (**49**) w warunkach takich samych jak synteza **serii 4** lub **2**. Otrzymywano w ten sposób prawie wszystkie ligandy **serii 5b** z wydajnością wahającą się między 40 % a 77 %. Co zaskakujące, reakcja otrzymywania ligandów (**115**), (**120**), (**123**) w obecności węgla potasu nie zachodziła. Obserwowano natomiast tworzenie się związków bez łącznika etylowego (**Schemat 13**) co zostało potwierdzone za pomocą analizy ¹H NMR, ¹³C NMR oraz HPLC-MS.



Schemat 13. Proponowana ścieżka syntetyczna tworzenia się związków w warunkach *i* – K_2CO_3 , TBAB, DMF, MW, 2.5 min.

Właściwe ligandy zostały jednak otrzymane w analogicznych warunkach jak poprzednie zmieniając jedynie czynnik zasadowy z węglanu potasu na węglan sodu. Zmiana ta spowodowała otrzymanie cząsteczek z wydajnością 60 – 81 %.

Pomimo otwarcia mostka etylowego piperazyny, zadokowane aktywne ligandy ((**113**), (**120**), (**129**)) do modelu homologicznego receptora 5-HT₇ wciąż zajmowały ten sam obszar kieszeni wiążącej jak ligandy **serii 4** lub **3**, jednak obserwowano inne ich ułożenie i charakter oddziaływań pomiędzy kompleksem ligand – receptor (**Rysunek 24.A,D**). Tryptamina skierowana jest teraz ku wnętrzu receptora i zajmuje hydrofobową część kieszeni wiążącej. Pierścień aromatyczny indolu oddziałuje z F6.51 lub F6.52, W6.48 oraz S5.42 poprzez wiązanie typu π - π . Grupa aminowa pierścienia triazyny tworzy silne wiązanie wodorowe z E7.34 natomiast sam pierścień triazyny tworzy dodatkowe wiązania stabilizujące (wodorowe) z I233 oraz wiązanie typu kation – π z R7.36. Co prawda obserwowano tworzenie się wiązania wodorowego z D3.32, niemniej jednak stabilność tej interakcji wydaje się być marginalna (więcej szczegółów opisano przy charakterystyce związków **serii 5c**). W przypadku liganda (**129**) zidentyfikowano dodatkowo wiązanie halogenowe pomiędzy atomem chloru a CYX231.

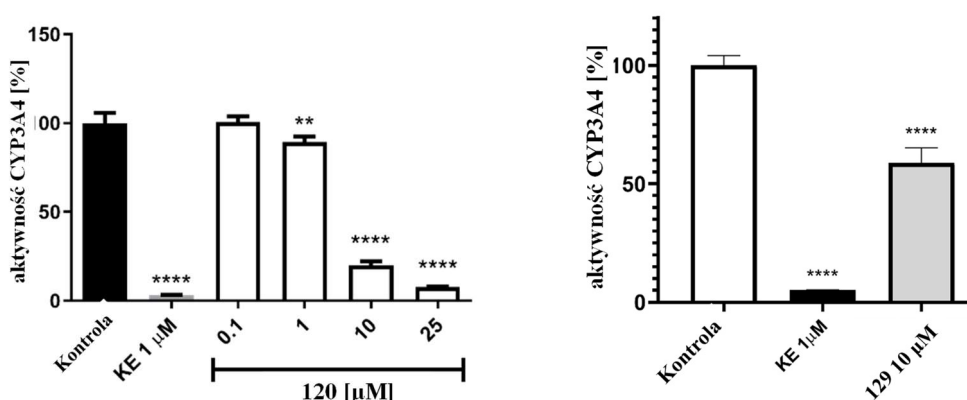


Rysunek 24. Wyniki badań modelowania molekularnego. **A** – reprezentatywne, aktywne związki serii **5b**: związek (**113**) (niebieski), związek (**129**) (fioletowy). Kluczowe aminokwasy zaznaczono kolorem, **fioletowy** – hydrofobowa kieszeń wiążąca, **czerwony** – akceptory wiązanie wordowego, **żółty** – interakcje typu π -kation; **B**, **C** – powierzchnia miejsce wiązania wraz z zaznaczonymi zawadami sterycznymi (pomarańczowe linie) dla związków aktywnych (**116**), (**127**) (**B**) oraz nieaktywnych (**C**). **D** – nałożone pozycje związków aktywnych wraz z lokalizacją ich w receptore.

Korzystając z oprogramowania Flare v5 firmy Cresset możliwym było wytłumaczenie dlaczego pozycja *para* pierścienia B lub też brak podstawnika przy tym pierścieniu (ligandy (**113** – **123**)) ma korzystny wpływ na aktywność do receptora 5-HT₇ (**Rysunek 24.B,C**). Otóż okazuje się, że rozbudowane podstawniki (ligandy (**121** – **123**), $K_i > 756$ nM) nie mieszczą się w kieszeni wiążącej receptora powodując utratę aktywności o czym świadczy zwiększona ilość wykrytych zawad sterycznych (*ang. steric clashes*) pomiędzy ligandem a kieszenią wiążącą. Ligandy (**113**), (**115**), (**116**), (**119**), (**120**) z małymi podstawnikami w pozycji *para* i *meta* takie jak chlor lub fluor lub bez podstawnika, zdecydowanie lepiej dopasowują się do kieszeni wiążącej (mniejsza ilość zawad sterycznych) o czym świadczy ich

wysoka (dla *para*) lub umiarkowana (dla *meta*) aktywność do receptora 5-HT₇. Tłumaczy to zatem fakt, że ligandy w pozycji *para* lub niepodstawione są najbardziej uprzywilejowane i najlepiej dopasowujące się do receptora w obrębie badanej grupy związków.

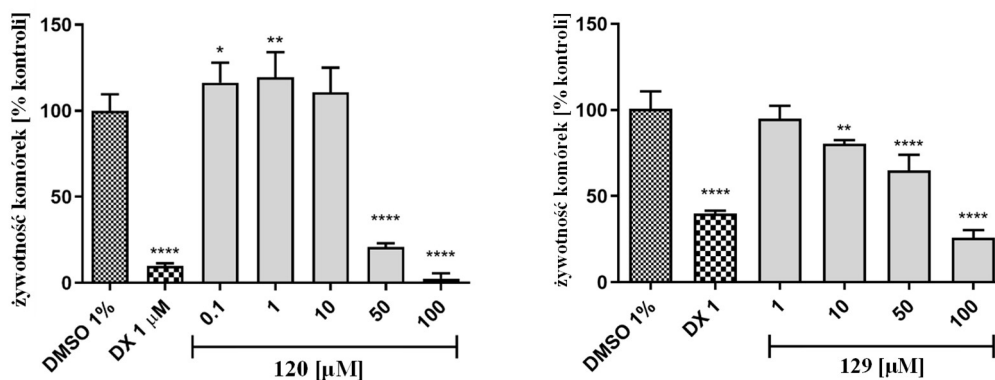
Dwa ligandy (**120**) oraz (**129**) zostały ocenione pod kątem wczesnych parametrów ADME-Tox *in vitro*. Związek (**120**) cechował się umiarkowaną stabilnością metaboliczną (w badanej próbce pozostało ponad 29 % pierwotnego związku w trakcie inkubacji z mysimi mikrosomami wątrobowymi), podczas gdy związek (**129**) charakteryzował się nieco wyższą stabilnością metaboliczną (w badanej próbce pozostało niemal 39 % pierwotnego związku). Oprócz tego, dla obu związków zidentyfikowano siedem potencjalnych produktów rozpadu dla (**120**) oraz cztery dla (**129**) (Tabela 12). Oba związki cechują się słabą możliwością wystąpienia potencjalnych interakcji między lekowych. W przypadku związku (**120**) aktywność izoenzymu CYP3A4 wynosi około 20 % (przy stężeniu 10 μM), podczas gdy dla związku (**129**) wartość ta równa się 58 % przy tym samym stężeniu (Rysunek 25). Hepatotoksyczność na linii komórkowej HepG2 (Rysunek 26) pojawiła się dopiero w stężeniu 50 μM dla związku (**120**) oraz 100 μM dla związku (**129**).



Rysunek 25. Wpływ związku (**120**) (lewy) i (**129**) (prawy) oraz ketokonazolu na aktywność CYP3A4.

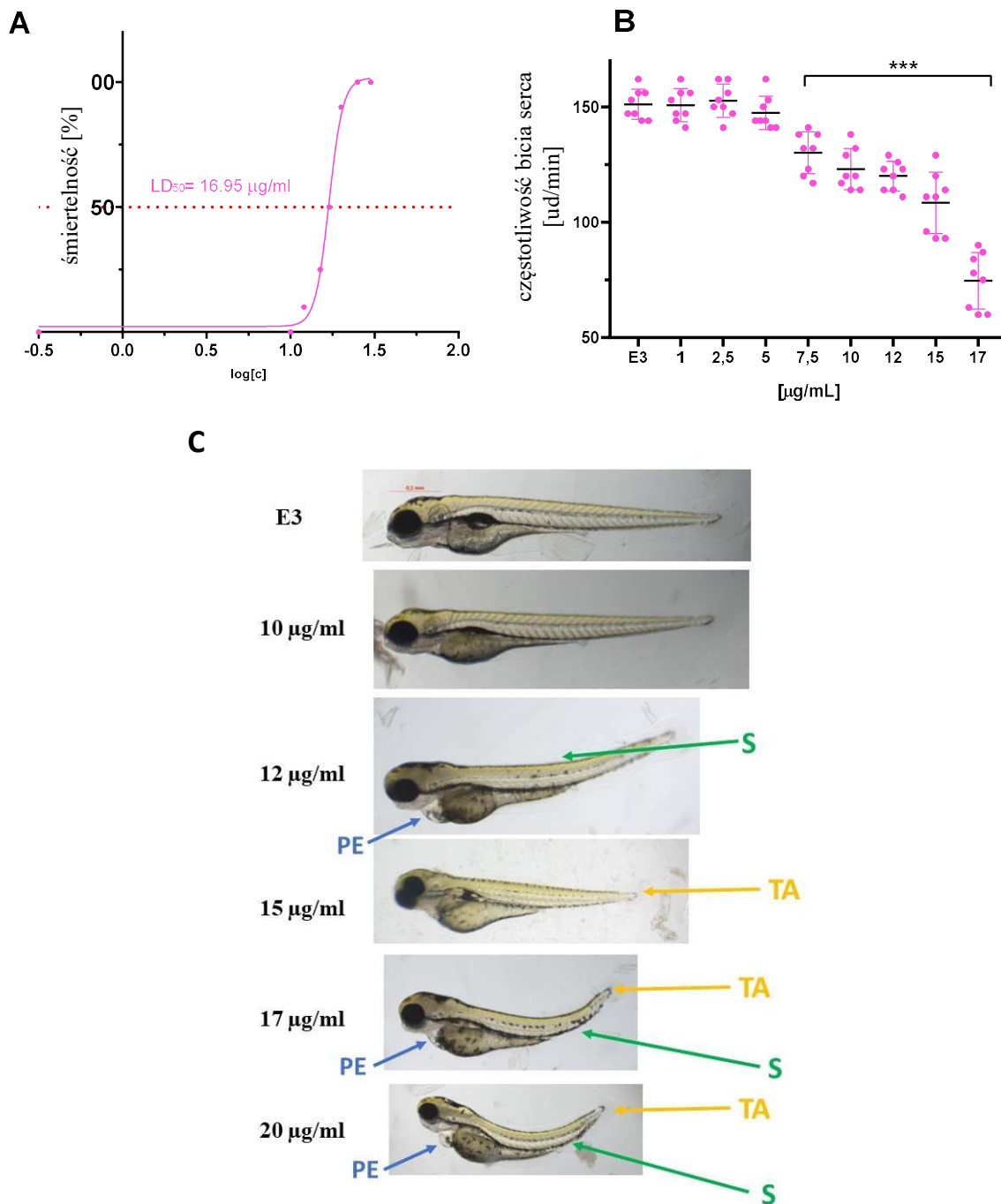
Tabela 12. Stabilność metaboliczna związku (**120**) i (**129**) wraz z zaproponowanymi ścieżkami metabolicznymi po inkubacji z MLM. Na czerwono zaznaczono główny metabolit.

Związek	(m/z)	% niezmet.	Masa cząsteczkowa metabolitu (m/z)	Szlak metaboliczny
120	407.35	29.12	312.25 (M1)	rozkład
			423.30 (M2)	hydroksylacja
			405.29 (M3)	odwodornienie
			405.29 (M4)	odwodornienie
			439.31 (M5)	Podwójna hydroksylacja
			423.30 (M6)	hydroksylacja
			405.02 (M7)	odwodornienie
129	442.17	38.96	474.20 (M1)	podwójna hydroksylacja
			458.25 (M2)	hydroksylacja
			458.19 (M3)	hydroksylacja
			440.18 (M4)	odwodornienie



Rysunek 26. Wpływ związku (**120**) (lewy) i (**129**) (prawy) oraz dokсорubicyny na żywotność komórek HepG2.

Dla związku (**120**) przeprowadzono wstępne testy *in vivo* mające na celu oszacowanie potencjału kardi toksycznego oraz ekotoksycznego (**Rysunek 27**). Badany związek zmniejszał częstotliwość bicia serca o około 15% w stężeniu 7.5 μg/mL, przy czym zauważalne malformacje rozwojowe oraz pojawienie się obrzęku osierdza zaobserwowano przy stężeniu powyżej 12 μg/mL. Stężenie prawie 17 μg/mL dla związku zostało scharakteryzowane jako jego LD₅₀.

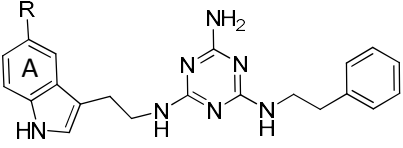


Rysunek 27. Ocena potencjału kardi toksycznego i ekotoksycznego dla związku (120) w modelu zwierzęcym *Danio rerio*. **A** – wyznaczone LD_{50} , **B** – zmiana częstotliwości bicia serca w funkcji zmiennego stężenia związku, **C** – malformacje rozwojowe w funkcji zmiennego stężenia.

4.7. Charakterystyka związków w serii 5b (publikacja D05)

Wprowadzenie podstawników EWG (CN, F, Br, Cl) oraz EDG (OMe, Me) zasadniczo nie wpłynęło pozytywnie na zwiększenie powinowactwa do receptora 5-HT₇ (Tabela 13). Jedynie ligand (131) ($K_i = 8$ nM) z podstawnikiem fluorowym (bioizoster wodoru) zachował takie same powinowactwo do receptora jak niepodstawiony ligand (127). Silnie elektronowyciągający podstawnik CN oraz silnie dostarczający elektrony do pierścienia podstawnik OMe powodował największą utratę aktywności do receptora. Obserwowano całkowity brak aktywności do receptora 5-HT_{1A} oraz 5-HT_{2A}. Przeprowadzone badania pokazują, że dalsze modyfikacje pierścienia A być może będą mogły powodować wzrost powinowactwa do receptora 5-HT₇.

Tabela 13. Wyniki stałej powinowactwa K_i dla badanych związków serii 5b

								
K_i [nM]								
Nr	linker	R	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT ₇	D ₂	Funkcja
130	-	CN	12980	927	1563	2883	-	-
131	-	F	13900	413	505	8	-	antagonista ^{1*}
132	-	Br	10950	942	234	126	-	-
133	-	Cl	3913	559	702	481	14530	-
134	-	OMe	3128	883	509	629	-	-
135	-	Me	16560	835	714	100	-	-

¹ – w odniesieniu do receptora 5-HT₇; * – dane nieopublikowane

Zaprojektowana seria związków nie nastręczyła żadnych problemów syntetycznych. Pierwszy etap syntezy stanowił otrzymanie w kilkuetapowej reakcji 5-podstawionych tryptamin **65** w postaci lepkich olejów z wydajnością pomiędzy 43 % a 68 %. W drugim etapie należało zsyntezować również drugi substrat pośredni (**68**), który został otrzymany finalnie z wydajnością 86 %. Ostatni krok stanowił syntezę właściwych związków końcowych w reakcji bezropuszczalnikowej wspieranej polem promieniowania mikrofalowego wychodząc z tryptamin **65** oraz substratu (**68**). Stosując analogiczne warunki jak dla serii 5a, otrzymano końcowe cząsteczki z wydajnością 52 – 67 % w postaci chlorowodorków.

Aktywny związek (**131**) został zadokowany do modelu homologicznego receptora 5-HT₇ dla którego wyznaczono konformację oraz kluczowe interakcje jakie zachodzą w kompleksie ligand – receptor. Badana cząsteczka charakteryzuje się takim samym ułożeniem w receptorze, jak i takim samym zestawem kluczowych oddziaływań z białkiem jak w przypadku ligandów **serii 5a**.

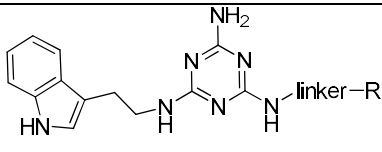
Badając stabilność metaboliczną ligandu (**131**) zauważono pogorszoną stabilność w stosunku do (**120**) oraz (**129**). Po inkubacji z MLM, w badanej próbce pozostało niecałe 20 % pierwotnego związku. Związek może wykazywać potencjalne umiarkowane interakcje międzylekowe (% aktywności CYP3A4 wynosi 50). Efekt hepatotoksyczne pojawił się w stężeniu 50 μM. Związek również cechował się nieco gorszymi właściwościami kardiotoxycznymi oraz ekotoksycznymi.

4.8. Charakterystyka związków w **serii 5c** (publikacja **D06**)

Poniższe wyniki badań radioizotopowych (oraz ligandy (**124**) i (**127**)) pokazują, że kluczowa jest odpowiednia długość linkera węglowego oraz obecność pierścienia aromatycznego (**Tabela 14**). Pierścień aromatyczny warunkuje pojawienie się wiązalności do receptora 5-HT₇. Ligand (**136**) bez pierścienia aromatycznego był całkowicie nieaktywny, podczas gdy wprowadzenie grupy benzylovej (ligand (**137**) $K_i = 709$ nM) spowodowało niemal 19 krotny wzrost powinowactwa do receptora 5-HT₇. Dalsze wydłużenie łącznika do dwóch atomów węgla (ligand (**127**), $K_i = 8$ nM) spowodowało osiągnięcie najwyższej aktywności i selektywności dla 5-HT₇R. Wydłużenie łańcucha węglowego o dodatkowy atom tlenu (ligand (**124**), $K_i = 55$ nM) delikatnie obniżyło powinowactwo, podczas gdy kolejne wydłużenie łącznika węglowego (ligandy(**138**) i (**139**)) powodowało pogłębiającą się utratę aktywności. Badane związki nie były aktywne do pozostałych receptorów.

Synteza tej grupy związków obejmowała reakcję pomiędzy substratem (**49**) oraz komercyjnie dostępnymi aminami. Stosując takie same warunki jak dla poprzednich serii otrzymano finalne ligandy z wydajnością powyżej 75 %.

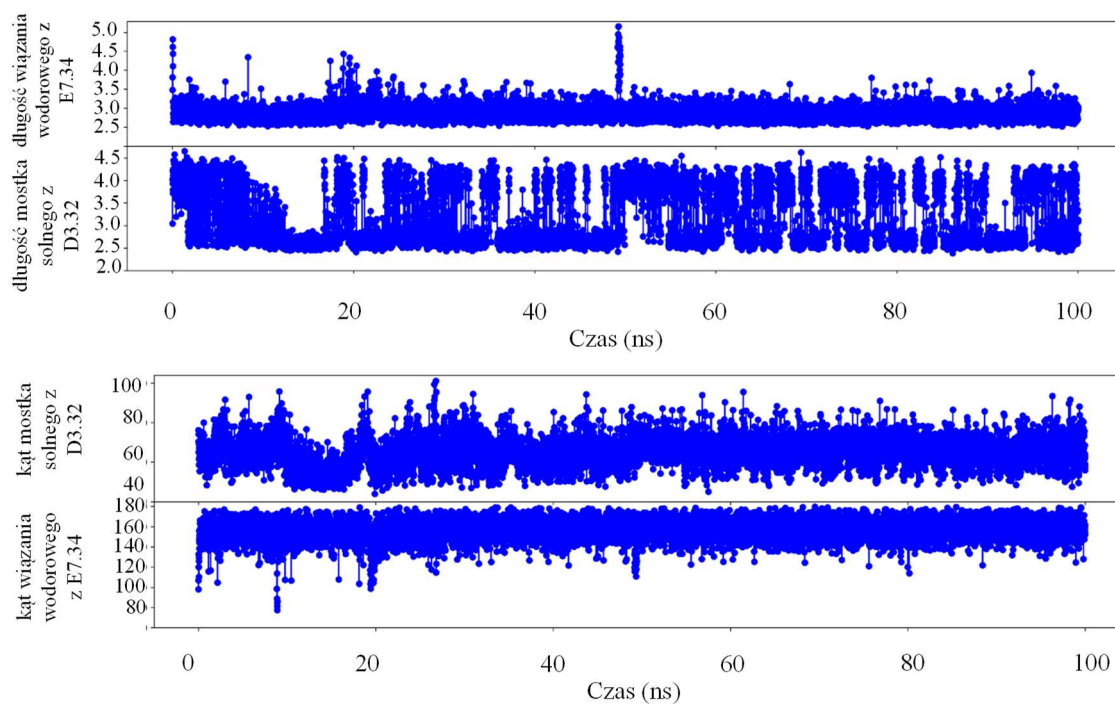
Tabela 14. Wyniki stałej powinowactwa K_i dla badanych związków serii **5c**



Nr	linker	R	K_i [nM]					Funkcja
			5-HT_{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT₇	D ₂	
136	Me	-	-	-	-	13410	-	-
137	metyleno	Ar	22960	4143	2511	709	10370	-
138	propoksy	Ar	19050	1515	1148	243	4607	-
139	butoksy	Ar	64700	758	1529	1036	5391	-

Aktywne ligandy (**124**) i (**127**) (które są strukturalnie bliskie serii **5c** niemniej jednak zasadnym jest ich analiza w również w tej podserii) zadokowano do modelu homologicznego receptora 5-HT₇ wyznaczając konformację jaką przyjmują w kieszeni wiążącej z wyznaczeniem kluczowych interakcji. Wyniki były zbieżne z tym co już zostało ustalone poprzednio, niemniej jednak postanowiono ocenić jaki jest charakter oddziaływania pomiędzy ligandem (**127**) a aminokwasami: D3.32 oraz E7.34. Wybrano te dwa aminokwasy ze następujących względów: (1) oddziaływanie z D3.32 jest klasycznym oddziaływaniem charakterystycznym dla aminergicznych receptorów GPCR oraz fakt, że Kołaczkowski i *współ*¹³¹ wskazują właśnie na to wiązanie biorące udział w tworzeniu kompleksu ligand – receptor; (2) we własnych badaniach niemal zawsze obserwowane było oddziaływanie z E7.34. Korzystając z dynamiki molekularnej, gdzie symulacje trwały 100 ns okazało się, że mostek solny (który *de facto* przypomina wiązanie wodorowe) pomiędzy grupą NH (po stronie tryptaminy) a D3.32 był niestabilny i nie spełniał odpowiednich parametrów, charakterystycznych dla oddziaływań wodorowych a także mostka solnego.^{134,135} Zupełną przeciwnością okazało się być wiązanie wodorowe pomiędzy grupą NH₂ triazyny a E7.34. Interakcja ta, przez cały okres symulacji była trwała. Z tych względów, dla pochodnych aminotriazyn nie zawierających motywu piperazyny istotniejsze wydaje się być wiązanie wodorowe z E7.34 niż z D3.32 (**Rysunek 28**). Dodatkowo przeprowadzone badania ADME-Tox *in vitro* wskazały, że ligandy (**124**) oraz (**127**) nie zawierające podstawników w pierścieniu charakteryzują się słabszą stabilnością metaboliczną. Dla związku (**124**), % pozostałego związku (po inkubacji z mysimi mikrosomami wątrobowymi) wynosił nieco

ponad 21 %, w przypadku związku (127) % ten wynosił niecałe 18. Pozostałe parametry ADME-Tox były zbliżone jak dla ligandów serii 5a.



Rysunek 28. Porównanie parametrów (długości oraz kąta) mostka solnego utworzonego z D3.32 oraz wiązania wodorowego utworzonego z E7.34 dla reprezentatywnego związku (127).

5. PODSUMOWANIE

W ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano wydajną, ekologiczną i ekonomiczną metodę syntezy ipsapironu (**40**) na drodze dwuetapowej reakcji *N*-alkilowania. W pierwszym etapie, produkt przejściowy **38** uzyskiwano w ciągu 50 sekund z wydajnością 94 % stosując promieniowanie mikrofalowe oraz węglan potasu (1,5 eq.), TBAB (0,1 eq.) i DMF (1% mas.) jako reagenty pomocnicze. W drugim etapie otrzymano ipsapiron (**40**) w ciągu 2 minut z wydajnością 85 % również prowadząc proces w obecności promieniowania mikrofalowego oraz węglan potasu (3 eq.), TBAB (0,1 eq.) i DMF (1% mas.). Prace te pozwoliły na znaczne uproszczenie całego procesu syntezy oraz maksymalne zredukowanie stosowania toksycznych reagentów, minimalizując także zużycie energii, co pozwala wpisać preparatykę dla tego związku w kanony *green chemistry*.

Opracowana metoda syntezy została z powodzeniem zaadaptowana do syntezy biblioteki 71 związków końcowych omawianych w niniejszym autoreferacie (łącznie cykl sześciu publikacji zawiera 88 nowych związków), z czego 28 związków stanowiły pochodne ipsapironu, natomiast pozostałe 43 związki zawierały motyw 1,3,5-triazyny. Wszystkie rozważane związki zostały podzielone na 5 serii w zależności od zaplanowanych modyfikacji strukturalnych. Zdecydowana większa część związków **serii 1** oraz **2** wykazywała wysokie powinowactwo, zazwyczaj do receptora 5-HT_{1A}. Oprócz wspomianej aktywności, zaobserwowano również aktywność do receptora dopaminowego D₂. Wydłużenie łańcucha węglowego nie miało większego wpływu na zmianę w stałej powinowactwa *K_i* w przypadku receptora 5-HT_{1A}. Istotniejszą rolę, mającą wpływ na powinowactwo wydaje się mieć rodzaj zastosowanej arylopiperyminy. Aktywność do receptora 5-HT₇ w większości przypadków była znikoma. Potwierdzono, że związek (**85**) jest agonistą, podczas gdy (**93**) i (**94**) są antagonistami receptora 5-HT_{1A}. Ligandy tych dwóch serii zostały otrzymane na drodze kilkuetapowej ścieżki syntetycznej, w której ostatni etap (synteza związków finalnych) stanowił bezrozpuszczalnikową reakcję wspieraną polem promieniowania mikrofalowego. W ciągu maksymalnie 2,5 minuty otrzymywano cząsteczki z wydajnością powyżej 50 %. W procedurze modelowania molekularnego wyznaczono jaką przestrzeń białka zajmuje ipsapiron (**40**) w kieszeni wiążącej receptora 5-HT_{1A}. Dowiedziono, że nowe analogi ipsapironu (**seria 1**) również przyjmują podobne ułożenie w receptorze, co tłumaczyć może ich wysoką aktywność biologiczną.

Rozbudowa związków **serii 2** o dodatkową tryptaminę (**seria 3**), nie zmieniła znacząco wiązalności cząsteczek do receptora 5-HT_{1A} oraz D₂ ale spowodowała znaczny wzrost wiązalności również do receptora 5-HT₇. Skrócenie łącznika węglowego z czterech atomów do dwóch pogorszyło wiązalność do receptora 5-HT_{1A} oraz D₂, natomiast nie wpłynęło na receptor 5-HT₇ (związek (**109**) bardziej selektywny w stosunku do pozostałych tej samej serii). Ligandy otrzymane zostały na drodze reakcji bezrozpuszczalnikowej wspieranej polem promieniowania mikrofalowego z wydajnością 38 – 64 %. Wybrane aktywne cząsteczki (**106**) i (**109**) po zadokowaniu do modelu homologicznego receptora 5-HT₇ przyjmowały ułożenie w receptorze oraz tworzyły oddziaływania z białkiem typowe jak dla większości ligandów z rodziny LCAPs wykazujących powinowactwo do receptora 5-HT₇. Badane cząsteczki były antagonistami receptora 5-HT₇ i cechowały się umiarkowaną stabilnością metaboliczną oraz hepatotoksycznością.

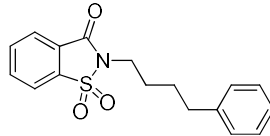
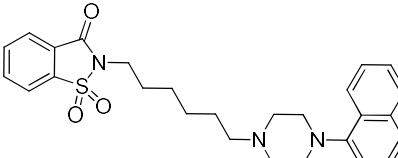
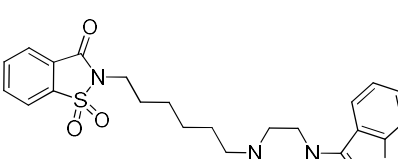
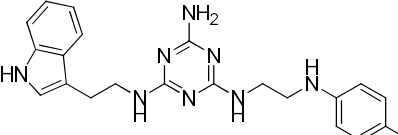
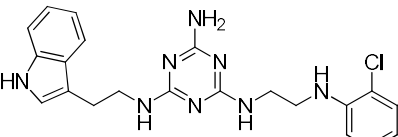
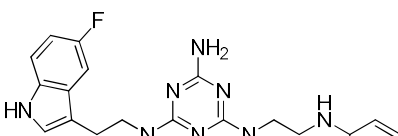
Zaskakującym okazało się, że całkowite wyeliminowanie łącznika węglowego (**seria 4**) powodowało utratę powinowactwa do wszystkich badanych receptorów. Z kolei usunięcie mostka etylowego piperazyny (**seria 5**) spowodowało ponowne odtworzenie powinowactwa tylko do receptora 5-HT₇. Aktywność do receptora 5-HT_{1A} jak i do pozostałych nie była notowana. Analizując wyniki badań radioizotopowych związków **serii 5a**, dostrzec można, że tylko związki z niepodstawionym pierścieniem B oraz podstawione halogenem w pozycji *para* były najbardziej aktywne. Dekoracja pozostałych pozycji włączając w to większe podstawniki jak np. -OMe powodowała zauważalny spadek aktywności. Cząsteczki zawierające łącznik etylowy (pochodne fenyletyloaminy) charakteryzowały się najwyższym powinowactwem do receptora 5-HT₇ w porównaniu do ich odpowiedników z łańcuchem etylowym rozszerzonym o grupę NH lub atomem tlenu. Również i w wypadku **serii 5a**, wybrane aktywne związki powodowały wzrost produkcji cAMP (antagoniści). Synteza przebiegała w sposób analogiczny do poprzedniej serii związków, za wyjątkiem ligandów (**115**), (**120**), (**123**), które zostały otrzymane przy użyciu węgla sodu. Wyniki dokowania wskazują, że aktywne struktury przyjmują odwrotne ułożenie jak ligandy poprzedniej serii. Dominującym oddziaływaniem jest wiązanie wodorowe pomiędzy grupą aminową triazyny a E7.34, poza tym pozostałe kluczowe oddziaływania są zbliżone do literaturowych. Badania ADME-Tox dla (**120**) i (**129**) ujawniły, że związki cechują się umiarkowaną stabilnością metaboliczną, możliwością wchodzenia w interakcje między lekowe oraz hepatotoksycznością. W modelu zwierzęcym *in vivo*, związek nr (**120**) charakteryzował się kardiotoxycznością dopiero w stężeniu ponad 12 µg/mL.

Pomimo, że istnieją dane literaturowe mówiące o możliwości zwiększenia powinowactwa do receptora 5-HT₇ poprzez wprowadzenie podstawników w piątą pozycję indolu tryptaminy, to w przypadku niniejszych badań nie zaobserwowano takiego zjawiska, za wyjątkiem związku (**131**), który był nadal aktywny podobnie jak jego niepodstawiony analog (**127**). Być może jest to spowodowane bioizosteryzmem podstawnika fluorowego. Podobnie jak poprzednie ligandy tak i również związki **serii 5b** zostały otrzymane na drodze reakcji bezrozpuszczalnikowej wspieranej polem promieniowania mikrofalowego w ciągu 2,5 minuty z wydajnością 52 – 67 %.

Ostatnia seria związków **5c** wskazuje na konieczną obecność pierścienia aromatycznego B, a optymalna długość linkera łącząca rdzeń triazyny z centrum aromatycznym B wynosi dwa (łańcuch etylowy) do trzech atomów (łańcuch etoksyłowy lub etyloaminowy). W kontekście syntezy, badane związki otrzymano w taki sam sposób jak poprzednie. Wyniki przeprowadzonych symulacji dynamiki molekularnej pokazały ciekawą rzecz. Okazało się, że mostek solny (tutaj bardziej przypomina wiązanie wodorowe z D3.32), które postulowane jest jako jedno z najważniejszych mających wpływ na powinowactwo do aminergicznych receptorów GPCR, w przypadku badanych związków nie było aż tak istotne. Mało tego, wiązanie to było niestabilne i nie spełniało parametrów wiązania wodorowego/mostka solnego. Znaczącą rolę odgrywa natomiast wiązanie wodorowe z E7.34, które w trakcie badania było stabilne i spełniało kryteria przypisane dla wiązania wodorowego.

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej zsyntezowano nowe związki z grupy LCAPs wykazujące powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} oraz dzięki stopniowym modyfikacjom strukturalnym udało się dojść do zupełnie innej, nowej grupy pochodnych aminotriazyn charakteryzująca się wysokim powinowactwem tylko do receptora 5-HT₇. W toku badań, oprócz selektywnych ligandów receptora 5-HT_{1A} i 5-HT₇ udało się również otrzymać potrójny oraz multifunkcyjny ligand o numerze kolejno (**93**) i (**96**). W **Tabeli 15** przedstawiono sześć związków o obiecujących parametrach farmakologicznych, które można uznać za *lead compounds* do dalszych badań. Interesujące wyniki w obrębie nowych pochodnych aminotriazyn dały również podstawę do zaprojektowania kolejnej, obszernej biblioteki związków o potencjalnej aktywności do receptora 5-HT₇.

Tabela 15. Wytypowane struktury o najkorzystniejszych właściwościach farmakologicznych oraz ADME-Tox

Profil farmakologiczny	ADMET	Nr	Struktura
Selektywny ligand 5-HT _{1A} R	-	69	
Potrójny ligand 5-HT _{1A} R/5-HT ₇ R/D ₂ R antagonista 5-HT _{1A} R	-	93	
Multifunkcyjny ligand receptorów serotoninowych i D ₂ R	-	96	
Silny, selektywny antagonista 5-HT ₇ R	%nm > 29 %CYP3A4=20 %HepG2=100 w stęż. 10µM kardio. = śred.	120	
Selektywny antagonist 5-HT ₇ R	%nm > 38 %CYP3A4=58 %HepG2=80 w stęż. 10µM	129	
Silny, selektywny antagonista 5-HT ₇ R	%nm > 29 %CYP3A4=50 %HepG2=100 w stęż. 10µM kardio.=podwyż.	131	

%nm – % związku, który nie został zmetabolizowany

6. DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTA

Wykaz cyklu publikacji objętych pracą doktorską:

D01. **Damian Kułaga**, Jolanta Jaśkowska, Radomir Jasiński – Microwave-Assisted Solvent-Free Synthesis of Ipsapirone, *J. Heterocyclic Chem.* **2019**, 56, 1498-1504 IF*=1.399

D02. **Damian Kułaga**, Jolanta Jaśkowska, Grzegorz Satała – Radioligand and computational insight in structure - Activity relationship of saccharin derivatives being ipsapirone and revospirone analogues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 42, 128028

IF*=2.774

D03. **Damian Kułaga**, Jolanta Jaśkowska, Grzegorz Satała – Design, synthesis and biological evaluation of novel serotonin and dopamine receptor ligands being 6-bromohexyl saccharine derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, 29,126667 IF*=2.774

D04. **Damian Kułaga**, Anna K. Drabczyk, Grzegorz Satała, Gniewomir Latacz, Karolina Różga, Damian Plażuk, Jolanta Jaśkowska – Design and synthesis of new potent 5-HT₇ receptor ligands as a candidate for the treatment of central nervous system diseases, *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 227, 113931 IF*=6.427

D05. **Damian Kułaga**, Anna K. Drabczyk, Grzegorz Satała, Gniewomir Latacz, Anna Boguszewska-Czubara, Damian Plażuk, Jolanta Jaśkowska – Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,3,5-triazines: effect of aromatic ring decoration on affinity to 5-HT₇ receptor, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 13308 IF*=6.628

D06. **Damian Kułaga**, Jolanta Jaśkowska, Grzegorz Satała, Gniewomir Latacz, Paweł Śliwa – Aminotriazines with indole motif as novel, 5-HT₇ receptor ligands with atypical binding mode, *Bioorg. Chem.* **2020**, 104, 104254 IF*=5.321

* – pięcioletni Impact Factor

Źródło finansowania

Prace związane z komputerowym wspomaganie projektowania leków (CADD – *Computer-Aided Drug Design*) prowadzone były z wykorzystaniem klastra obliczeniowego w Infrastrukturze PL-Grid:

1. w latach 2019 – 2020 z grantu obliczeniowego nr ID: drugdesign1
(kierownik mgr inż. Damian Kułaga)
2. w latach 2020 – 2021 z grantu obliczeniowego nr ID: drugdesign3
(kierownik mgr inż. Damian Kułaga)
3. w latach 2021 – 2022 z grantu obliczeniowego nr ID: drugdesign4
(kierownik mgr inż. Damian Kułaga)
4. w latach 2022 – 2023 z grantu obliczeniowego nr ID: drugdesign5
(kierownik mgr inż. Damian Kułaga)

Synteza chemiczna, skryningi receptorowy oraz testy funkcjonalne zostały sfinansowane:

1. w latach 2016 – 2019 z projektu LIDER VI, „Synteza i ocena aktywności nowych ligandów działających na ośrodkowy układ nerwowy (oun)” nr LIDER/015/L-6/14/NCBR/2015, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (kierownik dr Jolanta Jaśkowska)
2. w latach 2017 – 2018 „Nowa metoda otrzymywania przeciwdepresyjnego leku Trazodonu” w ramach KONKURSU TRL+ na prace przedwdrożeniowe, który realizowany jest był Centrum Transferu Technologii PK w ramach programu MNISW „Inkubator Innowacyjności+” pod patronatem Prorektora ds. Nauki Politechniki Krakowskiej Prof. dr hab. inż. Tadeusza Tatary 07.2017-06.2018r (kierownik dr Jolanta Jaśkowska)
3. w 2021 roku „Synteza i badanie powinowactwa do receptora 5-HT₇ wybranych związków z grupy indoloaminotriazyn” z działalności naukowej służącej rozwojowi młodych pracowników naukowych i uczestników studiów doktoranckich nr Subwencja N+B (C-2 Kułaga) (kierownik mgr inż. Damian Kułaga)
4. w latach 2022 – 2023 z projektu LIDER XII, „Innowacyjne związki *first-in-class*, jako ligandy receptora 5-HT₇ w leczeniu potrójnie negatywnego raka piersi TNBC” nr LIDER/41/0206/L-12/20/NCBR/2021, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (kierownik mgr inż. Damian Kułaga)

Badania toksykologiczne *in vitro/in vivo* (kardiotoksyczność i ekotoksyczność) zostały przeprowadzone w ramach współpracy naukowej z Lubelskim Uniwersytetem Medycznym pod kierownictwem dr n.med. Anny Boguszewskiej – Czubary i finansowane ze źródeł tego Uniwersytetu.

Wykaz osiągnięć naukowych nieobjętych cyklem pracy doktorskiej:

Publikacje

1. Jolanta Jaśkowska, **Damian Kułaga**, Zbigniew Majka – Nowa bezrozpuszczalnikowa metoda syntezy olanzapiny i jej pochodnych, *Przesmyśl Chem.* **2016**, 95, 1918-1920
2. Jolanta Jaśkowska, Anna K. Drabczyk, **Damian Kułaga**, Przemysław Zaręba, Zbigniew Majka – Solvent-free microwave-assisted synthesis of aripiprazole, *Curr. Chem. Lett.* **2018**, 7, 81-86
3. Jolanta Jaśkowska, Anna Karolina Drabczyk, Piotr Michorczyk, **Damian Kułaga**, Przemysław Zaręba, Przemysław Jodłowski, Zbigniew Majka, Jarosław Jakubski, Edyta Pindelska – Mechanochemical Synthesis Method for Drugs Used in the Treatment of CNS Diseases under PTC Conditions, *Catalysts* **2022**, 12, 464
4. Anna Kawka, Grzegorz Hajdaś, **Damian Kułaga**, Hanna Koenig, Iwona Kowalczyk, Tomasz Pospieszny - Molecular structure, spectral and theoretical study of new type bile acid–sterol conjugates linked *via* 1,2,3-triazole ring, *J. Mol. Str.* **2022**, 1273, 134313
5. Jolanta Jaśkowska, Anna Karolina Drabczyk, Paweł Śliwa, Przemysław Jodłowski, Edyta Pindelska, **Damian Kułaga**, Przemysław Zaręba, Zbigniew Majka, Agata Siwek, Małgorzata Wolak, Marcin Kołaczkowski - Ultrasound assisted one-pot synthesis and preliminary *in vitro* studies of salicylamide arylpiperazines as dual 5-HT_{1A}/5-HT₇ ligands, *J. Mol. Str.* **2023**, 1275, 134585

Patenty i zgłoszenia patentowe

1. Jolanta Jaśkowska, Anna Drabczyk, **Damian Kułaga**, Przemysław Zaręba, Przemysław Jodłowski – *Sposób otrzymywania długocieczowych arylopiiperazyn*, PL239445B1, patent krajowy

2. Jolanta Jaśkowska, Anna Drabczyk, **Damian Kułaga**, Przemysław Zaręba, Przemysław Jodłowski – *Sposób otrzymywania olanzapiny i kwetiapiny*, PL430988B1, patent krajowy
3. **Damian Kułaga**, Jolanta Jaśkowska, Grzegorz Satała – *Nowe pochodne indoloaminotriazyn oraz sposób ich wytwarzania*, P.433527, zgłoszenie patentowe
4. Jolanta Jaśkowska, Przemysław Jodłowski, Anna Karolina Drabczyk, **Damian Kułaga**, Przemysław Zaręba, Edyta Pindelska – *Sposób wytwarzania N-podstawionych arylopipezazyn*, P.434376, patent krajowy

Stáže naukowe

1. 07.2018 – 10.2018 Selvita SA., Kraków, chemik medyczny i organiczny
2. 07.2019 – 10.2019 Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja, Polska Akademia Nauk, chemik obliczeniowy (modelowanie molekularne)
3. 06.2021 – 07.2021 La Sapienza University, Rzym, chemik organiczny

Wdrożenia przemysłowe

1. CannLab Sp. z o.o, *Wdrożenie technologii oczyszczania ekstraktu roślinnego*, Jolanta Jaśkowska, Anna Drabczyk, **Damian Kułaga**, Przemysław Zaręba, Kraków 2019
2. CannLab Sp. Z o.o, *Technologia izolacji wybranych związków bioaktywnych*, Jolanta Jaśkowska, Anna Drabczyk, **Damian Kułaga**, Przemysław Zaręba, Kraków 2019

Projekty naukowe

1. „Synteza nowych ligandów receptorów serotoninowych z grupy arylopipezazynyloalkilo pochodnych tioksolonu” nr C-2/492/2018/DS-M przyznany z subwencji dla młodych naukowców finansowany przez MEiN i uzyskany na drodze konkursu wewnętrznego (**kierownik mgr inż. Damian Kułaga**)
2. „Synteza i ocena cytotoksyczności nowych pochodnych piperazynotriazyn na linii komórkowej MDA-MB231” nr Subwencja N+B (C-2 Kułaga) w 2022 roku z działalności naukowej służącej rozwojowi młodych pracowników naukowych i uczestników studiów doktoranckich (**kierownik mgr inż. Damian Kułaga**)

Udział w konferencjach naukowych

Postery

1. Drug Discovery Conferenc, Riga, Latvia, August 27-29, 2015 - "Solvent-free method for the synthesis of olanzapine", Jaśkowska J., Majka Z., Kułaga D.
2. 2nd Central European Biomedical Congres, Cracow 15-18.06.2016r - "Quantum mechanical study of 1-hexyl-4-(2-methoxyphenyl)piperazine derivatives as new ligands of serotonin receptors", Śliwa P., Jaśkowska J., Malinowska M., Kułaga D.
3. 2nd Central European Biomedical Congres, Cracow 15-18.06.2016r - "A new method of obtaining the alkylarylpiperazines O-derivatives of salicylamide in the presence of microwave radiation", Jaśkowska J., Majka Z., Szybka P., Malinowska M., Śliwa P., Kułaga D.
4. 2nd Central European Biomedical Congres, Cracow 15-18.06.2016r - "Evaluation of versatility method synthesis of Olanzapine derivatives under microwave conditions", Kułaga D., Jaśkowska J., Majka Z., Śliwa P.
5. VIII Medical Chemistry seminar, Lublin 15-17.09.2016 - "FMO/EDA study of 1-hexyl-4-(2-methoxyphenyl)piperazines as ligands of serotonin receptors", Śliwa P., Kurczab R., Jaśkowska J., Malinowska M., Kułaga D.
6. VIII Medical Chemistry seminar, Lublin 15-17.09.2016 - "A new method for the synthesis of long-chain arylpiperazines (LCAPs) under microwave irradiation", Kułaga D., Drabczyk A., Szybka P., Jaśkowska J., Malinowska M., Śliwa P.
7. 5th World Competition of Chemical Inventions, Polish Chamber of Chemical Industry, Warsaw 12.10.2017 - "Method for the synthesis of long-chain arylpiperazines (LACPs) under microwave irradiation", Jaśkowska J., Kułaga D., Drabczyk A.
8. Korea International Women's Invention Exposition, Korea 16.06.2017-19.06.2017 - "Method of obtaining aripiprazole", Jaśkowska J., Drabczyk A. K., Kułaga D., Tyliszczak B.
9. 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Croatia, Dubrovnik 25.06.2017-29.06.2017 - "Synthesis and evaluation of th activity towards 5-HT receptors of new ligands from the LACPS group", Drabczyk A., Jaśkowska J., Kułaga D., Satała G., Malinowska M

10. 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Croatia, Dubrovnik 25.06.2017-29.06.2017 - "The synthesis of new arylpiperazines for CNS disorders", Malinowska M., Jaśkowska J., Drabczyk A., Kułaga D.
11. 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Croatia, Dubrovnik 25.06.2017-29.06.2017 - "synthesis, structure-activity relationships, and molecular modeling studies of new long-chain chloro arylpiperazines derivatives as 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptor ligands" Jaśkowska J., Śliwa P., Majka Z., Drabczyk A., Kułaga D., Malinowska M., Satała G.
12. 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Croatia, Dubrovnik 25.06.2017-29.06.2017 - "Long-chain derivatives of (trifluoromethylphenyl)piperazines – synthesis and evaluation of the activity towards 5-HT receptors", Drabczyk A., Jaśkowska J., Kułaga D., Satała G., Malinowska M.
13. 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Croatia, Dubrovnik 25.06.2017-29.06.2017 - "Synthesis and biological activity of novel long chain arylpiperazines (LACPs) with pyridyl moiety as ligands for serotonin receptors", Kułaga D., Jaśkowska J., Drabczyk A., Satała G., Malinowska M.
14. XXIII Polish Pharmaceutical Chamber, Krakow, 19-22.09.2017 - "Structure - activity relationship of novel hexyl arylpiperazines", Kułaga D., Jaśkowska J., Drabczyk A., Satała G.
15. XXIII Polish Pharmaceutical Chamber, Krakow, 19-22.09.2017 - "Structure - activity relationship of novel long chain methoxyphenylpiperazines as 5-HT_{1A} ligands", Drabczyk A., Jaśkowska J., Kułaga D., Satała G.
16. IX Medical Chemistry seminar, Lublin 15-17.10.2018, „Synthesis and biological activity of a new 5-cyanoindole derivatives as a dual D₂/5HT_{1A} receptor ligands” Kułaga D., Jaśkowska J., Drabczyk A., Zaręba P., Satała G.
17. IX Medical Chemistry seminar, Lublin 15-17.10.2018, „New methoxy and ethoxy arylpiperazines from hexyl-1,2,4- triazolo[4,3-a]pyridin-3(2H)-ones as dual 5-HT_{1A} / D₂ ligands” Zaręba P., Jaśkowska J., Drabczyk A., Kułaga D., Satała G.
18. IX Medical Chemistry seminar, Lublin 15-17.10.2018, „New hexyl o-fluoroaryl piperazines derivatives as 5-HT_{1A} receptor ligands – synthesis and structure-activity relationship” Drabczyk A., Jaśkowska J. Zaręba P., Kułaga D., Satała G.

19. XXI International Symposium "Advances in the chemistry of heteroorganic compounds", 23.11.2018, Łódź - "MW assisted synthesis and activity of new long-chain arylpiperazines with stiffened carbon linker as D₂ receptor ligands" Jaśkowska J., Zaręba P., Drabczyk A., Kułaga D., Śliwa P., Łankiewicz D.
20. 257th ACS National Meeting & Exposition, 31.03-2019-04.04.2019, Orlando (USA) – "Synthesis and biological activity of new saccharine derivatives as dual D₂/5-HT_{1A} receptor ligands", Kułaga D., Jaśkowska J.
21. ACS Spring 2020 Expo, konferencja on-line 22.03.2020 – 26.03.2020 "Design, synthesis and biological activity of new aminotriazine derivatives as selective 5-HT₇ receptor ligands"

Komunikaty ustne

1. V Narodowa Konferencja Naukowa – Młodzi naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, Wrocław 10.05.2017 - "Synteza nowych ligandów receptorów serotoninowych z grupy LCAPs w polu promieniowania mikrofalowego" - D. Kułaga
2. Studencka Sesja Kół Naukowych, Kraków, 24.04.2018 - "Synthesis and properties of new furagin derivatives as antimicrobial compounds" D. Kułaga
3. Wkraczając w Świat Nauki, Wrocław 20-21.09.2018 - "Synteza ipsapironu w polu promieniowania mikrofalowego" D. Kułaga
4. Wkraczając w Świat Nauki, Wrocław, 19-21.09.2019, Polska, Komunikat ustny: „Synteza i ocena aktywności nowych analogów ipsapironu” D. Kułaga
5. X Medical Chemistry seminar, Lublin 03-05.09.2021 „Projektowanie i synteza nowych ligandów receptora 5-HT₇ jako kandydatów do leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego” D. Kułaga
6. 64 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin 11-16.09.2022 „Nowe pochodne 1,3,5-triazyn jako ligandy o podwyższonym powinowactwie do receptora 5-HT₇: projektowanie, synteza i ocena aktywności biologicznej”, D. Kułaga

7. BIBLIOGRAFIA

1. R. J Giguere, T. L Bray, S.M. Duncan, G. Majetich, Application of commercial microwave ovens to organic synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4945-4948
2. S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, Microwave heating in solid-phase peptide synthesis, *Chem.Soc.Rev.* **2012**, 41, 1826-1844
3. M. Larhed, C. Moberg, A. Hallberg, Microwave-accelerated homogeneous catalysis in organic chemistry, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 717–727
4. K. Bougrin, A. Loupy, M. Soufiaoui, Microwave-assisted solvent-free heterocyclic synthesis, *J. Photochem. Photobiol. C*, **2005**, 6, 139–167
5. M. Henary, C. Kananda, L. Rotolo, B. Savino, E. A. Owens, G. Cravotto, Benefits and applications of microwave-assisted synthesis of nitrogen containing heterocycles in medicinal chemistry, *RCS Adv.* **2020**, 10, 14170-1419
6. N. Sharma, U. K. Sharma, E. V. Van der Eycken, Microwave-Assisted Organic Synthesis: Overview of Recent Applications, *Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry*, Second Edition, **2018**
7. C. O. Kappe, B. Pieber, D. Dallinger, Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality? *Angew. Chem.* **2013**, 52, 1088-1094
8. A. Lew, P. O. Krutzik, M. E. Hart, A. R. Chamberlin, Increasing rates of reaction: Microwave-assisted organic synthesis for combinatorial chemistry, *J. Comb. Chem.* **2002**, 4, 95–105
9. Á. Díaz-Ortiz, P. Prieto, A. de la Hoz, A Critical Overview on the Effect of Microwave Irradiation in Organic Synthesis, *Chem. Rec.* **2018**, 18, 1–14
10. Bogdał D., Microwave-assisted organic synthesis: one hundred reaction procedures. Elsevier **2005**. 1st Edition, 2. ISBN: 9780080446219
11. L. De Luca, G. Giacomelli, An easy microwave-assisted synthesis of sulphonamides directly from sulfonic acids, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 3967–3969
12. P. D. Q. Dao, S. L. Ho, H.J. Lim, C, S, Cho, Microwave-Assisted Cyclization under Mildly Basic Conditions: Synthesis of 6H-Benzo[c]chromen-6-ones and Their 7,8,9,10-Tetrahydro Analogues, *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 4140–4146

13. V. P. Mehtaa, E. V. Van der Eycken, Microwave-assisted C–C bond forming cross-coupling reactions: an overview, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4925–4936
14. A. K. Sharma, K. Gowdahalli, J. Krzeminski, S. Amin, Microwave-Assisted Suzuki Cross-Coupling Reaction, a Key Step in the Synthesis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Metabolites, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8987-8989
15. K. G. Liu, A. J. Robichaud, A general and convenient synthesis of *N*-aryl piperazines, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 7921-7922
16. R. S. Tamboli, M. M. Shidore, R. C. Dash, A. M. Kanhed, N. R. Patel, S. R. Shah, M. R. Yadav, Improved Rapid and Green Synthesis of *N*-Aryl Piperazine Hydrochlorides Using Synergistic Coupling of Hydrated Task Specific Ionic Liquid ([BbIm]OH) and Microwave Irradiation, *ChemistrySelect* **2019**, 4, 1138 –1148
17. H. G. Jaisinghani, B. M. Khadilkar, Rapid and efficient synthesis of 1-arylpiperazines under microwave irradiation, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6875-6876
18. N. Baig RB, R. S Varma, Solvent-free synthesis, *An Introduction to Green Chemistry Methods, Future Medicine*, **2013**, 18-38
19. C.M. Starks, C.L. Liotta, M. Halpern, Phase-transfer catalysis. Fundamentals, applications, and Industrial Perspectives, Chapman&Hall, New York, London, **1994**
20. P. Fita, Toward Understanding the Mechanism of Phase Transfer Catalysis with Surface Second Harmonic Generation, *J. Phys. Chem. C*, **2014**, 118, 23147–23153
21. M. Mąkosza, M. Fedoryński, Phase Transfer Catalysis, *Catal. Rev.* **2003**, 45, 321
22. D. Albanese, Liquid–Liquid Phase Transfer Catalysis: Basic Principles and Synthetic Applications, *Catal. Rev.* **2003**, 45, 36
23. A. Siewniak, A. Chrobok, Kataliza przeniesienia międzyfazowego jako nowoczesna technika w syntezie organicznej, *Wiad. Chem.* **2021**, 75, 1297-1315
24. Starks C.M., Halper M., Phase-transfer catalysis: fundamentals, applications, and industrial perspectives, Springer Science & Business Media **2012**
25. S. Chatti, M. Bortolussi, A. Loupy, Synthesis of diethers derived from dianhydrohexitols by phase transfer catalysis under microwave, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 3367-3370

26. B. Rissafi, A. El Louzi, A. Loupy, A. Petit, M. Soufiaoui, S.F. Tétouani, Solvent-Free Synthesis of Diaryl α -Tetralones via Michael Addition under Microwave Irradiation, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002, 2518-2523
27. A. Saber, M. Driowya, S. Alaoui, H. Marzag, L. Demange, E. Álvarez, R. Benhida, K. Bougrin, Solvent-Free Regioselective Synthesis of Novel Isoxazoline and Pyrazoline N-Substituted Saccharin Derivatives Under Microwave Irradiation, *Chem. Heterocycl. Compd.* **2016**, 52, 31–40
28. J. Jaśkowska, D. Kułaga, Z. Majka, Nowa bezrozpuszczalnikowa metoda syntezy olanzapiny i jej pochodnych, *Przemysł Chem.* **2016**, 95, 1918-1920
29. J. Jaśkowska, Sposób otrzymywania aripiprazolu, Pat.236418, **2020**
30. J. Jaśkowska, A. K. Drabczyk, D. Kułaga, P. Zaręba, Z. Majka, Solvent-free microwave-assisted synthesis of aripiprazole, *Curr.Chem.Lett.* **2018**, 7, 81-86
31. J. Jaśkowska, P. Zaręba, P. Śliwa, E. Pindelska, G. Satała, Z. Majka, Microwave-Assisted Synthesis of Trazodone and Its Derivatives as New 5-HT_{1A} Ligands: Binding and Docking Studies, *Molecules*, **2019**, 24, 1609
32. J. Jaśkowska, Sposób otrzymywania trazodonu, Pat.234822, **2019**
33. J. Jaśkowska, Sposób otrzymywania *O*-arylopiperazynyloalkilo salicylamidów, Pat.236884, **2020**
34. P. Zaręba, J. Jaśkowska, G. Satała, N-6(4-arylopiperazyn-1-ylo)heksylowe pochodne cyklicznych 1,8-naftylo / tetrahydrochinolino imidów / amidów / sulfonamidów oraz sposób ich otrzymywania, Pat.240473, **2022**
35. M. Nagai, The Role of Serotonergic System in Body Temperature Regulation, *Physiol. Res.* **1992**, 41, 65-69
36. J. M. Monti, Serotonin control of sleep-wake behavior, *Sleep Med. Rev.* **2011**, 15, 269-281
37. L. P. Morin, Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity, *Ann. Med.* **1999**, 13, 12-33
38. J. D. A. Olivier, D. C. Esquivel-Franco, M. D. Waldinger, B. Olivier, Serotonin and sexual behavior, *The Serotonin System History, Neuropharmacology, and Pathology*, **2019**

39. S. N. Young, M. Leyton, The role of serotonin in human mood and social interaction: Insight from altered tryptophan levels, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, 71, 857-865
40. S. W. Watts, S. F. Morrison, R. P. Davis, S. M. Barman, L. C. Daws, Serotonin and Blood Pressure Regulation, *Pharmacol. Rev.* **2012**, 64, 359-388
41. M. Takamori, Nerve muscle and serotonin, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1977**, 40, 89-96
42. S. Fidalgo, D. K. Ivanov, S. H. Wood, Serotonin: from top to bottom, *Biogerontology* **2013**, 14, 21-45
43. D. E. Nichols, C. D. Nichols, Serotonin Receptors, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 5, 1614-1641
44. S. Shimizu, Y. Mizuguchi, Y. Ohno, Improving the treatment of schizophrenia: role of 5-HT receptors in modulating cognitive and extrapyramidal motor functions, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **2013**, 12, 861-869
45. J. R. Raymond, Y. V. Muklin, T. W. Gettys, M. N. Garnovskaya, The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, 127, 1751-1764
46. T. J. Pucadyil, S. Kalipatnapu, A. Chattopadhyay, The serotonin 1A receptor: a representative member of the serotonin receptor family. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2005**, 25, 553-580
47. P. R. Albert, F. Vahid-Ansari, The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior, *Biochimie*, **2019**, 161, 34-45
48. G. Tunnickliff, Molecular basis of buspirone's anxiolytic action. *Pharmacol. Toxicol.* **1991**, 69, 149-156
49. J. De Vry, 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacol. (Berl)*. **1995**, 121, 1-26
50. L. E. Gonzalez,; S. E. File, D. H. Overstreet Selectively bred lines of rats differ in social interaction and hippocampal 5-HT_{1A} receptor function: a link between anxiety and depression? *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, 59, 787-92
51. J. Menard, D. Treit, Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1999**, 23, 591-613

52. Millan, M.J. Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin 5-HT_{1A} receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 295, 853-861
53. Meltzer, H.Y.; Li, Z.; Kaneda, Y.; Ichikawa, J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **2003**, 27, 1159-1172
54. Y. Ohno, New Insight into the Therapeutic Role of 5-HT_{1A} Receptors in Central Nervous System Disorders, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2010**, 10, 148-157
55. D. Hoyer, J. P. Hannon, G. R. Martin, Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, 71, 533-554
56. J. Staroń, R. Bugno, A. S. Hogendorf, A. J. Bojarski, 5-HT_{1A} receptor ligands and their therapeutic applications: review of new patents, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, 28, 679-689
57. K. A. Pierz, M. E. Thase, A review of Vilazodone, serotonin, and major depressive disorder, *Prim. Care Companion CNS Disord.* **2014**, 16
58. S. Chauhan, S. S. Parmar, Is Vilazodone Really the Answer to the Delay Associated with the Onset of Antidepressant Action of SSRIs? – A Randomised Control Trial, *Int J Psychiatry Clin Pract.* **2018**, 6, 9-18
59. C. Sanchez, K. E. Asin, F. Artigas, Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: Review of preclinical and clinical data, *Pharmacol. Ther.* **2015**, 145, 43-57
60. F. Borsini, K. Evans, K. Jason, F. Rohde, B. Alexander, S. Pollentier, Pharmacology of flibanserin, *CNS Drug Rev.* **2002**, 8, 117-42
61. I. Dhanuka, J. A. Simon, Flibanserin for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in premenopausal women, *Expert Opin. Pharmacother.* **2015**, 16, 2523-2529
62. A. Herman, M. El Mansari, N. Adham, B. Kiss, B. Farkas, P. Blier, Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptors but not α_2 -Adrenoceptors in the Acute Electrophysiological Effects of Cariprazine in the Rat Brain In Vivo, *Mol Pharmacol.* **2018**, 94, 1363-1370
63. K. Maeda, H. Sugino, H. Akazawa, N. Amada, J. Shimada, T. Futamura, H. Yamashita, N. Ito, R. D. McQuade, A. Mørk, A. L. Pehrson, M. Hentzer, V. Nielsen, C. Bundgaard, J. Arnt, T. B. Stensbøl, T. Kikuchi, Brexpiprazole I: *In Vitro* and *In Vivo* Characterization of a Novel Serotonin-Dopamine Activity Modulator, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, 350, 589-60

64. M. Ruat, E. Traiffort, R. Leurs, J. Tardivel-Lacombe, J. Diaz, J. M. Arrang, J. C. Schwartz, Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 8547-8551
65. M.Z. Wróbel, A. Chodkowski, F. Herold, M. Marciniak, M. Dawidowski, A. Siwek, G. Starowicz, K. Stachowicz, B. Szewczyk, G. Nowak, M. Belka, T. Bączek, G. Satała, A. J. Bojarski, J. Turło, Synthesis and biological evaluation of new multi-target 3-(1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione derivatives with potential antidepressant effect, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 183, 111736
66. T. Heinrich, H. Bottcher, R. Gericke, G. D. Bartoszyk, S. Anzali, C. A. Seyfried, H. E. Greiner, C. van Amsterdam, Synthesis and Structure-Activity Relationship in a Class of Indolebutylpiperazines as Dual 5-HT_{1A} Receptor Agonists and Serotonin Reuptake Inhibitors, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4684-4692
67. A. Scandroglio, E. Monferini, F. Borsini, *Ex vivo* binding of flibanserin to serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, *Pharmacol. Res.* **2001**, 43, 179-183
68. D. A Shapiro, S. Renock, E. Arrington, L. A Chiodo, L. Liu, D. R Sibley, B. L Roth, Aripiprazole, A Novel Atypical Antipsychotic Drug with a Unique and Robust Pharmacology, *Neuropsychopharmacol.* **2003**, 28, 1400–1411
69. K. Maeda, H. Sugino, H. Akazawa, N. Amada, J. Shimada, T. Futamura, H. Yamashita, N. Ito, R. D. McQuade, A. Mørk, A. L. Pehrson, M. Hentzer, V. Nielsen, C. Bundgaard, J. Arnt, T. B. Stensbøl, T. Kikuchi, Brexpiprazole I: *in vitro* and *in vivo* Characterization of a Novel Serotonin-Dopamine Activity Modulator, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2014**, 350, 589-60
70. L. Xu, S. Zhou, K. Yu, B. Gao, H. Jiang, X. Zhen, W. Fu, Molecular Modeling of the 3D Structure of 5-HT_{1A}R: Discovery of Novel 5-HT_{1A}R Agonists *via* Dynamic Pharmacophore-Based Virtual Screening, *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 12, 3202–3211
71. W. Wang, L. Zheng, W. Li, C. Zhu, W. Peng, B. Han, W. Fu, Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Studies of Novel Indolylalkylpiperazine Derivatives as Selective 5-HT_{1A} Receptor Agonists, *Chem. Inf. Model.* **2020**, 60, 1, 235–248
72. J. Jin, K. Zhang, F. Dou, C. Hao, Y. Zhang, X. Cao, L. Gao, J. Xiong, X. Liu, B. Liu, G. Zhang, Y. Chen, Isoquinolinone derivatives as potent CNS multi-receptor D₂/5-HT_{1A}/

5-HT_{2A}/5-HT₆/5-HT₇ agents: Synthesis and pharmacological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 207, 112709

73. H.J. Möller, Risperidone: a review, *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, 6, 803-818

74. P. Zajdel, K. Marciniak, K. Kamiński, V. Canale, A. J. Bojarski, T. Kos, P. Popik, WO2016003296A, **2016**

75. P. Zajdel, T. Kos, K. Marciniak, G. Satała, V. Canale, K. Kamiński, M. Hołuj, T. Lenda, R. Koralewski, M. Bednarski, L. Nowiński, J. Wójcikowski, W.A. Daniel, A. Nikiforuk, I. Nalepa, P. Chmielarz, J. Kuśmierczyk, A. J. Bojarski, P. Popik, Novel multi-target azinesulfonamides of cyclic amine derivatives as potential antipsychotics with pro-social and pro-cognitive effects, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 145, 790-804

76. P. Kowalski, K. Mitka, J. Jaśkowska, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, New Arylpiperazines with Flexible versus Partly Constrained Linker as Serotonin 5-HT_{1A}/5-HT₇ Receptor Ligands, *Arch Pharm*, **2013**, 346, 339-348

77. R. A. Glennon, Serotonin receptors and site-selective agents, *Journal of Psychology and Psychopharmacology*, **1991**, 42, 49-60

78. M. J. Mokrosz, P. Kowalski, T. Kowalska, Z. Majka, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, A. Fruzinski, J. Karolak-Wojciechowska, A. Wesolowska, A. Klodzinska, E. Tatarczynska, E. Chojnacka-Wojcik, Novel 1,4-Benzoxazin-3(4H)-one, 1,2-Benzoxazolin-3-one and 1,3-Benzoxazolin-2,4-dione Arylpiperazine Derivatives with Different 5-HT_{1A} and Antagonistic 5-HT_{2A} Activities, *Arch Pharm*, **1999**, 332, 373-379

79. P. Kowalski, J. Jaśkowska, A. J. Bojarski, B. Duszyńska, The synthesis of cyclic and acyclic long-chain arylpiperazine derivatives of salicylamide as serotonin receptor ligands, *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, 45, 209-214

80. P. Kowalski, J. Jaśkowska, A. J. Bojarski, B. Duszyńska, A. Bucki, M. Kołaczkowski, Evaluation of 1-Arylpiperazine Derivative of Hydroxybenzamides as 5-HT_{1A} and 5-HT₇ Serotonin Receptor Ligands: An Experimental and Molecular Modeling Approach, *J. Heterocyclic Chem.* **2011**, 48, 192-198

81. K. M. Blattner, D. J. Canney, D. A. Pippin, B. E. Blass, Pharmacology and Therapeutic Potential of the 5-HT₇ Receptor, *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, 10, 1, 89-119

82. D. Guseva, A. Wirth, E. Ponimaskin, Cellular mechanisms of the 5-HT₇ receptor-mediated signaling, *Front. Behav. Neurosci.* **2014**, 8, 306
83. J. M. Monti, H Jantos, The role of serotonin 5-HT₇ receptor in regulating sleep and wakefulness, *Rev. Neurosci.* **2014**, 25, 429–437
84. A. J. Roberts, T. Krucker, C. L Levy, K. A. Slanina, J. G. Sutcliffe, P. B. Hedlund, Mice Lacking 5-HT₇ Receptors Show Specific Impairments in Contextual Learning, *Eur. J. Neurosci.* **2004**, 19, 1913–1922
85. A. J. Roberts, P. B. Hedlund, The 5-HT₇ receptor in learning and memory. Importance of the hippocampus, *Hippocampus*, **2012**, 22, 762-771
86. A. Brenchat, M. Rocasalbas, D. Zamanillo, M. Hamon, J. M. Vela, L. Romero, Assessment of 5-HT₇ Receptor Agonists Selectivity Using Nociceptive and Thermoregulation Tests in Knockout versus Wild-Type Mice, *Adv.Pharmacol. Sci.* **2012**, 2012, 312041
87. O. M. Balcer, M. A. Seager, S. D. Gleason, X. Li, K. Rasmussen, J. K. Maxwell, G. Nomikos, A. Degroot, J.M. Witkin, Evaluation of 5-HT₇ receptor antagonism for the treatment of anxiety, depression, and schizophrenia through the use of receptor-deficient mice, *Behav. Brain Res.* **2019**, 360, 270-278
88. L. Wang, Y. Zhang, C. Wang, X.Zhang, Z. Wang, X. Liang, A. Alachkar, O. Civelli, A Natural Product with High Affinity to Sigma and 5-HT₇ Receptors as Novel Therapeutic Drug for Negative and Cognitive Symptoms of Schizophrenia, *Neurochem. Res.* **2019**, 44, 2536–2545
89. A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, K. Popiołek-Barczyk, A. Ciechanowska, J. Mika, G. Satała, M. Walczak, G. Latacz, J. Handzlik, K. Kieć-Kononowicz, E. Ponimaskin, S. Schade, A. Zeug, M. Bijata, M. Kubicki, R. Kurczab, T. Lenda, J. Staroń, R. Bugno, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, Fluorinated indole-imidazole conjugates: Selective orally bioavailable 5-HT₇ receptor low-basicity agonists, potential neuropathic painkillers, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 170, 261-275
90. J. Cortes-Altamirano, A. Olmos-Hernandez, B. Jaime, Herlind, P. Carrillo-Mora, S. Reyes-Long, A. Alfaro-Rodríguez, Review: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT₇ Receptors and

their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System, *Curr. Neuropharmacol.* **2018**, 16, 210-221

91. B. Sahin, E. Ozdemir, E. Gumus, M. Ergul, A. S. Taskiran, The 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 alleviates seizure activity and downregulates hippocampal c-Fos expression in pentylentetrazole-induced kindled rats, *Neurol. Res.* **2022**, 44, 786-796

92. J. Gautam, S. Banskota, S. Chandra, R. Subi Ahn, Y. H. Jeon, H. Jeong, S. J. Kim, T. Nam, B. Jeong, J. Kim, Tryptophan hydroxylase 1 and 5-HT₇ receptor preferentially expressed in triple-negative breast cancer promote cancer progression through autocrine serotonin signaling, *Mol. Cancer*, **2016**, 15, 75

93. X. Du, T. Wang, Z. Wang, X. Wu, Y. Gu, Q. Huang, J. Wang, J. Xie, 5-HT₇ Receptor Contributes to Proliferation, Migration and Invasion in NSCLC Cells, *OncoTargets Ther.* **2020**, 13, 2139–2151

94. I. Cinar, B. Sirin, Z. Halici, S. S. Palabiyik-Yucelik, E. Akpinar, E. Cadirci, 5-HT₇ receptors as a new target for prostate cancer physiopathology and treatment: an experimental study on PC-3 cells and FFPE tissues, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2021**, 394, 1205-1213

95. S. L. Thirumaran, A. Lepailleur, C. Rochais, Structure-activity relationships of serotonin 5-HT₇ receptors ligands: A review, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 183, 111705

96. K. Kucwaj-Brysz, H. Baltrukevich, K. Czarnota, J. Handzlik, Chemical update on the potential for serotonin 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor agents in the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 49, 128275

97. M. Leopoldo, Serotonin 7 Receptors (5-HT₇Rs) and their Ligands, *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 629-661

98. P. Zajdel, K. Marciniak, A. Maslankiewicz, M. Paluchowska, G. Satala, A. Partyka, M. Jastrzebska-Wiesek, D. Wrobel, A. Wesolowska, B. Duszynska, A. J. Bojarski, M. Pawlowski, Arene- and quinolinesulfonamides as novel 5-HT₇ receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 6750–6759

99. R. J. Mattson, D. J. Denhart, J. D. Catt, M. F. Dee, J. A. Deskus, J. L. Ditta, J. Epperson, H. King, A. Gao, M.A. Poss, A. Purandare, D. Tortolani, Y. Zhao, H. Yang, S. Yeola, J.

Palmer, J. Torrente, A. Stark, G. Johnson, Aminotriazine 5-HT₇ antagonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4245-4248

100.D. J. Denhart, A. V. Purandare, J. D Catt, H. King, A. Gao, J. A. Deskus, M. A Poss, A. D. Stark, J. R Torrente, G. Johnson, R. J. Mattson, Diaminopyrimidine and diaminopyridine 5-HT₇ ligands, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 14, 4249-4252

101.T. Ishibashi, T. Horisawa, K. Tokuda, T. Ishiyama, M. Ogasa, R. Tagashira, K. Matsumoto, H. Nishikawa, Y. Ueda, S. Toma, H. Oki, N. Tanno, I. Saji, A. Ito, Y. Ohno, M. Nakamura, Pharmacological Profile of Lurasidone, a Novel Antipsychotic Agent with Potent 5-Hydroxytryptamine 7 (5-HT₇) and 5-HT_{1A} Receptor Activity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, 334, 171-81

102.T. Enomoto, T. Ishibashi, K. Tokuda, T. Ishiyama, S. Toma, A. Ito, Lurasidone reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the Morris water maze and radial-arm maze tests in rats. *Behav. Brain Res.* **2008**, 186, 197–207

103.B. Volk, J. Barkoczy, E. Hegedus, S. Udvari, I. Gacsalyi, T. Mezei, K. Pallagi, H. Kompagne, G. Levay, A. Egyed, L. G. Harsing, M. Spedding, G. Simig, (Phenylpiperazinylbutyl)oxindoles as selective 5-HT₇ receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2522–2532

104.B. Volk, I. Gacsalyi, K. Pallagi, L. Poszavacz, I. Gyonos, E. Szabo, T. Bako, M. Spedding, G. Simig, G. Szenasi, Optimization of (arylpiperazinylbutyl)oxindoles exhibiting selective 5-HT₇ receptor antagonist activity, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 6657–6669

105.E. Lacivita, P. Di Pilato, M. L. Stama, N. A. Colabufo, F. Berardi, R. Perrone, B. De Filippis, G. Laviola, W. Adriani, M. Niso, M. Leopoldo, Novel highly potent serotonin 5-HT₇ receptor ligands: structural modifications to improve pharmacokinetic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 6083–6086

106.E. Lacivita, S. Podlewska, L. Speranza, M. Niso, G. Satala, R. Perrone, C. Perrone-Capano, A. J. Bojarski, M. Leopoldo, Structural modifications of the serotonin 5-HT₇ receptor agonist N(4-cyanophenylmethyl)-4-(2-biphenyl)-1-piperazinehexanamide (LP211) to improve *in vitro* microsomal stability: a case study, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 120, 363–379

107.G. Latacz, A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, A. Lubelska, J. M. Wierońska, M. Woźniak, P. Cieślík, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, A. J. Bojarski, In search for a 5-CT alternative. In vitro and in vivo evaluation of novel pharmacological tools: 3-(1-alkyl-1H-imidazol-5-yl)-

1Hindole-5-carboxamides, low-basicity 5-HT₇ receptor agonists, *Med. Chem. Commun.* 2018,9, 1882-1890

108.M. Leopoldo, E. Lacivita, P. De Giorgio, C. Fracasso, S. Guzzetti, S. Caccia, M. Contino, N. A. Colabufo, F. Berardi, R. Perrone, Structural Modifications of N-(1,2,3,4-Tetrahydronaphthalen-1-yl)-4-Aryl-1-piperazinehexanamides: Influence on Lipophilicity and 5-HT₇ Receptor Activity. Part III, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5813–5822

109.P. J. Lovell, S. M. Bromidge, S. Dabbs, D. M. Duckworth, I. T. Forbes, A. J. Jennings, F. King, D. N. Middlemiss, S. K. Rahman, D. V. Saunders, L. L. Collin, J. J. Hagan, G. J. Riley, D. R. Thomas, A Novel, Potent, and Selective 5-HT₇ Antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-Methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-Sulfonyl)phenol (SB-269970), *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 342–345

110.A. S. Hogendorf, A. Hogendorf, R. Kurczab, G. Satala, T. Lenda, M. Walczak, G. Latacz, J. Handzlik, K. Kiec-Kononowicz, J. M. Wieronska, M. Wozniak, P. Cieslik, R. Bugno, J. Staron, A. J. Bojarski, Low-basicity 5-HT₇ receptor agonists synthesized using the van Leusen multicomponent protocol. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1444

111.L. G. Ferreira, R. N. Dos Santos, G. Oliva, A. D. Andricopulo, Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies; *Molecules*, **2015**, 20, 13384-421

112.O. F Güner, History and evolution of the pharmacophore concept in computer-aided drug design, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 1321-32

113.M. J. Mokrosz, B. Duszyńska, A. J. Bojarski, J. L. Mokrosz, Structure-Activity Relationship Studies of CNS Agents – XVII. Spiro[piperidine-4',1-(1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline)] as a Probe Defining the Extended Topographic Model of 5-HT_{1A} Receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 533-538

114.Z. Chilmonczyk, A. Szelejewska-Woźniakowska, J. Cybulski, M. Cybulski, A. E. Koziół, M. Gdaniec, Conformational Flexibility of Serotonin_{1A} Receptor Ligands from Crystallographic Data. Updated Model of the Receptor Pharmacophore, *ArchPharm*, **1997**, 330, 146-160

115.A. Lepailleur, R. Bureau, M. Paillet Loilier, F. Fabis, N. Saettel, S. Lemaitre, F. Dauphin, A. Lesnard, J.-Ch. Lancelot and S. Rault J. Molecular modeling studies focused on 5-HT₇

versus 5-HT_{1A} selectivity. Discovery of novel phenylpyrrole derivatives with high affinity for 5-HT₇ receptors, *Chem. Inf. Model.* **2005**, 45, 1075

116.M. L. López-Rodríguez,; E. Porrás, M. J. Morcillo, B. Benhamú, L. J. Soto, J. Lavandera, J. A. Ramos, M. Olivella, M. Campillo, L. Pardo, Optimization of the Pharmacophore Model for 5-HT₇ Antagonism. Design and Synthesis of New Naphtholactam and Naphthosultam Derivatives. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5638–5650

117.O. M. Becker, D. S. Dhanoa, Y. Marantz, D.Chen, S. Shacham, S. Cheruku, A. Heifetz, P. Mohanty, M. Fichman, A. Sharadendu, R. Nudelman, M. Kauffman S. Noiman, An Integrated in Silico 3D Model-Driven Discovery of a Novel, Potent, and Selective Amidosulfonamide 5-HT_{1A} Agonist (PRX-00023) for the Treatment of Anxiety and Depression, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3116–3135

118.S. M. Stahl, L. Kaiser, J. Roeschen, J. M. Keppel Hesselink, J. Orazem, Effectiveness of ipsapirone, a 5-HT-1A partial agonist, in major depressive disorder: support for the role of 5-HT_{1A} receptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressants, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **1998**, 1, 11-18

119.J. Traber, K. Opitz; US4895848A, **1990**

120.F. M. Awadallah, F. Muller, J. Lehmann, A.H. Abadi, Synthesis of novel lactam derivatives and their evaluation as ligands for the dopamine receptors, leading to a D₄-selective ligand, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 15, 5811–5818

121.M. Abou-Gharbia, J.A. Moyer, U. Patel, Synthesis and structure-activity relationship of substituted tetrahydro- and hexahydro-1,2-benzisothiazol-3-one 1,1-dioxides and thiadiazinones: potential anxiolytic agents, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1024–1033

122.G. Caliendo, F. Fiorino, E. Perissuttia, B. Severino, D. Scolaro, S. Gessi, E. Cattabriga, P. A. Borea, V. Santagada, A convenient synthesis by microwave heating and pharmacological evaluation of novel benzoyltriazole and saccharine derivatives as 5-HT_{1A} receptor ligands, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, 16, 15–28

123.Y. Cheng, W. H. Prusoff, Relationship between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I₅₀) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099–3108

- 124.G. Latacz, A. Lubelska, M. Jastrzebska-Wiesek, A. Partyka, K. Kucwaj-Brysz, A. Wesółowska, K. Kiec Kononowicz, J. Handzlik, MF-8, a novel promising arylpiperazine-hydantoin based 5-HT₇ receptor antagonist: *In vitro* drug-likeness studies and *in vivo* pharmacological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28, 878–883
- 125.G. Latacz, A. Lubelska, M. Jastrzebska-Wiesek, A. Partyka, A. Sobiło, A. Olejarz, K. Kucwaj-Brysz, G. Satała, A. J. Bojarski, A. Wesółowska In the search for a lead structure among series of potent and selective hydantoin 5-HT₇R agents: The drug-likeness *in vitro* study. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, 90, 1295–1306
- 126.OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; Section 2; OECD Publishing: Paris, France, **2013**
- 127.A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucl Acids Res.* **2018**, 46, 296–303
- 128.D. Warszycki, M. Rueda, S. Mordalski, K. Kristiansen, G. Satała, K. Rataj, Z. Chilmonczyk, I. Sylte, R. Abagyan, A. J. Bojarski, From Homology Models to a Set of Predictive Binding Pockets—a 5-HT_{1A} Receptor Case Study, *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, 57, 311–321
- 129.M. Nowak, M. Kołaczkowski, M. Pawłowski, A. J. Bojarski, Homology modeling of the serotonin 5-HT_{1A} receptor using automated docking of bioactive compounds with defined geometry, *J. Med.Chem.* **2006**, 49, 205–214
- 130.M. L. López-Rodríguez, M. J. Morcillo, E. Fernández,, B. Benhamú,, I.Tejada, D. Ayala, A. Viso, M. Campillo, L. Pardo, M. Delgado, J. Manzanares, J. A. Fuentes, Synthesis and Structure–Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines. 8. 1 Computational Simulation of Ligand–Receptor Interaction of 5-HT_{1A}R Agonists with Selectivity over α_1 -Adrenoceptors, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2548–2558
- 131.M. Kołaczkowski, M. Nowak, M. Pawłowski, A. J. Bojarski, Receptor-Based Pharmacophores for Serotonin 5-HT₇R Antagonists Implications to Selectivity, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6732-6741

- 132.Z. Xu, Z. Yang, Y. Liu, Y. Lu, K. Chen, W. Zhu, Halogen Bond: Its Role beyond Drug–Target Binding Affinity for Drug Discovery and Development, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 69–78
- 133.G. Groszek, M. Bednarski, M. Dybała, B. Filipek, Synthesis and adrenolytic activity of 1-(1H-indol-4-yloxy)-3-{[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino}propan-2-ol and its enantiomers. Part 1, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 809-817
- 134.P. Murray-Rust, J .P. Glusker, Directional hydrogen bonding to sp²- and sp³-hybridized oxygen atoms and its relevance to ligand-macromolecule interactions, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 1018–1025
- 135.A. Karshikoff, I. Jelesarov, Salt Bridges and Conformational Flexibility: Effect on Protein Stability, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2008**, 22, 606-611

Pełna treść cyklu publikacji objętych pracą doktorską (D01 – D06)

D01. **Damian Kulaga**, Jolanta Jaśkowska, Radomir Jasiński – Microwave-Assisted Solvent-Free Synthesis of Ipsapirone, *J. Heterocyclic Chem.* **2019**, 56, 1498-1504 IF*=1.399

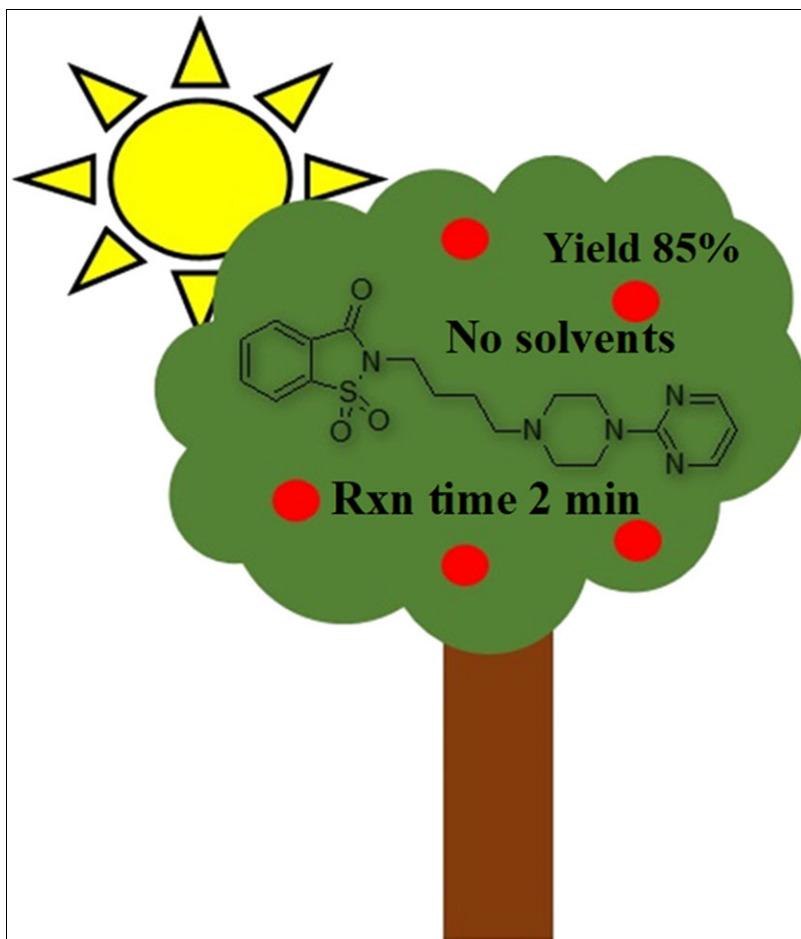
Faculty of Chemical Engineering and Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków, Poland

*E-mail: dkulaga@chemia.pk.edu.pl

Received October 4, 2018

DOI 10.1002/jhet.3520

Published online 00 Month 2019 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).



The currently applied synthetic methods of serotonin receptor ligands belonging to the group of long-chain arylpiperazines, including ipsapirone, require the use of toxic solvents and comprise numerous synthetic steps. Moreover, the reaction yield does not exceed 60% in the majority of cases. These factors lead to an increased energy consumption and negatively impact the environment. This paper describes a more environmentally friendly method of ipsapirone synthesis that we decided to use. Ipsapirone was obtained in two different methods. The first method involved *N*-alkylation of bromobutyl saccharin with 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride, while the second was a one-pot method. Neither of these requires the use of toxic and expensive solvents. A shortened synthesis time, not exceeding 10 min due to the use of microwave radiation, is also another advantage of these methods. The yield of the final product, ipsapirone, was 85% and 67% in the first and the second method, respectively. We also attempted to obtain ipsapirone using saccharin and arylpiperazine salt (method III) as starting materials, but to no avail in the tested conditions. As described herein, the green chemistry method for ipsapirone synthesis is rapid, cost-effective, and environment friendly.

INTRODUCTION

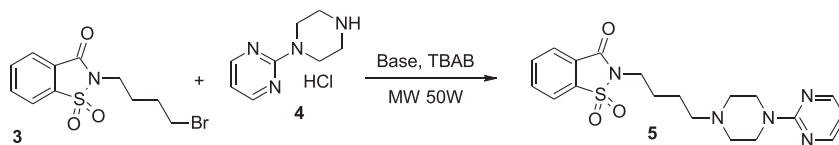
According to reports by the World Health Organization [1], depression and diseases affecting the central nervous system (CNS) will be one of the main burdens hindering the functioning of the human population [2,3]. Modern methods of treatment for these conditions include using a wide range of medications acting on the CNS, but each of them can cause side effects, and as much as 30% of patients do not respond to treatment at all. One of the known compounds that can be used in the treatment of CNS diseases is ipsapirone, belonging to the class of azapirones [4]. Ipsapirone, 2-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)benzo[*d*]isothiazol-3(2*H*)-one 1,1-dioxide, is a known ligand with anxiolytic, anti-depressive [3], and anti-aggressive effects, and a partial antagonist of the 5-HT_{1A} receptor [5]. It can also be used to treat alcohol dependence [6]. From a chemical point of view, the discussed compound is a long-chain arylpiperazine, composed of a pyrimidylpiperazine linked *via* a butyl moiety to saccharin. Ipsapirone synthesis has not been widely described in the literature and patents. One of several known methods of ipsapirone synthesis, claimed in a patent, consists of a four-step reaction [7]. Such synthesis, however, requires the use of toxic and expensive solvents such as dimethylformamide (DMF) or oxygenate-derived reagents, and the entire process is long, taking about 24 h. The total yield of ipsapirone is less than 40%. In turn, another patent reports that ipsapirone can be synthesized by an alkylation reaction of *N*-bromobutyl saccharin and 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride [6]. Similarly to the previous patent, the inventors use toxic DMF as a solvent, and the synthesis time is 1 h, with yield amounting to 34%. The scientific literature provides a general method for the synthesis of ipsapirone analogues [8–10] (but not ipsapirone itself) by alkylation of saccharin with a suitable alkylarylpiperazine salt. As already described herein, the standard method requires mixing substrates with potassium carbonate and

a suitable solvent, such as DMF [9] or ACN [11] to obtain a product with a yield below 60%. However, ipsapirone can be obtained in another reaction. *N*-Alkylation of bromobutyl saccharin with 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride (Scheme 1) appears to be the most obvious route. Moreover, ipsapirone can also be synthesized in a one-pot approach by reacting saccharin, 1,4-dibromobutane, and 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride (Scheme 2). This approach is advantageous by lack of need for intermediate isolation, and resulting improvement of economic aspects of the entire process. Having considered the previously described economic and ecological aspects, we decided to employ a cost-effective, innovative, and environmentally friendly method: a solvent-free microwave-assisted reaction, simultaneously being part of a green chemistry trend.

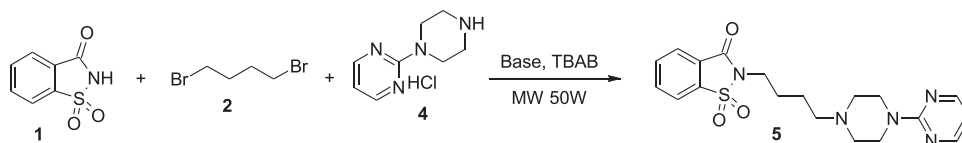
RESULTS AND DISCUSSION

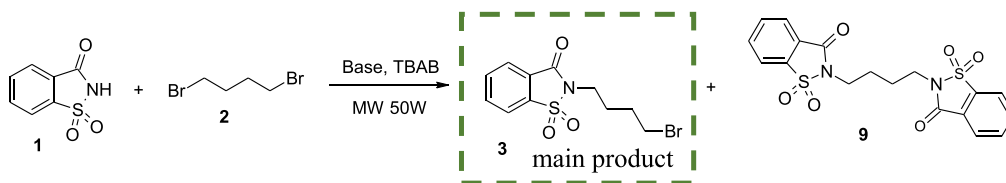
Chemistry. *N*-alkylation of saccharine. The initial stage of our research involved the development of an efficient method for the synthesis of *N*-bromobutyl saccharin **3** in a solvent-free microwave-assisted reaction. In our previous papers, we described *N*-alkylation of imides under conventional methodology, in a solvent-free conditions [12]. Fiorino et al. [13] describes a microwave-assisted *N*-alkylation of saccharin **1**, however, with the use of solvents. In this paper, we decided to combine these two methods and obtain an alkylated saccharin **3** in solvent-free, microwave-assisted conditions (Scheme 3). We have started our research with determining the appropriate molar amounts of reactants. As a starting point, 1 eq of saccharin **1**, 3 eq of K₂CO₃ as a base, and 1.1 eq of alkylating agent **2** were used. Because reagents do not mix with each other, a phase transfer catalyst, that is, 0.1 eq *tert*-butylammonium bromide (TBAB), was used to facilitate the reaction. The

Scheme 1. Synthesis of ipsapirone according to method 1.



Scheme 2. Synthesis of ipsapirone according to (one-pot) method 2.



Scheme 3. *N*-Alkylation of saccharine. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

reaction was carried out in the presence of 1 wt% DMF relative to saccharin **1**, which was used as a medium to transfer microwave energy [14]. The synthesis time was 50 s. The results are summarized in Table 1 (items 1–4). The progress of the reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC). Average yield of reaction (item 1) is caused by formation of significant amounts of the disubstituted product **9**. Excess of 1,4-dibromobutane (item 2) increases the selectivity of the reaction toward the formation of *N*-bromobutyl saccharine **3**. Impurities observed in TLC were not isolated. It has been determined that the optimal excess of alkylation agent is 2.5 eq. Larger excess does not have a major effect on the reaction progress and may cause problem issues with the crystallization of the product. Because Jaškowska et al. [12] report that the optimal amount of potassium carbonate in the *N*-benzylation of phthalimide is 3 eq, while Fiorino et al. [13] uses only 1.5 eq of K_2CO_3 in the alkylation reaction of saccharin **1**, we decided to study and describe the effect of the amount of base on the reaction yield. The results are shown in Table 1 (items 5–8). Based on the TLC analysis, an increased amount of potassium carbonate promotes formation of impurities. When 1.5 eq of K_2CO_3 was used, we observed only spots attributable to *N*-bromobutyl saccharin **3** and traces of disubstituted product **9**. In addition, we decided to evaluate the effect of DMF addition; therefore, a complete synthesis of *N*-bromobutyl saccharine **3** was run without DMF addition. Having analyzed by TLC, the reaction mixture after 50 s of reaction, partial formation of product **3**, and significant amount of unreacted saccharin **1** were noticed. The reaction was then continued for 2 min. After this time,

TLC indicated the presence of the desired product **3** a by-product **9** and other impurities. In this case, *N*-bromobutyl-saccharin **3** was not isolated. Our research also compared the effects of addition of ACN instead of DMF, and NaOH and Et_3N instead of K_2CO_3 as a base, as well as the catalytic amounts of KI instead of TBAB. In all the reactions with ACN, formation of numerous by-products was observed in TLC. The desired product was not isolated. Using NaOH as a base, TLC analysis indicated that during the first 10 s of heating, only product **3** was formed and the presence of unreacted substrate **1** was observed as before, while longer reaction times caused degradation of product **3** and led to formation of vast amounts of impurities; in this case, the product has not been isolated as well. Satisfactory results (85% yield) were observed only in the case of using triethylamine instead of potassium carbonate.

Synthesis of ipsapirone: Method 1. Ipsapirone analogues obtained by *N*-alkylation were presented as an examples of the conventional method, and microwave-assisted method between appropriate bromoalkylimide and 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride **4** and are well known in the literature [15,16]. However, both of these synthetic approaches need toxic solvents to be used. Reaction times are also relatively long and, in microwave syntheses, often exceed 1 h. The initial step of ipsapirone **5** synthesis using a solvent-free method supported by microwave radiation is similar to this of *N*-bromobutyl saccharin **3** synthesis described previously. In this experiment, we determined the effect of addition of various bases on the reaction yield, and the results are presented in Table 2 (items 9–18). Values listed in the table show that the synthesis of ipsapirone **5** gives higher yields (of about 80%) in the presence of weak inorganic bases, such as potassium carbonate or calcium hydroxide. Carrying out the reaction in these conditions is also advantageous in the context of reaction time, as the use of K_2CO_3 shortened the reaction time to 1 min, while reaction in the presence of $Ca(OH)_2$ took 2 min. TLC analysis indicated the presence of the main product ipsapirone **5** and traces of 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride **4**, which was used in 10% molar excess. Using stronger inorganic bases, such as sodium hydroxide or potassium hydroxide, decreased the reaction yield to a point where no final product was isolated. TLC analysis revealed the presence of ipsapirone **5** traces and

Table 1

Impact of 1,4-dibromobutane and base amounts on the yield in *N*-alkylation reaction of saccharine.

Item	1,4-Dibromobutane (eq)	K_2CO_3 (eq)	Yield (%)
1	1.1	3	45
2	2.0	3	67
3	2.5	3	79
4	3.0	3	80
5	2.5	1.0	70
6	2.5	1.5	94
7	2.5	2.0	85
8	2.5	2.5	80

Table 2

Impact of various bases and solvents (DMF/ACN) on the yield in Ipsapirone synthesis.

Item	Base (3 eq)	DMF (wt%) ^b	ACN (wt%) ^c	Yield (%) ^a
9	K ₂ CO ₃	0.1	—	85
10	K ₂ CO ₃	—	0.1	0
11	K ₂ CO ₃	—	—	43
12	Et ₃ N	0.1	—	83
13	Et ₃ N	—	0.1	0
14	Et ₃ N	—	—	35
15	NaOH	0.1	—	0
16	NaOH	—	0.1	0
17	Ca(OH) ₂	0.1	—	75
18	Ca(OH) ₂	—	0.1	0

^aHydrochloride salt crystallized from acetone.^bReaction time of up to 2 min.^cReaction time of up to 10 min.

vast amounts of polar impurities. The mentioned weak inorganic bases can be considered as environmentally friendly, cost-effective, and easily available. Using triethylamine as a base for ipsapirone **5** synthesis allowed to obtain good yields over the reaction time of 2 min. However, due to the toxicity of this compound, this synthetic approach is not recommended. Investigating the effects of using DMF as a medium facilitating the reaction yielded interesting results. Reacting compounds in the presence of DMF accelerated the process very efficiently. In the case of K₂CO₃, the content of 1 wt% of DMF allowed to obtain the final product **5** with an 85% yield, while its absence reduced the yield of the reaction by 43%. When DMF was changed to ACN, no reaction progress was seen. Attempts to obtain ipsapirone **5** in the presence of ACN were repeated with addition of K₂CO₃, Ca(OH)₂, NaOH, and Et₃N gave no measurable effects. The final product was absent in the TLC analysis, even

Table 3

Impact of various bases on the reaction yield.

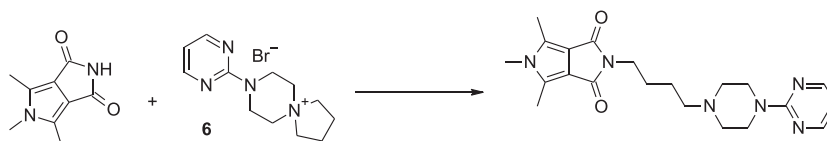
Item	Base (3 eq)	Yield (%) ^a
19	K ₂ CO ₃ ^b	52
20	Et ₃ N ^c	67
21	Ca(OH) ₂ ^b	60

^aHydrochloride salt crystallized from acetone.^bReaction time of up to 2 min.^cReaction time of up to 10 min.

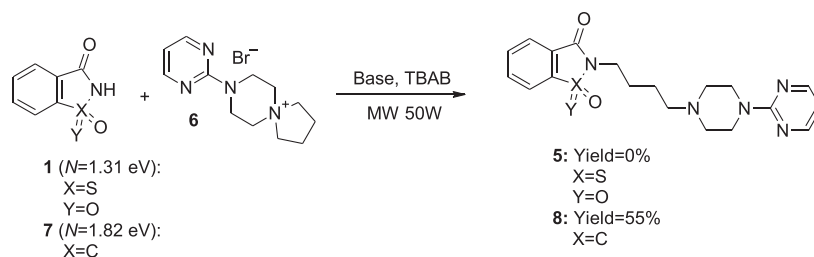
after prolonged heating for up to 10 min, although over this period, some mixtures get burned.

Synthesis of ipsapirone: Method 2 (one pot). So-called one-pot synthesis is one of the approaches in organic synthesis, which follows the principles of green chemistry, allowing one to obtain compounds in a clean, effective, economical, and quick manner [17]. In the case of ipsapirone **5**, the isolation step of *N*-bromobutyl-saccharine **3** can be omitted, thus shortening the synthesis time. Cybulski et al. [18] described the method for synthesis buspirone derivatives by a simultaneous reaction of 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride, 1,4-dibromobutane, and the corresponding imide. They reported high reaction yields for the final product with using xylene as a solvent and heating the mixture in a flask. Encouraged by this report, we decided to obtain ipsapirone **5** in a one-step reaction, without any solvents used for enhancing the microwave-assisted reaction; 1 eq of saccharin **1**, 2.5 eq of 1,4-dibromobutane **2**, and 1.1 eq of 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride **4** were used for the synthesis. The results are shown in Table 3. Ipsapirone **5** yield (52%) was slightly lower compared with the two-step synthesis, yet still acceptable. Lower yield is mainly attributable to a troublesome removal of 1,4-dibromobutane **2** excess upon the purification stage. TLC analysis of the reaction mixture revealed that addition of potassium carbonate as a base leads to formation of a greater number of impurities when compared with using triethylamine.

Synthesis of ipsapirone: Method 3. An alternative version of the *N*-alkylation reaction allowing to obtain ipsapirone **5** is a reaction between of 8-(pyrimidin-2-yl)-5,8-diazaspiro[4.5]decan-5-ium bromide **6** and saccharin **1**. Using a similar approach, Malinka et al. [19] obtained a series of imide derivatives (Scheme 4) with a high yield (60–80%), using potassium carbonate as a base and xylene as a solvent. Based on this report, we decided to check the yield of ipsapirone **5**. First, we obtained 8-(pyrimidin-2-yl)-5,8-diazaspiro[4.5]decan-5-ium bromide **6** by a conventional method described in the literature [19,20]. For this part of the research, we applied the same method as the one used for synthesis of *N*-bromobutyl saccharin **3**. The use of K₂CO₃ in line with the literature reports failed to give the product of interest. However, having exchanged K₂CO₃ to NaOH, we obtained the desired product with an 83% yield. In this case, 1 wt% addition of DMF was essential. Upon the

Scheme 4. Imide derivatives obtained by Cybulski et al. [18].

Scheme 5. Synthesis of ipsapirone and analogue according to method 3.



next stage, a possibility to obtain ipsapirone **5** was tested in accordance with Scheme 5, with determination of the effect of used bases (K_2CO_3 , Et_3N , and $Ca(OH)_2$) and the reaction time (1, 2, 5, and 10 min.) on the reaction yield. Ipsapirone **5** was not formed in any of the tested conditions, as shown by TLC and HPLC. Saccharin **1**, classified as moderately nucleophilic, is not as easily alkylated as its analogue, phthalimide **7**, which is the probable reason for the observed outcome. To check this further, we decided to perform a similar synthesis with phthalimide **7** instead of saccharin **1** (Scheme 5). In this reaction, 50% of the substrate was converted to the desired product after just a 1 min. Conversion was confirmed by TLC and UPLC-MS analyses. It was determined that the potentially attractive way for ipsapirone **5** synthesis using 8-(pyrimidin-2-yl)-5,8-diazaspiro[4.5]decan-5-ium bromide **6** is not achievable in the tested conditions. This phenomenon can be explained by the molecular electron density theory [21], which in recent years has been successfully used to explain the reactivity of components in numerous different types of bimolecular reactions [22–24]. The global nucleophilicity descriptors needed for this purpose (N) were obtained by calculating B3LYP/6-31G (d), using the equation proposed by Domingo [25]:

$$N = E_{HOMO} - E_{HOMO(\text{tetracyanoethene})}$$

The calculated value of N index for saccharine **1** was 1.31 eV, which classifies this compound as a marginal nucleophile. On the other hand, phthalimide **7** belongs to the group of moderate nucleophiles ($N = 1.82$ eV) on the Domingo reactivity scale [26]. This differentiation clearly explains why phthalimide **7** reacts in mild conditions, while the desired product cannot be obtained from saccharin **1**.

CONCLUSION

Ipsapirone **5**, a ligand acting on the CNS, was obtained in line with the green chemistry principles, with reduction or complete elimination of toxic and expensive solvents. Implementing a microwave-assisted approach shortened the synthesis time from a few hours to minutes. The most

efficient method for synthesis of ipsapirone **5** is a two-step N -alkylation of saccharin **1** in the first step and then N -bromobutyl saccharin **3** in the next. The one-pot method also seems to be fast and somehow efficient; however, difficulties with product separation may occur, as 1,4-dibromobutane **2** is hard to eliminate. Conversely, we failed to obtain ipsapirone **5** using method 3 due to the moderate nucleophilic index for saccharin **1**, preventing it from reacting. This conclusion was confirmed by quantum chemical calculations and the successful reaction in which saccharin **1** was replaced by phthalimide **7** (Scheme 5).

EXPERIMENTAL

All the reactants were purchased from commercial available suppliers. 1H NMR spectra were recorded using Bruker 300 and 400 MHz apparatuses with TMS as an internal standard. Melting points were determined with Bötetius apparatus. Waters UPLC with a PDA detector and 1.7 μm Aquity HPLC BEH C18 column was used for UPLC-MS analyses. Knauer HPLC with DAD detector and C18 1.4 μm column was used in HPLC analysis, with MeOH : H₂O + formic acid (4:6 + 0.1%) as a mobile phase. Analytical TLC was performed using 0.2 mm silica gel precoated aluminum sheets (60 F254, Merck), and UV light at 254 nm was used for visualization. SAMSUNG ME73M at 300–450 W of power was used for all the microwave-assisted reactions.

2-(4-Bromobutyl)benzo[d]isothiazol-3(2H)-one1,1-dioxide (3). Saccharine **1** (1 g, 5.46 mmol), potassium carbonate (1.13 g, 8.18 mmol), and TBAB (0.17 g, 0.53 mmol) were ground in the mortar. Next, 1,4-dibromobutane **2** (1.6 mL, 13.62 mmol) was added, followed by 53 μL of DMF. Mixture was reacted in a microwave reactor at 300 W for 50 s. After this time, TLC indicated that the reaction was completed. Mixture was purified *via* flash chromatography using 100% hexane to 100% methanol as eluents. Methanol phase was evaporated to dryness, and crude product was crystallized from MeOH to give 1.65 g of pure product. Melting point 71–72°C (ref. 71–72°C [27]); yield 95%; white solid; 1H NMR (300 MHz,

CDCl_3) δ 8.09–8.04 (m, 1H), 7.95–7.81 (m, 3H), 3.83 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.46 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.05–1.97 (m, 4H). UPLC-MS: 98.9%, $m/z = 318$.

Ipsapirone (5) (method 1). 2-(4-Bromobutyl)benzo[*d*]isothiazol-3(2*H*)-one 1,1-dioxide **3** (0.2 g, 0.63 mmol), potassium carbonate (0.26 g, 1.89 mmol), TBAB (0.029 g, 0.063 mmol), and 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride **4** (0.15 g, 0.63 mmol) were ground in the mortar; 6.45 μL of DMF was added, and the mixture was reacted in the microwave reactor at on 300 W for 60 s. After this time, TLC indicated that the reaction was completed. Mixture was diluted with water, extracted with ethyl acetate (3×10 mL), and organic phases were combined and evaporated. Crude product was dissolved in acetone, acidified with 4 M HCl in dioxane and cooled down in a freezer to obtain white crystals. The desired product was obtained as a hydrochloride salt. Melting point: 217–220°C (ref. 221–222°C [28]); yield 85%; white solid; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.50 (s, 1H), 8.45 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 8.16–7.97 (m, 4H), 6.77 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 14.1$ Hz, 2H), 3.79 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H), 3.58–3.51 (d, $J = 12$ Hz, 2H), 3.43–3.36 (d, $J = 20$ Hz, 2H), 3.18 (m, 2H), 3.02 (dd, $J = 20.6$ Hz, 8.9 Hz, 2H), 1.82 (m, 4H). UPLC-MS: 93%, $m/z = 401.14$.

Ipsapirone (5) (“one-pot” method 2). Saccharine **1** (0.5 g, 2.73 mmol), potassium carbonate (1.13 g, 8.18 mmol), and TBAB (0.087 g, 0.27 mmol) were ground in the mortar. Next, 1,4-dibromobutane **2** (0.8 mL, 6.9 mmol) was added, followed by 33 μL of DMF. Mixture was reacted in the microwave reactor at 300 W for 50 s, then 1-(2-pyrimidyl)piperazine dihydrochloride **4** (0.15 g, 0.63 mmol) was added and mixed in with a spatula. Mixture was placed again in the microwave reactor and reacted at 300 W for 120 s. After this time, TLC indicated that the reaction was completed. Mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3×10 mL), and organic phases were combined and evaporated. Crude product was dissolved in acetone, acidified with 4 M HCl in dioxane and cooled down in a freezer. The desired product was obtained as a hydrochloride salt. Melting point: 216–219°C (ref. 221–222°C [28]); yield 50%; white solid; UPLC-MS: 90%, $m/z = 401.52$.

8-(Pyrimidin-2-yl)-5,8-diazaspiro[4.5]decan-5-ium bromide (6). 2-(Piperazin-1-yl)pyrimidine dihydrochloride **4** (1 g, 4.24 mmol), sodium hydroxide (0.5 g, 12.5 mmol), and TBAB (0.13 g, 0.40 mmol) were ground in the mortar. Next, 1,4-dibromobutane **2** (1.22 mL, 10.54 mmol) was added, followed by 38 μL of DMF. Mixture was reacted in the microwave reactor at 450 W for 2×60 s. After this time, TLC indicated that the reaction was completed. The reaction mixture was cooled down to room temperature, diluted with *i*-PrOH, and boiled for a few

minutes. Insoluble inorganics were filtered off, and the filtrate was evaporated to dryness. The resulting semi-solid material was crystallized from *i*-PrOH. Melting point 245–247°C (ref. 241.5–242.5°C [29]); yield 83%; white solid; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.40 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 6.70 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H), 4.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H), 3.82 (t, $J = 3.9$ Hz, 4H), 2.44–2.39 (m, 4H). UPLC-MS = 100%, $m/z = 219$ [$\text{M}-\text{Br}^-$].

Synthesis of ipsapirone (5) (method 3). 8-(Pyrimidin-2-yl)-5,8-diazaspiro[4.5]decan-5-ium bromide **6** (0.3 g, 1 mmol), potassium carbonate (0.41 g, 2.97 mmol), TBAB (0.032 g, 0.1 mmol), and saccharine **1** (0.36 g, 2 mmol) were ground in the mortar; 23 μL of DMF was added to the mixture, and the mixture was placed in the microwave reactor and reacted at 300 W for 120 s. After this time, TLC and UPLC-MS indicated the presence of starting materials only.

2-(4-(4-(Pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)isoindoline-1,3-dione (8). 8-(Pyrimidin-2-yl)-5,8-diazaspiro[4.5]decan-5-ium bromide **6** (0.3 g, 1 mmol), potassium carbonate (0.41 g, 2.97 mmol), TBAB (0.032 g, 0.1 mmol), and phthalimide **7** (0.29 g, 2 mmol) were ground in the mortar; 22 μL of DMF was added to the mixture, and the mixture was placed in the microwave reactor and reacted at 300 W for 60 s. After this time, TLC indicated the presence of the desired product, unreacted substrates, and impurities. Mixture was diluted with water and extracted with ethyl acetate (3×10 mL), and organic phases were combined and evaporated. Crude product was crystallized from MeOH to give pure product. Melting point 137–139°C (ref. 138–139°C [30]); 55% yield; white solid; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (s, 2H), 7.78 (d, $J = 36.8$ Hz, 4H), 6.47 (s, 1H), 3.77 (d, $J = 25.4$ Hz, 6H), 2.45 (d, $J = 22.6$ Hz, 6H), 1.66 (d, $J = 47.0$ Hz, 2H). UPLC-MS = 92%, $m/z = 366$ [$\text{m} + \text{H}$].

Acknowledgments. The authors would like to thank The National Centre for Research and Development (Grant No. LIDER/015/L-6/14/NCBR/2015) for providing financial support for this project.

REFERENCES AND NOTES

- [1] World Health Organization, “Depression and other common mental disorders: global health estimates,” WHO/MSD/MER/2017 2, 2017, 1.
- [2] Samuels, B. A.; Leonardo, E. D.; Gadiant, R.; Williams, A.; Zhou, J.; David, D. J.; Gardier, A. M.; Wong, E. H. F.; Hen, R. *Neuropharmacology* 2012, 61, 408.
- [3] Garcia, A. G.; Newman-Tancredi, A.; Leonardo, E. D. *Psychopharmacology (Berl)* 2014, 231, 623.
- [4] Korte, S. M.; Bohus, B. *Eur J Pharmacol* 1990, 181, 307.

- [5] Stahl, S. M.; Kaiser, L.; Roeschen, J.; Hesselink, J. M. K.; Orazem, J. *Int J Neuropsychopharmacol* 1998, 1, 11.
- [6] Traber, J. K. Opitz; In Pat.No.: 4895848, 1990.
- [7] D. J. Coughlin, J.C. Wilt, D. M. Gou. US 20150361099 A1. 2015
- [8] De Simone, A.; Russo, D.; Ruda, G. F.; Micoli, A.; Ferraro, M.; Di Martino, R. M. C.; Ottonello, G.; Summa, M.; Armirotti, A.; Bandiera, T.; Cavalli, A.; Bottegoni, G. *J Med Chem* 2017, 60, 2287.
- [9] Awadallah, F. M.; Müller, F.; Lehmann, J.; Abadi, A. H. *Bioorg Med Chem* 2007, 15, 5811.
- [10] Heinrich, T.; Bottcher, H.; Gericke, R.; Bartoszyk, G. D.; Anzali, S.; Seyfried, C. A.; Greiner, H. E.; van Amsterdam, C. *J Med Chem* 2004, 47, 4684.
- [11] Glennon, R. A.; Naiman, N. A.; Lyon, R. A.; Titeler, M. *J Med Chem* 1988, 31, 1968.
- [12] J. Jaśkowska, P. Kowalski, *Czasopismo Techniczne*, 2008, 1–Ch, 13.
- [13] Fiorino, F.; Caliendo, G.; Perissutti, E.; Severino, B.; Frecentesea, F.; Preziosia, B.; Izzob, A. A.; Capassob, R.; Santagada, V. *Arch Pharm* 2005, 338, 548.
- [14] Bose, A. K.; Manhas, M. S.; Banik, B. K.; Robb, E. W. *Res Chem Intermed* 1994, 20, 1.
- [15] Tandon, M.; O'Donnell, M. M.; Porte, A.; Vensel, D.; Yang, D.; Palma, R.; Beresford, A.; Ashwell, M. A. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14, 1709.
- [16] Caliendo, G.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Scolaro, D.; Gessi, S.; Cattabriga, E.; Borea, P. A.; Santagada, V. *Eur J Pharm Sci* 2002, 16, 15.
- [17] Hayashi, Y. *Chem Sci* 2016, 7, 866.
- [18] Cybulski, J.; Chilmoneczyk, Z.; Szelejowski, W.; Wojtasiewicz, K.; Wróbel, J. T. *Arch Pharm* 1992, 325, 313.
- [19] Malinka, W.; Sieklucka-Dziuba, M.; Rajtar, G.; Rubaj, A.; Kleinrok, Z. *II Farmacoterapia* 1999, 54, 390.
- [20] W. Kinzebach. DE 3248160 A1. 1983
- [21] Domingo, L. R. *Molecules* 2016, 21, 1319.
- [22] Jasiński, R.; Jasińska, E.; Dresler, E. *J Mol Model* 2017, 23, 13.
- [23] Kula, K.; Łapczuk-Krygier, A. *Chem Lett* 2018, 7, 27.
- [24] Jasiński, R. *J Fluor Chem* 2016, 2018, 1.
- [25] Domingo, L. R.; Chamorro, E.; Perez, P. *J Org Chem* 2008, 73, 4615.
- [26] Jaramillo, P.; Domingo, L. R.; Chamorro, E.; Pérez, P. *J Mol Struct (THEOCHEM)* 2008, 865, 68.
- [27] Commerford, J. D.; Donahue, H. B. *J Org Chem* 1956, 21, 583.
- [28] George, W. A. *Drugs. Synonyms and Properties*; Ashgate Publishing Limited, 2000.
- [29] Davis, L. Temple, Jr; In CA1244426A, 1981.
- [30] Ishizumi, K.; Kojima, A.; Antoku, F. *Chem Pharm Bull* 1991, 39, 2288.

D02. **Damian Kulaga**, Jolanta Jaśkowska, Grzegorz Satała – Radioligand and computational insight in structure - Activity relationship of saccharin derivatives being ipsapirone and revospirone analogues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 42, 128028

IF*=2.774



Radioligand and computational insight in structure – Activity relationship of saccharin derivatives being ipsapirone and revospirone analogues

Damian Kułaga^{a,*}, Jolanta Jaśkowska^a, Grzegorz Satała^b

^a Faculty of Chemical Engineering and Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, 24 Warszawska Street, 31-155 Kraków, Poland

^b Department of Medicinal Chemistry, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 12 Smętna Street, 31-343 Kraków, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Ipsapirone
Microwave chemistry
Docking
5-HT ligands
D₂ ligands
SAR study

ABSTRACT

Schizophrenia and depression are diseases that significantly impede human functioning in society. Current antidepressant drugs are not fully effective. According to literature data, the effect on D₂R or 5-HT_{1A}R can effectively reduce the symptoms of depression or schizophrenia. Recent research hypothesized that the synergism of both of these receptors can improve the effectiveness of therapy. Ipsapirone, a representative of long-chain arylpiperazines, is a known 5-HT_{1A}R ligand that has antidepressant effect. This compound has no affinity for the D₂R. Bearing in mind, we decided to design ligands with improved affinity to D₂R and confirmed that in some cases elongation of the carbon linker or arylpiperazine exchange may have beneficial influence on the binding to D₂R and 5-HT_{1A}R. Four groups of ligands being ipsapirone analogues with butyl, pentyl, hexyl and stiffened xylene chains were designed. All compounds were obtained in *solvent-free* reactions supported by a microwave irradiation with an efficiency mainly above 60%. All ligands containing 1-(2-pyrimidinyl)piperazine exhibited high affinity to 5-HT_{1A}R. In this case, chemical modifications within the chain did not affect the affinity to D₂R. In the case of ligands containing 1-phenylpiperazine, 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine, 1-(1-naphthyl)piperazine, and 1-(4-chlorophenyl)piperazine, elongation of carbon linker increases of affinity to D₂R. For ligands containing 1-(2-pyridyl)piperazine, and 1-(2,3-dichlorophenyl)piperazine, we observed an opposite effect. For ligands containing 1-phenylpiperazine, 1-(2-methoxyphenyl)piperazine and 1-(2-pyridyl)piperazine, chain elongation had no effect on 5-HT_{1A}R binding. In turn of ligands containing 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine and 1-(2,3-dichlorophenyl)piperazine, we observed that elongation of carbon linker has a positive influence to 5-HT_{1A}R. Molecular modelling was used to support the SAR study.

Central nervous system (CNS) disorders such as depression or schizophrenia in the near future may become one of the main dysfunctions that impede human functioning in society. Despite the advances made in pharmacy in the context of CNS disorders, the currently used drugs still have numerous side effects.¹ Treatment of depression or schizophrenia is related with affecting on D₂R, 5-HT_{1A}R as well as 5-HT₆R or 5-HT₇R.²⁻⁶ 5-HT_{1A}R and D₂R are involved in depression or schizophrenia disorders.⁷⁻⁹ In major depressive disorders (MDD) patients, 5-HT_{1A}R agonists (such as buspirone or gepirone) are thought to act synergistically to increase 5-HT neurotransmission in postsynaptic structures (in the cortex and the limbic areas) and thus may exhibit antidepressant properties.^{4,10} Nevertheless, improvement in therapy can be obtained by acting additionally on D₂R. Dual D₂R/5-HT_{1A}R action seems to be more effective than single one. In a rat study, stimulation of

the 5-HT_{1A}R was shown to increase dopamine secretion in prefrontal cortex resulting in a reduction of schizophrenia-specific symptoms. Sumiyoshi et al.¹⁰ showed that buspirone or tandospirone in combination with haloperidol significantly improved the cognitive abilities of patients suffering from schizophrenia. Thus dual D₂R/5-HT_{1A}R ligands seem to be much more promising, with a broader spectrum of activity than single ones, however this hypothesis must be confirmed in further research.⁴

Ipsapirone belongs to a well-characterized group of azapirones. As it was mentioned above an anti-depressant effect is related to the release of serotonin in synaptic cleft in corticolimbic structures due to the substance's high affinity to postsynaptic 5-HT_{1A}R. Affecting these receptors may have additional modulatory effect on other neurotransmitter systems such as the glutamatergic system in various parts of brain.¹¹

* Corresponding author.

E-mail address: damian.kulaga@doktorant.pk.edu.pl (D. Kułaga).

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128028>

Received 22 December 2020; Received in revised form 25 March 2021; Accepted 4 April 2021

Available online 9 April 2021

0960-894X/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Ipsapirone exhibits anxiolytic, anti-depressant, and anti-aggressive properties in animal models.¹² as it acts as a postsynaptic partial agonist to 5-HT_{1A}R with $K_i = 7.9$ nM and no activity to D₂R.^{13–15} In the literature^{16–18} there is described only one analogue of ipsapirone with ethyl linker (A) that does not bind to 5-HT_{1A}R, two analogues of ipsapirone with propyl linker that bind to 5-HT_{1A}R with $K_i = 400$ nM for B and $K_i = 2$ nM for C (revospirone) and four four-carbon analogues of ipsapirone with known affinity to D₂R (four analogues) as well as 5-HT_{1A}R/5-HT_{2A}R (one analogue) (Table 1). In our previous research¹⁹ with saccharin being a terminal moiety of LCAP, we demonstrated that carbon linker extended up to six carbons may have a beneficial influence on affinity mostly to D₂R (Table 1). Taking into account that acting on both D₂R and 5-HT_{1A}R may have a beneficial influence in treatment of depression or schizophrenia, the aim of our work is to perform the full structure activity relationship analysis for ipsapirone analogues to confirm our hypothesis that elongation of carbon linker has a beneficial influence on affinity to D₂R/5-HT_{1A}R.

In the medicinal chemistry, hit-to-lead is a well-known approach, where a desirable pharmacological profile for protein/receptor is expected via various chemical modifications.²⁰ In the literature there are numerous reports about SAR (Structure Activity Relationship) study within LCAPs (Long Chain Arylpiperazines) including carbon linker and various arylpiperazine exchange (Table 2).^{7,21–24} In general, *N*-arylpiperazine itself exhibits moderate affinity and selectivity to the following receptors: serotonin²¹, dopamine²⁵, noradrenaline²⁶ as well as monoamine transporters.^{9–10} The functionalization of *N*-arylpiperazine by introducing a long chain core attached to the basic nitrogen of piperazine core may have beneficial influence on affinity to receptors.²¹ For example, 1-(2-methoxyphenyl)piperazine binds to 5-HT_{1A}R with $K_i = 68$ nM. Introducing phthalimide with ethyl linker (I) to basic nitrogen atom resulted in loss of activity to 5-HT_{1A}R ($K_i > 1000$ nM) (Table 2). Further elongation of carbon linker resulted in gain of affinity to 5-HT_{1A}R in the following pattern: propyl linker (J) $K_i = 13$ nM²¹, butyl linker (K – NAN-190) $K_i = 0.6$ nM²¹, pentyl linker (L) $K_i = 7.2$ nM²⁷, hexyl linker (M) $K_i = 22$ nM.²⁷ According to the NAN-190 SAR study, optimal carbon linker length is around 4 atoms. Shorter linker decreases affinity, and similar effects are observed for longer linkers as well. For salicylamide and 1,3-benzoxazine-2,4-dione in terminal position, the same trend has been observed (Table 2). Considering the SAR study for trazodone, elongation of carbon linker up to 6 atoms resulted in a near 5-fold increase of affinity to 5-HT_{1A}R.²³ Further research revealed that using other *N*-arylpiperazines such as 1-(2-methoxyphenyl)piperazine or 1-(3-methoxyphenyl)piperazine instead of 1-(3-chlorophenyl)piperazine dramatically increased affinity to D₂R/5-HT_{1A}R (Table 3).

In light of the above consideration, to fully perform structure activity relationship study of ipsapirone, we designed four groups of compounds. Compounds with flexible butyl, pentyl, hexyl chain and more rigid xylene linker have been chosen to find out the optimal length of carbon linker. Additionally, these four groups include various *N*-arylpiperazines in order to find their influence on binding to selected receptors (Fig. 1). In this study, we focused mostly on dual D₂R/5-HT_{1A}R effect, however, to examine their selectivity, binding to 5-HT_{2A}R, 5-HT₆R and 5-HT₇R were examined as well. We used molecular modelling to support the SAR study.

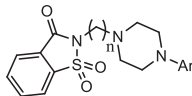
Designed compounds were obtained in solvent-free reactions with microwave irradiation. The procedure has already been described in our previous publications.^{19,31} Ligands from groups I, II and IV were obtained in three independent synthetic routes using two-step reactions (Scheme 1 and Scheme 2). For SAR study, ligands from group of III were taken from our previous publication.¹⁹

In the first step, a saccharin 1 is *N*-alkylated with appropriate alkyl halide 2i-2k. The first step was carried out in the presence of 3 equivalents of potassium carbonate, 0.1 equivalents of tetrabutylammonium bromide (TBAB), and 2–3 drops of *N,N*-dimethylformamide (DMF) or acetonitrile (ACN). Intermediates 3i and 3k were purified via crystallization from methanol, while 3j was purified using column chromatography. Reaction conditions for the second step were similar to those for the first one. Final products were purified using column chromatography. Pure ligands were transformed into HCl salts and subjected to radioligand assays.

The aim of this research was to elucidate SAR of LCAPs being saccharin derivatives with increased affinity to D₂R/5-HT_{1A}R. All ligands were tested in radioligand binding assays according to a known procedure.³² The assays were performed via the displacement of the respective radioligands from cloned human receptors, all stably expressed in HEK293 cells (except for 5-HT_{2A}R which was expressed in CHO cells): [³H]-8-OH-DPAT for 5-HT_{1A}R, [³H]-ketanserin for 5-HT_{2A}R, [³H]-LSD for 5-HT₆R, [³H]-5-CT for 5-HT₇R and [³H]-raclopride for D₂R.

According to Structure – Linker Relationship, most of the obtained ligands exhibited affinity to the mixed D₂R/5-HT_{1A}R profile. In the group of ligands with no substituents of the *N*-arylpiperazine moiety (5a, 5b, 5c), slightly decreased activity was observed upon linker chain elongation. Ligands still exhibited high affinity to 5-HT_{1A}R with $K_i \leq 20$ nM. The opposite pattern was observed with respect to D₂R. We observed moderate or no affinity to the remainder of tested receptors. Because saccharin core is structurally similar to phthalimide, we expected that in case of 1-(2-methoxyphenyl)piperazine (ligands 5b, 6b

Table 1
Saccharin carbon linker comparison on affinity (K_i [nM]) to D₂R/5-HT_{1A}R/5-HT_{2A}R.^{16–19}



Ligand No.	n	Ar	h-D1	h-D2	h-D3	h-D4	h-D5	h-5-HT1A	h-5-HT2A	h-5-HT2C	h-α1
A	2	3-CF3-Ph	nd	nd	nd	nd	nd	NA	nd	nd	nd
B	3	3-CF3-Ph	nd	nd	nd	nd	nd	400	700	NA	nd
C*	3	2-Pyrimidinyl	nd	nd	nd	nd	nd	2	nd	nd	nd
D	4	Ph	nd	38	66	136	1629	nd	nd	nd	nd
E		4-Cl-Ph	nd	177	287	36	230	nd	nd	nd	nd
F = 5e		3-CF3-Ph	NA	113	107	NA	1756	100	2250	NA	1500
G		2-OMe-Ph	nd	360	187	79	1132	nd	nd	nd	nd
H**		2-Pyrimidinyl	nd	1600	nd	nd	nd	7.9	14,980	nd	229
=5f											
7a	6	Ph	nd	48	nd	nd	nd	20	321	nd	nd
7d		4-Cl-Ph	nd	28	nd	nd	nd	84	nd	nd	nd
7e		3-CF3-Ph	na	7	nd	nd	nd	25	167	nd	nd
7b		2-OMe-Ph	na	61	nd	nd	nd	91	nd	nd	nd
7f		2-Pyrimidinyl	na	51	nd	nd	nd	24	183	nd	nd

NA – not active ($K_i > 5 \mu\text{M}$) nd - not determined, * - revospirone, ** - ipsapirone, h-human receptor type

Table 2
Phthalimide, benzoxazine and salicylamide effects of carbon linker on affinity to *h*-5-HT_{1A}R^{27–30}.

Ligand No	Ar	n	K _i [nM]	Ligand No	n	K _i [nM]	Ligand No	n	K _i [nM]
I		2	>1000	I-1	2	na	I-2	2	155
J		3	13	J-1	3	46	J-2	3	21
K		4	0.6*	K-1	4	3.2	K-2	4	38
L		5	7.2	L-1	5	20	L-2	5	4
M		6	22	M-1	6	18	M-2	6	3
N		2	>1000	N-1	2	na	N-2	2	na
O		3	200	O-1	3	402	O-2	3	143
P		4	10	P-1	4	2.8	P-2	4	na
R		5	8.5	R-2	5	na	R-2	5	na
S		6	1	S-1	6	na	S-2	6	na

*NAN-190, na – not available, h – human receptor type.

Table 3

K_i [nM] ± SEM of radioligand binding for all synthesized compounds for tested receptors.

Ligand No.	R	linker	<i>h</i> -D ₂ R	<i>h</i> -5-HT _{1A} R	<i>h</i> -5-HT _{2A} R	<i>h</i> -5-HT ₆ R	<i>h</i> -5-HT ₇ R
5a	H	butyl <i>group I</i>	249	3	474	4664	631
5b	2-OMe		7	8	382	161	96
5c	2,3-diCl		26	1	2580	2662	372
5d	4-Cl		571	78	318	2729	536
5e	3-CF ₃		113**	100**	2250**	na	na
5f	2-Pyrimidyl	pentyl <i>group II</i>	1224	15	14,980	16,800	1406
6a	H		165	16	313	1836	148
6b	2-OMe		20	3	584	1991	125
6c	2,3-diCl		17	29	126	197	149
6d	4-Cl		254	101	139	703	191
6e	3-CF ₃	34	21	162	1354	35	
6f	2-Pyrimidyl	954	6	6306	7097	2673	
6g	2-Pyridyl	92	13	1438	2626	179	
6h	1-Naphthyl	20	16	105	101	36	
7a	H	hexyl* <i>group III</i>	48*	20*	321*	971*	192*
7b	2-OMe		1	10	764	779	105
7c	2,3-diCl		132*	58*	209*	920*	119*
7d	4-Cl		28*	84*	299	72	487
7e	3-CF ₃		7*	25*	167*	52*	58*
7f	2-Pyrimidyl	3274	56	3530	5708	2515	
7g	2-Pyridyl	239*	13*	1290*	2352*	552*	
7h	1-Naphthyl	12*	13*	44*	77*	23*	
8b	2-OMe	xylene <i>group IV</i>	2	77	4754	10,090	97

na - not available, * - Ref.¹⁹, ** - Ref.³³; high affinity K_i < 50 nM, moderate affinity 50 nM < K_i < 500 nM, low affinity 500 nM < K_i < 1000 nM, not active K_i > 1000 nM. Each compound was tested in triplicate at 7 concentrations (0.1 nM – 100 μM). The inhibition constants (K_i) were calculated from the Cheng-Prusoff equation³⁷. Results were expressed as means of at least two separate experiments (SEM ≤ 25%; h – human receptor type).

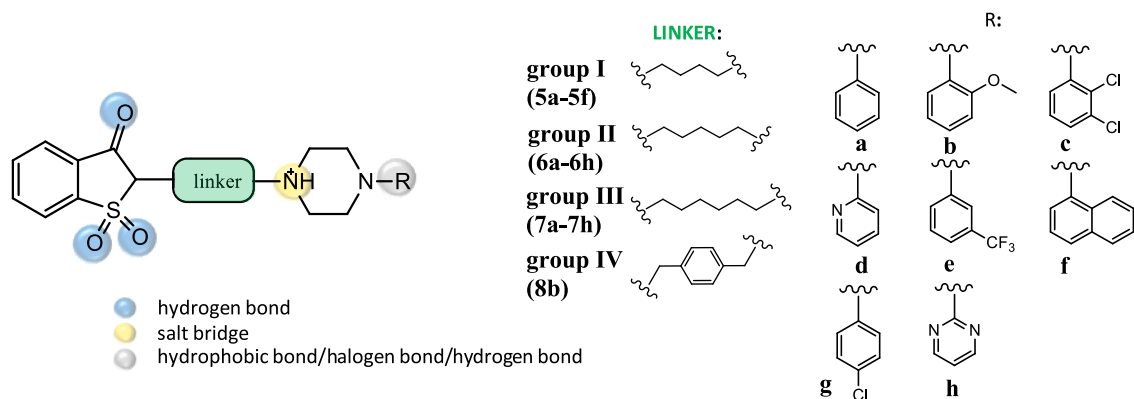
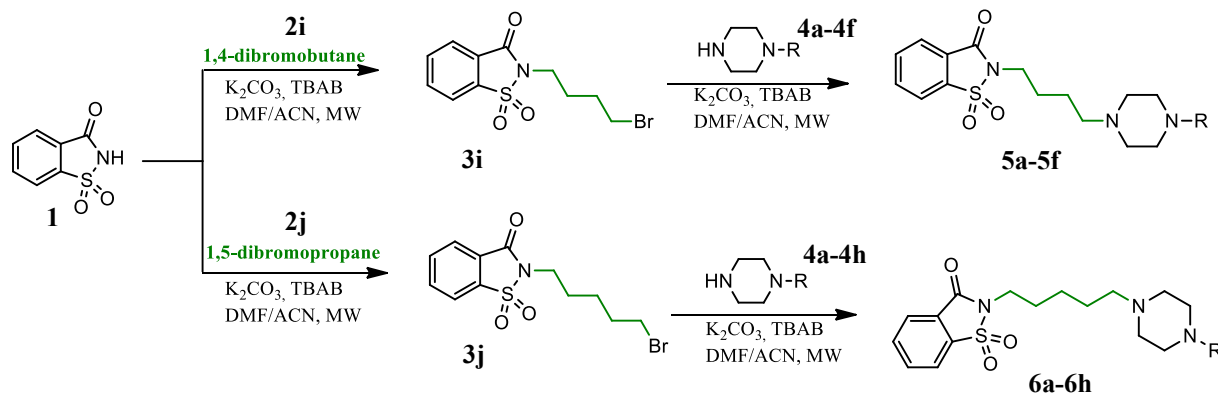
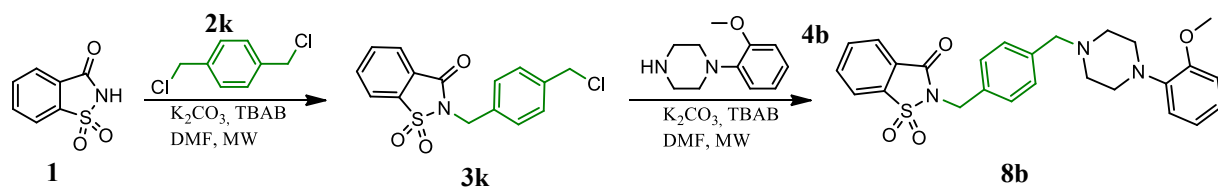


Fig. 1. Structure – Activity Relationship analysis plan leading to dual D₂R/5-HT_{1A}R ligands.



Scheme 1. Synthetic pathway leading to new compounds with flexible linker.



Scheme 2. Synthetic pathway leading to new compounds with rigid linker.

and **7b**) the binding pattern to 5-HT_{1A}R would be similar to **I-M**. Ligands with four (**5b**) or five (**6b**) carbon atoms in the linker showed the highest affinity with $K_i = 8$ nM and $K_i = 3$ nM, respectively. Adding an extra carbon to the linker (6 carbons in total) resulted in slight loss of affinity (**7b**, $K_i = 10$ nM). Increased rigidity of the carbon linker by introducing xylene moiety resulted in further loss of activity to 5-HT_{1A}R (**8b**, $K_i = 77$ nM). In this case increasing rigidity did not have any effect on affinity to D₂R. Ligands **5b**, **6b**, **7b** and **8b** did not exhibit affinity to 5-HT_{2A}R and 5-HT₆R, however, exhibited moderate affinity to 5-HT₇R. A different binding pattern was observed when 1-(2,3-dichlorophenyl)piperazine was present in the ligands. Elongation of the carbon linker resulted in a decrease of affinity to 5-HT_{1A}R in the following pattern: **5c** $K_i = 1$ nM, **6c** $K_i = 29$ nM and **7c** $K_i = 58$ nM. According to D₂R, ligand with propyl linker was the most active in this group (**6c**, $K_i = 17$ nM). Shortening (**5c**) as well as elongation (**7c**) of the carbon linker resulted in a decrease of activity when compared to **6c** with $K_i = 26$ nM and $K_i = 132$ nM, respectively. Ligands with *para*-Cl substituent of arylpiperazine moiety were less active than those with 2,3-dichloro substituents. Ligand with four carbons (**5d**) as well as six carbons (**7d**) exhibits similar affinity to 5-HT_{1A}R, while ligand with five carbons (**6d**) exhibits slight worse affinity with $K_i = 101$ nM. Elongation of the carbon linker resulted in increased of affinity only in term to D₂R. The same ligands exhibited moderate affinity to 5-HT_{2A}R, 5-HT₆R and 5-HT₇R or were not active towards these receptors. With respect to 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine ligands, elongation of carbon linker resulted in increased affinity to

5-HT_{1A}R. Ligand with short ethyl chain (**A**) linker was inactive.^{16–18} Elongation of ethyl chain to 3 atoms (i.e., propyl) (**B**) resulted in increased affinity with $K_i = 400$ nM.^{16–18} Further elongation caused increase of affinity in the following pattern: **5e** $K_i = 100$ nM, **6e** $K_i = 25$ nM and **7e** $K_i = 21$ nM. The same pattern was observed in term of D₂R. Ligands exhibited high affinity to 5-HT₇R as well. With respect to 5-HT_{1A}R, the binding pattern of ligands with 1-(2-Pyrimidinyl)piperazine was similar to those with 1-(2-methoxyphenyl)piperazine. Ligands with short linkers: propyl (**C**), butyl (**5f**), and pentyl (**6f**), exhibited high affinity to 5-HT_{1A}R with the $K_i = 2$ nM, $K_i = 15$ nM and $K_i = 6$ nM, respectively. So far, we reported that investigated ligands exhibit affinity to D₂R. Ligands with 1-(2-pyrimidinyl)piperazine do not exhibit

the mentioned affinity, making them highly selective towards tested receptors. For 1-(2-pyridinyl)piperazine ligands (**6g** and **7g**, $K_i = 13$ nM), we did not observe differences in the binding to

5-HT_{1A}R. During conducted research, we found that ligands **6h** and **7h** showed multifunctional binding, where the structure-carbon length relationship may be difficult to analyse. According to Structure – Aryl-piperazine Relationship, in the first group of ligands (**5a-5c**, **5f**) where four-carbon linker was present, high affinity to 5-HT_{1A}R was observed in the range of K_i between 1 and 15 nM. Introduction of *para*-Cl substituent to *N*-arylpiperazine core (**5d**, $K_i = 78$ nM) as well as *meta*-CF₃ substituent (**5e**, $K_i = 100$ nM) resulted in considerable decrease of affinity. Generally, we observed less affinity of the ligands **5a-5f** to D₂R than to 5-HT_{1A}R. Ligands with *ortho*-OCH₃ (**5b**) and 2,3-dichloro (**5c**) substituent only exhibited high affinity with $K_i = 7$ nM and $K_i = 26$ nM, respectively. In most cases, these ligands were not active toward 5-HT_{2A}R, 5-HT₆R and 5-HT₇R. In the second group of ligands where five-carbon linker was present, the affinity to 5-HT_{1A}R was also very high – $K_i \leq 29$ nM. One exception was **6d**, where introducing of *para*-Cl substituent resulted in the decrease of activity with $K_i = 101$ nM. For D₂R, an interesting relationship was observed with respect to ligands with only *ortho* and/or *meta* positions occupied (**6b**, **6c**, **6e** and **6i**). In that case, ligands exhibited high affinity with $K_i \leq 34$ nM. We indicated that most of ligands with pentyl linker (**6a-6i**) did not exhibit high affinity to 5-HT_{2A}R, 5-HT₆R and 5-HT₇R except of ligand **6i** which behaved as a multifunctional ligand. Ligands with six-carbon linker seem to be less selective than those with five or four carbons. Ligand **7e** exhibits high affinity to four types of receptors: D₂, 5-HT_{1A}, 5-HT₆ and 5-HT₇. Ligands **6h** and **7h** exhibit affinity to three type of receptors: D₂, 5-HT_{1A} and 5-HT₇.

We confirmed a fully conducted SAR study based on *in vitro* assays via molecular modelling approach using docking for selected ligands (Fig. 2, Fig. 3) Due to lack of crystalline structure of 5-HT_{1A}R, a homology model based on 5-HT_{1B}R (PDB 4IAR) template with ergotamine was created using Swiss-Model server.³⁴ The 5-HT_{1A}R homology model was validated using also Swiss-Model server as well as QMEAN by parameter determination. The amino acids sequence identity was >41% and the coverage was 0.89 – such values correspond with literature.^{35–36} The percent of residues in favoured regions of the Ramachandron plot was also determined (Supplementary Material). For D₂R, we used the crystal

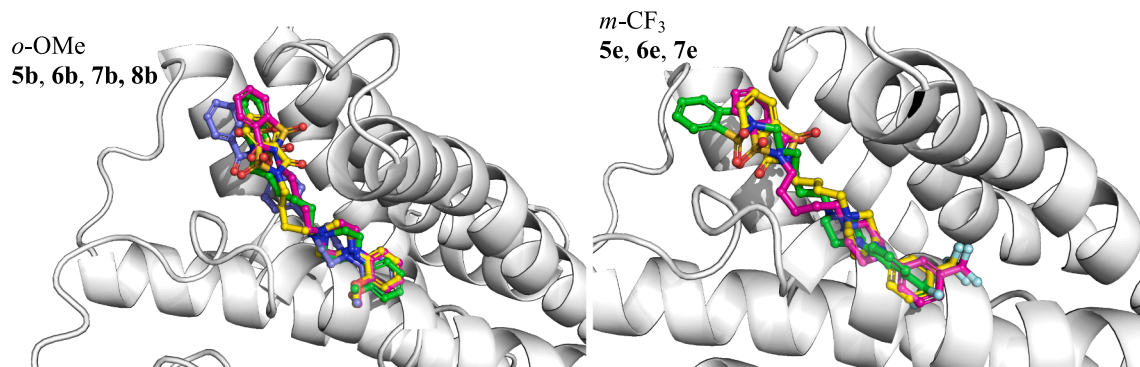


Fig. 2. Aligned poses of selected ligands to D₂R structure crystal (PDB: 6LUQ) obtained in the docking. Green ligands represent hexyl linker, magenta ligands represent pentyl linker, yellow ligands represent butyl linker, silver ligand represents propyl linker, purple ligand represents xylene linker.

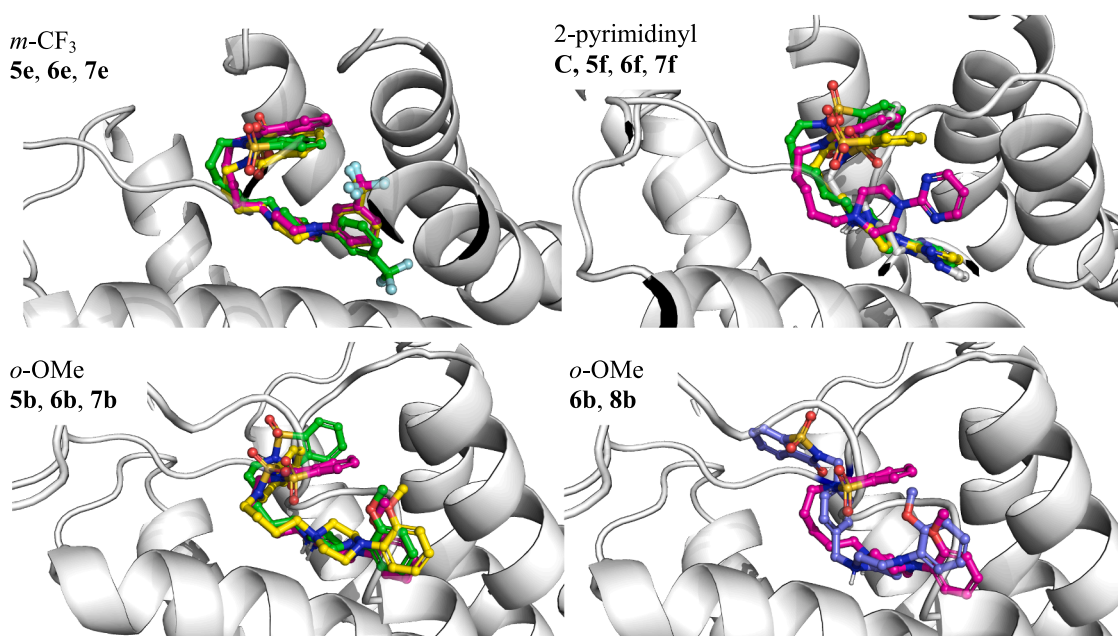


Fig. 3. Aligned poses of selected ligands to the homology model of 5-HT_{1A}R obtained in the docking. Green ligands represent hexyl linker, magenta ligands represent pentyl linker, yellow ligands represent butyl linker, silver ligand represents propyl linker, purple ligand represents xylene linker.

structure of D₂R (PDB 6LUQ) with endogenously bound haloperidol. Selected forms for all docked ligands as well as interactions are presented in [Supplementary data](#). Endogenously bound haloperidol adopts a linear conformation and forms a conservative hydrophobic π - π stacking with W407 and F411 which are located in a hydrophobic binding pocket deep in the receptor. In general, the ligands considered (Fig. 2) adopt a coherent haloperidol binding mode. In the opposition to 5-HT_{1A}R ligands, D₂R ligands adopt more linear conformation. All ligands form salt bridge with D3.32. In case of **5e**, **6e** and **7e**, 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine reaches out hydrophobic binding pocket deep in the receptor which is located between transmembrane helix (TMh) 3 and TMh6 (CH- π stacking with: F411 – **7e**; F410 – **7e**, **6e**; W407 – **6e**, **5e**). Terminal moiety of the ligands is orientated in the outer part of receptor in the direction to TMh2 and TMh7. Carbonyl group forms hydrogen bond interaction with W100 for **7e** and **5e** as well as hydrogen bond with T433 for **6e**. Very high affinity to D₂R of **7e** may be explained through additional occurrence of hydrophobic CH- π stacking with W100 and aromatic ring of saccharin. On the other hand, lowered affinity of **5e** may be caused through lack of CH- π stacking with F411 or F410. In this case we observed worse parameters of salt bridge (Table 4, [Supplementary Material](#)). According to ligands with 1-(2-methoxyphenyl)

piperazine **5b** – **8b** very high affinity with $K_i \leq 20$ nM may be explained through coherent binding mode and formation of conserve salt bridges with D3.32 as well as hydrogen/hydrophobic bonds with appropriate amino acids. The *N*-phenylpiperazine binding pocket is hydrophobic and located deeper in the receptor, where *o*-methoxyphenyl rings bind preferentially in the cavity between TMh3, TMh6 helices forming CH- π type interactions with W407 and F411. Saccharin which is placed in outer part of the receptor interacts with hydrogen bond with T433 (for **7b** and **6b**), and W100 (for **8b**, **6b** and **5b**). Stiffened carbon linker additionally interacts with F189 via CH- π interaction.

Because groups of ligands with *meta*-CF₃ (**A**, **B**, **5e**, **6e**, **7e**) are well characterised in *in vitro* assays, we chose them as the first group to perform docking in the range of 2–6 carbons to 5-HT_{1A}R. All ligands are characterized by a bent form and key salt bridge interaction with D3.32. Ligands with high affinity (**6e**, $K_i = 21$ nM and **7e**, $K_i = 25$ nM) to 5-HT_{1A}R exhibit consistent binding mode for azapirone³⁷ as well as for saccharin derivatives.¹⁹ 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine in the ligands reaches out to a hydrophobic binding pocket placed deep in the receptor, which is located near TMh3 and TMh6. Aromatic ring of *N*-aryl piperazine interacts with F6.51 and F6.52 via CH- π stacking. Terminal moiety of the ligands is orientated in the outer part of receptor in the

direction toward TMh6, TMh7 and extracellular loop (ECL) 2. Carbonyl group of **7e** forms conservative hydrogen bond interaction with N7.38. Sulfonyl group forms hydrogen bonds with K191 for **7e** and **6e** as well as with Y96, G97 and N7.38 for **6e**. Sulfonyl group of ligand **7e** forms an additional hydrogen bond with T188 and K191. Ligand **6e** forms an additional π -cation interaction between the saccharin aromatic ring and K191. Shortening the linker by one carbon atom resulted in the decrease of affinity (**5e**, $K_i = 100$ nM). It may be a result of lacking CH- π interaction with F6.51, however, ligands adopt the same conformation as **6e**. Further shortening (ligand **B**, $K_i = 400$ nM and ligand **A**, inactive) caused further decrease of affinity. It may be caused by the following changes in the binding mode: conformation of ligands **A** and **B** are not fully coherent with the rest of ligands; *N*-piperazine moiety does not fit directly in the hydrophobic binding pocket and point out more in the direction TMh6; both ligands do not form hydrophobic interactions, while ligand **A** does not form a salt bridge. The second group of ligands, with a widely known affinity to 5-HT_{1A}R, are ligands with 1-(2-pyrimidinyl)piperazine, such as revospirone (**C**), ipsapirone (**H** = **5f**) and their analogues (**6f**, **7f**). In this case, all ligands exhibit high affinity with $K_i \leq 15$ nM (**C**, **5f** and **6f**). The binding mode for these ligands is similar. Ligands form a salt bridge with D3.32 and adopt bent conformation. As typical for azapirones, aromatic part of 1-(2-pyrimidinyl)piperazine reaches hydrophobic binding pocket in deep part (parallel to TMh3 or more perpendicular toward TMh6) of the receptor forming CH- π stacking with F6.52 (**C**, **5f**, **6f**, **7f**) or F6.51 (**6f**) and W6.48 (**C**, **5f**, **7f**). All carbonyl groups interact with N7.38 and additional with Q97 (for **6f**) via hydrogen bonds. Sulfonyl groups interact with K191 or I189 through hydrogen bonds as well. Ligand **6f**, additional interacts with T188. Slightly higher affinity of **6f** than **5f** may be explained through additional interactions such as π -cation between D3.32 and F3.28. Ligand **7f** ($K_i = 56$ nM) exhibits slightly lower affinity. It could be explained by inferior salt bridge characteristics (Table 5). Similar affinity for ligands with 1-(2-methoxyphenyl)piperazine (**5b**, **6b** and **7b**) to 5-HT_{1A}R may be explained through their coherent binding mode as well as bioconformation. Ligands form a salt bridge with D3.32 and adopt bent conformation. Interactions with amino acids are the same as previously. Increasing rigidity of the chain by introducing a xylene substituent (**8b**, $K_i = 77$ nM) resulted in the decrease of affinity. Such phenomenon may be caused by a slightly different binding mode. In this case we observed inferior salt bridge characteristics with D3.32 (Table 5, [Supplementary Material](#)). *N*-arylpiperazine reaches hydrophobic binding pocket in deep part of the receptor which is consistent with previous ligands. Introducing xylene substituent instead of flexible carbon linker resulted in ligand adopting an “S-like” bioconformation (Fig. 2). Saccharin points toward TMh7 and forms hydrogen bonds with Q2.64 and Y2.63 as well as ECL2 and forms hydrogen bonds with K191.

In summary, the aim of this work was to confirm the hypothesis whether that elongation of carbon linker has beneficial influence on affinity to selected receptors by examining the influence of the carbon linker and various arylpiperazines on affinity to dopamine D₂R and serotonin 5-HT receptors. We focused mostly on mixed profile D₂R/5-HT_{1A}R. All designed ligands were obtained with a quick, eco-friendly approach using solvent-free microwave supported reactions where overall yield generally exceeded 60% (salt form). We demonstrated that positive changes in D₂R binding profile of ipsapirone may be achieved only by arylpiperazine exchange. In this case, elongation of carbon linker have no influence on the affinity to D₂R (ligands inactive) as well as to 5-HT_{1A}R (ligands active). For ligands such as 1-phenylpiperazine (**5a**, **6a**, **7a**), 1-(4-chlorophenyl)piperazine (**5d**, **6d**, **7d**), 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (**5e**, **6e**, **7e**) and 1-(1-naphthyl)piperazine (**5h**, **6h**, **7h**), derivatives, elongation of carbon linker increases of affinity to D₂R. For 1-(2-pyridyl)piperazine, and 1-(2,3-dichlorophenyl)piperazine derivatives we observed an opposite effect. We also indicated that carbon linker has no influence on affinity to 5-HT_{1A}R for ligands such as 1-phenylpiperazine (**5a**, **6a**, **7a**), 1-(2-methoxyphenyl)piperazine (**5b**, **6b**, **7b**) and 1-(2-pyridyl)piperazine derivatives (**6g**, **7g**). All of

them (except of **8b**) exhibited high affinity to 5-HT_{1A}R with $K_i \leq 20$ nM. Carbon linker of ligands such as 1-(4-chlorophenyl)piperazine (**5d**, **6d**, **7d**) has also no influence on affinity to 5-HT_{1A}R, however, ligands exhibited moderate affinity. For ligand such as 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (**5e**, **6e**, **7e**), we observed that elongation of carbon linker has a positive influence to 5-HT_{1A}R. Affinity to D₂R and 5-HT_{1A}R of considered ligands was elucidated in docking tests. Ligands' binding mode is coherent with that of typical azapirones. Conserve salt bridge with D3.32 as well as appropriate hydrogen/hydrophobic bonds were identified. The conducted SAR study provides us with useful information as to which ligand should be chosen for further *in vitro/in vivo* studies as well as for the design of new series of ligands.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank: The National Centre for Research and Development (Grant No. LIDER/015/L-6/14/NCBR/2015) for providing financial support for this project and PLG infrastructure (Prometheus, ACC-CYFRONET, AGH, project ID: drugdesign3) for computational experiments.

Appendix A. Supplementary data

¹H/¹³C-NMR spectras, UPLC-MS, 5-HT_{1A}R homology model validation and selected poses for all docked ligands, K_i [nM] + SEM and whole experimental section can be found in supplementary data.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128028>.

References

- Qingqing L, Hairong H, Jin Y, Xiaojie F, Fanfan Z, Jun L. *J Psychiatr Res.* 2020;126:134–140.
- Kaufman J, DeLorenzo Ch, Choudhury S, Parsey RV. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2016;26:397–410.
- Bantick RA, Deakin JF, Grasby PM. *J Psychopharmacol.* 2001;15:37–46.
- Depoortère R, Bardin L, Auclair AL, et al. *Br J Pharmacol.* 2007;151:253–265.
- de Bruin N, Kruse CG. *Curr Pharm Des.* 2015;21:3739–3759.
- Balcer OM, Seager MA, Gleason SD, et al. *Behav Brain Res.* 2019;360:270–278.
- López-Rodríguez ML, Rosado ML, Benhamú B, et al. *J Med Chem.* 1996;39:4439–4450.
- Tauscher J, Kapur S, Verhoeff N, et al. *Arch Gen Psychiatry.* 2002;59:514–520.
- Seeman P. *Clin Schizophr Relat Psychoses.* 2010;4:56–73.
- Sumiyoshi T, Matsui M, Nohara S, et al. *Am J Psychiatry.* 2001;158:1722–1725.
- Knap B, Kwiatkowski S, Kolasińska K, et al. *World Sci News.* 2018;109:14–25.
- Stahl SM, Kaiser L, Roeschen J, Hesselink JMK, Orazem J. *Int J Neuropsychopharmacol.* 1998;1:11–18.
- J. De Vry, T. Glaser, J. Traber 5-HT_{1A} Receptor Partial Agonists as Anxiolytics. In: Paoletti R., Vanhoutte P.M., Brunello N., Maggi F.M. (eds) Serotonin. Springer, Dordrecht.
- Mokrosz JL, Pietrasiewicz M, Duszyńska B, Cegla MT. *J Med Chem.* 1992;35(13):2369–2374.
- Hamik A, Oksenberg D, Fischette Ch, Peroutka SJ. *Biol Psychiatry.* 1990;28:99–109.
- Awadallah FM, Muller F, Lehmann J, Abadi AH. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;15:5811–5818.
- Abou-Gharbia M, Moyer JA, Patel U. *J Med Chem.* 1989;32:1024–1033.
- Caliendo G, Fiorino F, Perissuttia E. *Eur J Pharm Sci.* 2002;16:15–28.
- Kulaga D, Jaškowska J, Satała G. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019;29:126667.
- Wunberg T, Hendrix M, Hillisch A, et al. *Drug Discov Today.* 2006;11(3–4):175–180.
- López-Rodríguez ML, Ayala D, Benhamú B, Morcillo MJ, Viso A. *Curr Med Chem.* 2002;9:443–469.
- Perrone R, Berardi F, Colabufo NA, et al. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57:1319–1327.
- Jaškowska J, Zaręba P, Śliwa P, Pindelska E, Satała G, Majka Z. *Molecules.* 2019;24:1609.
- Medina RA, Sallander J, Benhamú B, et al. *J Med Chem.* 2009;52:2384–2392.
- Soskic V, Sukalovic V, Kostic-Rajacic S. *Mini Rev Med Chem.* 2015;15:988–1001.
- Christopher JA, Brown J, Doré AS, et al. *J Med Chem.* 2013;56:3446–3455.
- Kowalski P, Mitka K, Jaškowska J, Duszyńska B, Bojarski AJ. *Arch Pharm.* 2013;346:339–348.

- 28 Mokrosz MJ, Kowalski P, Kowalska T, et al. *Arch Pharm.* 1999;332:373–379.
- 29 Kowalski P, Jaškowska J, Bojarski AJ, Duszyńska B. *J Heterocycl Chem.* 2008;45:209–214.
- 30 Kowalski P, Jaškowska J, Bojarski AJ, Duszyńska B, Bucki A, Kołaczkowski M. *J Heterocycl Chem.* 2011;48:192–198.
- 31 Kułaga D, Jaškowska J, Jasiński R. *J Heterocycl Chem.* 2019;56:1498–1504.
- 32 Hogendorf AS, Hogendorf A, Kurczab R, et al. *Sci Rep.* 2017;7:1444.
- 33 Caliendo G, Fiorino F, Perissutti E, et al. *Eur J Pharm Sci.* 2002;16(1–2):15–28.
- 34 <https://swissmodel.expasy.org>, Acces, Biozentrum 25.07.2019, University of Basel, The Center for Molecular Life Science.
- 35 Jaiteh M, Rodriguez-Espigares I, Selent J, Carlsson J. *PLoS Comput Biol.* 2020;16:1007680.
- 36 Warszycki D, Rueda M, Mordalski S, et al. *J Chem Inf Model.* 2017;57:311–321.
- 37 Cheng Y, Prusoff W. *Biochem. Pharmacol.* 1973;22:3099–3108.

D03. **Damian Kułaga**, Jolanta Jaśkowska, Grzegorz Satała – Design, synthesis and biological evaluation of novel serotonin and dopamine receptor ligands being 6-bromohexyl saccharine derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, 29,126667 IF*=2.774



Design, synthesis and biological evaluation of novel serotonin and dopamine receptor ligands being 6-bromohexyl saccharine derivatives



Damian Kułaga^{a,*}, Jolanta Jaśkowska^a, Grzegorz Satała^b

^a Faculty of Chemical Engineering and Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków, Poland

^b Department of Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Depression
Organic synthesis
Solvent-free
Serotonin receptors
Dopamine receptors

ABSTRACT

Due to numerous side effects of current antidepressants, the search for new, safer bioactive compounds is still a valid research topic in medical chemistry. In our research we decided to synthesize and determine SAR for new hexyl arylpiperazines (LACPs) derivated with saccharin moiety. High biological activity has been explained using molecular modelling methods. The compounds obtained show high affinity for the 5-HT_{1A} (compound **18**, $K_i = 4$ nM – antagonist mode) and D₂ (compound **15**, $K_i = 7$ nM – antagonist mode) receptor, and in some cases also 5-HT₇ receptor (compound **17**, $K_i = 20$ nM). A preliminary ADME analysis showed that the compounds exhibit CNS drugability properties. We have proved that carbon-chain lengthening may have a beneficial effect on increasing the activity towards serotonin and dopamine receptors.

Introduction

Diseases associated with central nervous system disorders are an increasingly serious problem in a developing society. Despite the significant progress that has been made over the decades, the currently used antidepressants have a number of adverse effects.^{1–3} Introduced to treatment 70 years ago, tricyclic benzodiazepines revolutionized contemporary methods of treating such disorders. Despite numerous side effects,⁴ they are still often prescribed. With the above in mind, the development of new bioactive compounds acting on the CNS is a topic still valid in today's pharmacy.

Long chain arylpiperazines (LACPs) are a well-known group of compounds with a broad spectrum of activity. They exhibit antidepressant,^{5–7} antineoplastic,⁸ antibacterial⁹ and anti-inflammatory activity.¹⁰ From the chemical point of view they consist of arylpiperazine attached to a suitable carbon linker with imide, amide, sulfonamide¹¹ or heterocyclic ring.¹² in the terminal part (Fig. 1). One of the representatives of long-chain arylpiperazine is ipsapirone **1**, being a buspirone analogue **2**, which is a known anxiolytic and an antidepressant.¹³ Ipsapirone **1** is a compound from the group of azapirones, composed of saccharin attached to a 4-carbon chain with pyrimidinylpiperazine.¹⁴ It is an agonist of 5-HT_{1A} receptor and shows anti-anxiety and antidepressant effects.^{14,15} Scientific literature, in the context of serotonin receptor activity, does not provide much information about the structure–activity (SAR) correlation for ipsapirone

1, moreover, the information it does provide (only binding to D₂, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A}),^{16–18} refers mainly to ligands with a 4-carbon (or shorter) linker (Table 1).

The trend of using a 4-carbon linker is very popular in the long-chain arylpiperazines area, which results in a number of drugs acting on the CNS marketed. Our previous preliminary research suggests that the extension of the carbon chain positively affects the activity and selectivity of the 5-HT and dopamine.^{22,23} ligands, therefore we have decided to obtain new ligands derived from saccharine with a hexyl alkyl chain, and then determine the SAR relationship in the studies.

An important disadvantage of drugs acting on CNS is that they bind to various receptors (including serotonin, dopamine, adrenergic or muscarinic receptors, etc.) from the GPCR family, which results in undesirable adverse effects.^{11,24} On the other hand, in the treatment of depression, schizophrenia, anxiety or bipolar disorder, the drugs used show a mixed mechanism of action. The therapeutic effect of arpiprazole **4** and brexpiprazole **3** is mainly due to partially agonistic/antagonistic action towards D₂R and

5-HT_{1A}R and antagonism to 5-HT_{2A}R.^{25,26} Considering the above, the analogues of saccharin with an extended carbon chain (Fig. 2) have been designed with high affinity for the dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{1A} receptors (*dual ligands*). This article describes the synthesis of ligands and discusses the bioactive conformation and key interactions between ligands and conserve amino acids and then finally the radioligand binding to D₂ and 5-HT_{1A} receptor. In order to select the best

* Corresponding author.

E-mail address: dkulaga@chemia.pk.edu.pl (D. Kułaga).

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126667>

Received 14 June 2019; Received in revised form 26 August 2019; Accepted 3 September 2019

Available online 03 September 2019

0960-894X/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

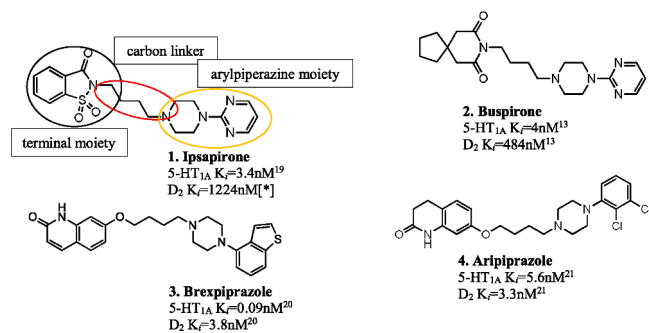


Fig. 1. Typical antidepressants with LCAPs motif, [*] – data provided by our team. (See above-mentioned references for further information.)

Table 1

K_i (nM) for an exemplary analogues of ipsapirone with a 4-carbon chain^{16–18}, NA – not available.

No.	R	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}
I	H	38	NA	NA
II	4-Cl	177	NA	NA
III	3-CF ₃	113	100	2250
IV	2-OMe	360	NA	NA

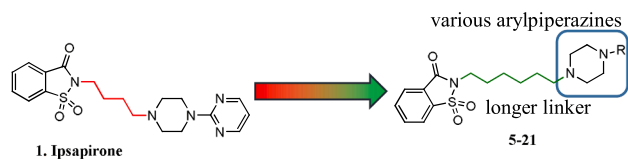
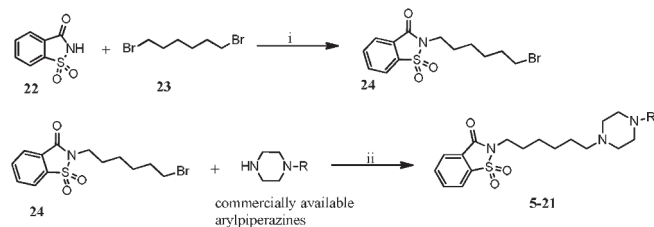


Fig. 2. Designing new compounds.

ligands, extended pharmacological profile towards 5-HT_{2A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor has been determined, too.

All designed ligands were obtained in line with the methodology described in our previous studies.²⁷ The procedure of synthesis new ligands includes two reactions (Scheme 1). The first reaction consists of alkylating the saccharin **22** with 1,6-dibromohexane **23**. The resulting intermediate **24** is next subjected to a condensation with commercially available arylpiperazines. All reactions are carried out under solvent-free conditions using microwave radiation. In the case of 6-bromohexyl saccharin **24**, 3 eq of 1,6-dibromohexane **22** and 1.5 eq of potassium carbonate were used for the alkylation reaction. 1% by mass of DMF was used as an enhancer for the reaction. The reaction was carried out in a microwave pressure reactor for 1 min with the microwave power of 50 W. A similar procedure was adopted to obtain final compounds



Scheme 1. Two-step synthesis of designed ligands. Reagents and conditions: (i) K₂CO₃ (1.5 eq), TBAB, DMF, MW; (ii) K₂CO₃ (3 eq), TBAB, ACN, MW.

5–21. The only difference was that we increased the amount of potassium carbonate to 3 eq and used ACN as a reaction enhancer instead of DMF.

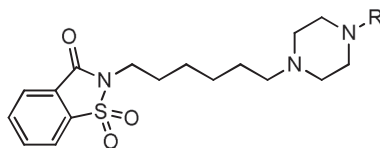
In most cases, the new compounds were isolated with a yield greater than 50% of hydrochloride salt.

All compounds obtained were subjected to *in vitro* tests to determine the affinity towards the serotonin 5-HT_{1A} and dopamine D₂ receptors. For compounds with high activity (K_i < 50 nM), an extended pharmacological profile (5-HT_{2AR}, 5-HT_{6R} and 5-HT_{7R}) was determined. To increase the clarity, ligands were divided into 6 subgroups: 1) halogen derivatives, 2) methoxy derivatives, 3) trifluoromethyl derivatives, 4) benzene derivatives, 5) nitrogen ring containing derivatives, and 6) benzoisothiazole derivatives (Table 2). All ligands belonging to halo derivatives exhibited high (K_i < 50 nM) or moderate (50 < K_i < 100 nM) affinity towards both 5-HT_{1A} and D₂ receptors. In this subgroup, compound **6** with the 2-F substituent showed the highest activity (5-HT_{1A} K_i = 12 nM, D₂ K_i = 24 nM) when compared to the other compounds containing one or two chlorine atoms. Dichloro-compounds **9** (K_i = 132 nM) and **10** (K_i = 105 nM) have an affinity towards the D₂ receptor lower than monochloro-compounds (compound **5** K_i = 45 nM compound **7** K_i = 39 nM and compound **8** K_i = 24 nM). Ligands containing OMe group in the arylpiperazine moiety showed slightly decreased activity towards both 5-HT_{1AR} and D_{2R} when compared to halogen substituents. With respect to the 5-HT_{1A} receptor, the *m*-OMe ligand showed the highest binding affinity, (compound **12** K_i = 19 nM) while the *p*-OMe ligand showed the lowest (compound **13** K_i = 327 nM). In case of the D₂ receptor, *para* substitution also turned out to be less favourable due to the loss of activity (compound **13** K_i = 950 nM). *In vitro* studies indicate that trifluoromethyl subgroup ligands have greater activity towards the D₂ receptor than 5-HT_{1A} receptor. With this regard, compound **15** (D_{2R} K_i = 7 nM, 5-HT_{1AR} K_i = 25 nM) is about 5 times more active than compound **14** (D_{2R} K_i = 27 nM, 5-HT_{1AR} K_i = 156 nM). Compound **16** is a ligand without any substitutions in the arylpiperazine moiety. It is characterized by high affinity towards both types of receptors (5-HT_{1AR} K_i = 20 nM, D₂ K_i = 48 nM), thus indicating that the presence of substituents may, in various cases, increase or decrease affinity towards 5-HT_{1AR} or D_{2R}. Our studies demonstrated that the system of two fused phenyl rings, as in compound **17** (5-HT_{1AR} K_i = 9 nM D_{2R} K_i = 8 nM), is beneficial for activity, which was confirmed in the docking, where an additional phenyl ring is responsible for additional π-π interactions. Aromatic compounds containing nitrogen atom (i.e., compounds **18**, **19**, **20**) are also characterized by high activity towards both receptors (with the exception of compound **19** D_{2R} K_i = 239 nM). Similarly to compound **17**, π-π interaction with the phenyl ring of the arylpiperazines moiety occurs also for compound **18**, making this ligand the most active (5-HT_{1AR} K_i = 4 nM D_{2R} K_i = 15 nM) within the fifth subgroup. Surprised by the high affinity of compounds **16–21**, we decided to perform an extended binding profile for 5-HT_{2AR}, 5-HT_{6R} and 5-HT_{7R} receptors, whose involvement may be related to the therapeutic effects in the treatment of depression.²⁸ According to our assumptions, compounds **17**, **18**, **20** and **21** showed quite high activity towards 5-HT_{7R} (K_i < 45 nM). Moderate activity towards 5-HT_{2AR} (K_i = 91 nM) occurred for compound **17**, and the remaining ligands did not show any activity towards the 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptors. Surprisingly, compound **21** exhibited high affinity (K_i < 58 nM) towards all receptor types tested. In this case, it is an undesirable phenomenon because low selectivity of this ligand may entail occurrence of adverse effects in further studies. In addition, we performed extended binding tests for other ligands with K_i < 50 nM from all subgroups. It turned out that almost all compounds did not bind to the 5-HT_{2AR}, 5-HT_{6R} and 5-HT_{7R}, thus being selective ligands.

We decided to explain the high activity of the compounds **15**, **17**, **18** towards the D₂ and 5-HT_{1A} receptors utilising the docking process. Serotonin and dopamine receptors belong to a larger family of G-Protein Coupled Receptors (GPCR).²⁹ A characteristic feature for

Table 2

K_i (nM) of radioligand binding for all synthesized compounds. N/A – not available.



Set No	Compound No	R	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT ₇
1	5	2-Cl-Ar	45	26	266	459	120
1	6	2-F-Ar	24	12	307	1619	322
1	7	3-Cl-Ar	39	21	361	372	233
1	8	4-Cl-Ar	28	84	N/A	N/A	N/A
1	9	2,3-diCl-Ar	132	58	209	920	119
1	10	3,4-diCl-Ar	105	54	283	132	258
2	11	2-OMe-Ar	61	91	N/A	N/A	N/A
2	12	3-OMe-Ar	113	19	342	921	305
2	13	4-OMe-Ar	950	327	N/A	N/A	N/A
3	14	2-CF ₃ -Ar	27	156	922	1272	195
3	15	3-CF ₃ -Ar	7	25	167	52	58
4	16	Phenyl	48	20	321	971	192
4	17	1-Naphtyl	8	9	91	157	20
5	18	8-Quinoline	15	4	205	1716	21
5	19	2-pyridinyl	239	13	1290	2352	552
5	20	2-pyrimidinyl	51	24	183	104	35
6	21	3-benzothiazol	9	23	23	58	45

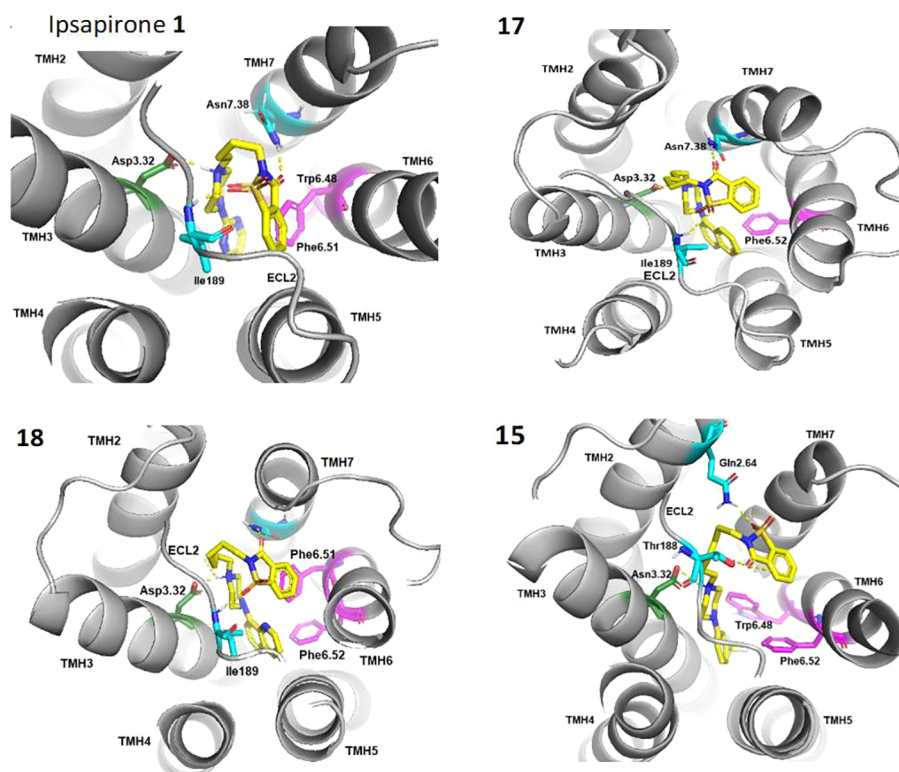


Fig. 3. Binding mode for ipsapirone 1 and active analogues to 5-HT_{1A}R. Conserved amino acids are shown in colour; cyan = imide pocket, magenta = arylpiperazine pocket, green = salt bridge.

serotonin and dopamine receptors is the formation of a strong non-covalent salt bridge between the aspartic acid residue (Asp3.32) and the positively charged nitrogen atom in the piperazine ring in long-chain arylpiperazines (LCAPs).^{11,30} Due to the unavailability of the crystal structure for the 5-HT_{1A} receptor our considerations were based on a homologous model of a crystal structure of the 5-HT_{1B} (PDB: 4IAR). To the best of our knowledge, there is no information on the location of ipsapirone 1 reference molecule in the binding pocket of the D₂ and 5-

HT_{1A} receptor, therefore the first step we chosen was to determine the binding mode of ipsapirone 1. There are several hypotheses describing the general binding mode of azapirone-group ligands showing affinity towards the 5-HT_{1A} receptor.^{30–35} Their common features are: a) bent ligand conformation, b) the binding site is separated between two pockets, namely “aryl piperazine pocket” and “imide pocket” (Figs. 3 and 6.), c) the arylpiperazine pocket is located deeply in the TMH regions 3, 5, 6 and 7, d) the imide pocket is located in the TMH regions 1,

2 and 7 and placed towards the outer surface of the receptor. Ipsapirone **1** assumes a bent form (folding on the first and second carbon atoms of the saccharin moiety). The arylpiperazine pocket is occupied by the pyrimidinyl substituent, with a concurrent formation of π - π interaction with: Phe6.51 (sandwich type) in TMH6 and Thr6.48 (*T*-type) in THM6. Positively charged nitrogen atom of the piperazine forms a salt bridge with Asp3.32 in THM3. According to the hypothesis of Nowak et al.,³⁵ the arylpiperazine molecule lays parallel to TMH3. The imide pocket is occupied by the saccharin molecule in such a way that hydrogen bonds are formed between the carbonyl group of the saccharin amide and Asn7.38 in TMH7 and the sulfonyl group of the saccharin and Ile189 in ECL2. In the case of compounds **15**, **17**, **18** the binding mode coincides with the binding mode for ipsapirone **1** (Fig. 3). For each compound (for both receptors) there a key salt bridge is formed with Asp3.32 (length below 3 Å from N⁺ (piperazine) to O⁻ (Asp3.32); angle more than 130° between N⁺-H-O-), affecting the affinity towards D₂ and 5-HT_{1A} receptors.³⁶ Compounds **17** and **18** form hydrogen bonds between oxygen atoms of saccharin and Asn7.38 and Ile189, compound **15** interacts with Gln2.64 (TMH2) and Thr188 (ECL2). An arylpiperazine pocket for compounds **15**, **17**, **18** is located between TMH3 and TMH6. Compound **17** forms two π - π interactions between naphthalene rings and Phe6.52 (2 × *T* type), while compound **18** forms also two π - π interactions between the quinoline substituent and Phe6.52 and two π - π interactions more between the quinoline substituent and Phe6.51 (2 × *T* type). In the case of compound **15** π - π interaction is also observed between *m*-CF₃-Ar and Phe6.52 (*T*-type) and Trp6.48 as well. In case of the dopamine D₂ receptor, a known crystal structure of the protein (PDB: 6CM4) with endogenously bound risperidone has been used.³⁷ Benzisoxazolepiperidine moiety is located deep within the binding pocket between TMH 3, 5 and 6 (Cys3.36, Phe5.47, Phe6.52, Trp6.48), and the pyrimidinone system in turn interacts with ECL1 (Trp100), TMH 2, 3, 7 (Val2.61, Phe3.28, Tyr7.34) – Fig. 8. The arylpiperazine pocket for ipsapirone **1** occupies the space between TMH3 and TMH6 and relates to the formation of π - π interaction between pyrimidinyl and Phe6.52 and Trp6.48. The imide pocket is located between ECL1 and TMH7, and forms hydrogen bonds with Trp100 and Thr7.38 (Fig. 4). Ipsapirone **1** and its analogues **15**, **17**, **18** are more linear than those active towards the 5-HT_{1A} receptor and show a similar binding mode to risperidone. The arylpiperazine pocket for compounds **15** and **18** is located near TMH3 and TMH6 (π - π interactions with Phe6.52 and Trp6.48). In the case of compound **17**, such pocket is

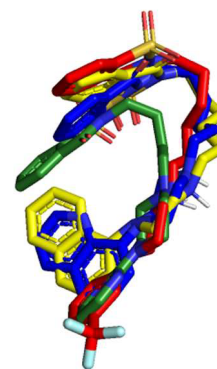


Fig. 5. The imposition of compounds (in 5-HT_{1A}R) **1**, **15**, **17**, **18**. **1** = green; **15** = red; **17** = yellow; **18** = blue.

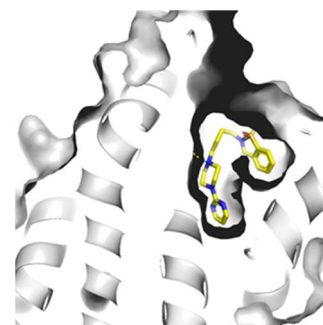


Fig. 6. Binding site of azapirone analogues to 5-HT_{1A} subdivided into two binding pockets.

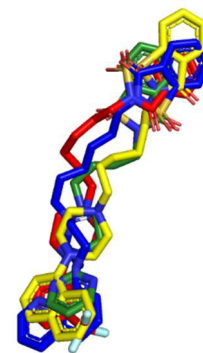


Fig. 7. The imposition of compounds (in D₂R) **1**, **15**, **17**, **18**. **1** = green; **15** = red; **17** = yellow; **18** = blue.

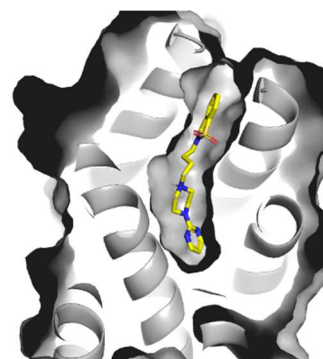


Fig. 8. Binding site of azapirone analogues to D₂R subdivided into two binding pockets.

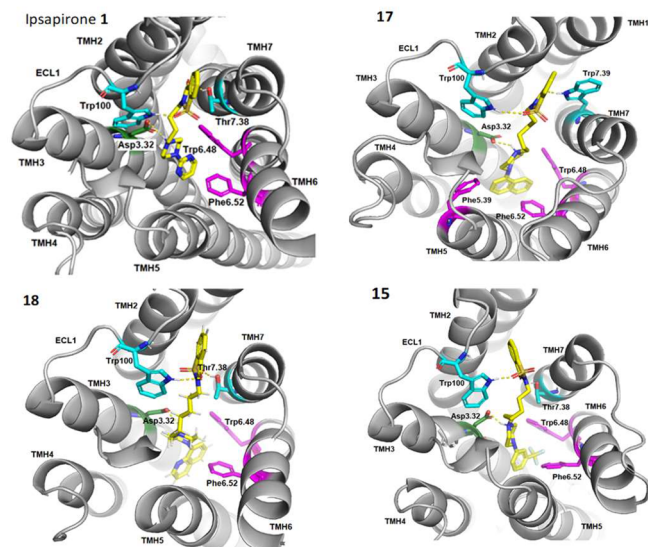


Fig. 4. Binding mode for ipsapirone **1** and active analogues to D₂R. Conserved amino acids are shown in colour; cyan = imide pocket, magenta = arylpiperazine pocket, green = salt bridge.

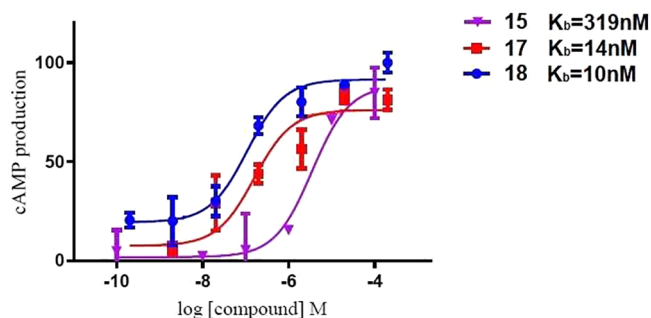


Fig. 9. D₂ dose – response curves (D₂) and K_b values for tested antagonists 15, 17, 18.

enlarged by TMH5 (π - π interaction with Phe5.39), whereas the imide pocket for compounds 15, 17, 18 includes ECL1 (Trp100) and TMH7 (for compounds 15 and 18: hydrogen bonds with Thr7.38, while for compound 17: hydrogen bond with Trp7.39) (Fig. 4). Structures of compounds 15, 17, 18 overlapped with the structure of ipsapirone 1 reveal a very high degree of similarity between both the 5-HT_{1A} (Fig. 5) and D₂ (Fig. 7) receptor.

Analysis of the functional profile experiments show that considered compounds (15, 17, 18) exhibited full antagonist to D₂ receptor (Fig. 9). According to functional profile experiments compounds with fused aromatic arylpiperazine (17 and 18) act as full antagonist to 5-HT_{1A} while compound 15 acts as a full agonist similar to 8-OH-DPAT – well known agonist (Fig. 10).

In the drug design process, many molecules with high biological activity are rejected at the stage of clinical studies. This is most often associated with poor pharmacokinetic and/or pharmacodynamic properties. Therefore, in order to minimize the risk of rejection of compounds at further stages of research, it is worth considering ADME parameters at an early stage of designing.³⁸ A useful tool for this is CNS MPO (central nervous system multiparameter optimization) developed by Wager et al.³⁹ This algorithm takes into account 6 parameterized physicochemical properties (clogP, clogD, MW, TPSA, pK_a and HBD), which, when sum up to 6, indicate the molecule with the most promising parameters for CNS drugs, while the sum of 0–1 is obtained compounds with non-favourable parameters for CNS drugs.^{38–40} The average CNS MPO value for the compounds we obtained is about 4.12, which means that ligands may exhibit high CNS drugability. According to CNS MPO, ligands 19 and 20 have the best properties, while ligands 15 and 21 have the worst properties (Table 3). *In silico* analysis also indicated that the compounds have high absorbability from the GI tract, and the majority of them crosses the blood–brain barrier. PAINS (Pan Assay Interference Compounds) alert occurred only in case of compound 13: anil_di_alk_C. Statistical analyses have shown that despite PAINS alerts obtained for already registered drugs, these should be avoided at the design stage due to a possibility of false-positive results they can give at later stages.⁴¹

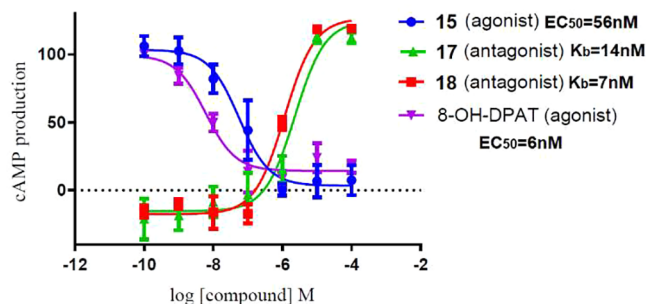


Fig. 10. 5-HT_{1A} dose – response curves and K_b/EC₅₀ values for tested compounds 15, 17, 18.

Table 3
Early *in silico* ADME properties.

Cmpd No	CNS MPO	GI absorption	BBB permeant	PAINS alert
5	4.1	high	Yes	No
6	4.5	High	Yes	No
7	4.0	High	Yes	No
8	4.0	High	Yes	No
9	3.4	High	Yes	No
10	3.3	High	Yes	No
11	4.7	High	Yes	No
12	4.7	High	Yes	No
13	4.7	High	Yes	Yes
14	3.4	High	No	No
15	3.3	High	No	No
16	4.8	High	Yes	No
17	3.4	High	Yes	No
18	4.2	High	No	No
19	5.2	High	No	No
20	5.3	high	No	No
21	3.1	high	No	No

Based on the analysis of the literature data, we found that existing ipsapirone short-chain carbon analogues (containing 4 atoms) are characterized by poor binding to the 5-HT_{1A}R, 5-HT_{2A}R and D₂R (Table 1). As it was mentioned, in our previous preliminary studies, we determined that the carbon chain extension from 3 to 6 carbon atoms as in salicylamide derivatives, increased activity towards serotonin and dopamine receptors.²³ Our study has revealed that elongation of the carbon chain increases activity towards the above-described receptors (Table 4). In the case of the compound 15 (3-CF₃), the extension of the carbon chain from 4 to 6 atoms resulted in a 4-fold increase in activity towards the 5-HT_{1A} receptor; a 13-fold increase in activity towards the 5-HT_{2A} receptor, and a 16-fold increase in activity towards the D₂ receptor. In case of compound 8 (4-Cl), binding with D₂ receptor increased by more than 6-fold, with similar results for compound 11 (2-OMe). Comparison between described ligands with a 4-carbon chain and new 6-carbon chain ligands is shown in Table 4. By docking the 5-HT_{1A} receptor ligands, it was found that compounds with alkyl chains longer than 4 carbon atoms are bent in a similar manner, while interactions with significant amino acids remain the same. Within the case of D₂ receptor, the arrangement in the binding pocket of our compounds is similar to that of risperidone. In our research, we synthesized a library of compounds derived from ipsapirone 1, in which ligands are characterized by high affinity and selectivity towards serotonin 5-HT_{1A} and dopamine D₂ receptors (Table 2). The most active compounds 17 and 18 additionally show affinity towards the 5-HT₇ receptor while compounds 6 and 16 are both active and selective towards 5-HT_{1A}R and/or D₂R. On the other hand, compounds 12 and 19 show strong selectivity only towards the 5-HT_{1A} receptor. Functional assays show that the most promising compounds (15, 17, 18) are full antagonist to D₂R. Compound 17 and 18 are also antagonists to 5-HT_{1A} while 15 is full agonist to 5-HT_{1A}. Because of an interesting binding profile to our screening receptor panel it's important to evaluate other targets like D₃R or 5-HT_{1B}. Acting on these receptors may be also important for developing more effective antipsychotics.^{42,43} The preliminary *in silico* parameters of ADME indicate that the ligands have CNS drugability potential.

Table 4
Comparison of described ligands with a 4-carbon chain and new 6-carbon chain ligands, NA – not available.

Cmpd No	D ₂	5-HT _{1A} C ₄ linker	5-HT _{2A}	Cmpd No	D ₂	5-HT _{1A} C ₆ linker	5-HT _{2A}
I	38	N/A	N/A	16	48	20	N/A
II	177	N/A	N/A	8	28	84	N/A
III	113	100	2250	15	7	25	167
IV	360	N/A	N/A	11	61	91	N/A

Almost all compounds can potentially be absorbed from the GI tract and cross the blood–brain barrier. It is worth mentioning that the ligands were obtained in environmentally friendly reactions, with a reduced amount of toxic reagents and a shortened synthesis time of up to 2 min. The yield for the obtained compounds exceeded 50% (as a salt form).

Acknowledgments

We would like to thank: The National Centre for Research and Development (Grant No. LIDER/015/L-6/14/NCBR/2015), for providing financial support for this project and PLG infrastructure (Prometheus, ACC-CYFRONET, AGH, project ID: drugdesign1) for performing molecular modelling. We would also like to thank “The PROM Programme - International scholarship exchange of PhD candidates and academic staff” co-financed by the European Social Fund under the Knowledge Education Development Operational Programme, non-competitive mode entitled International scholarship exchange for PhD candidates and academic staff, contract number POWR.03.03.00-00-PN13/18.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data (Information. General methods of synthesis, docking, *in-vitro* assays, instrumentation, and final analysis (¹H-NMR, ¹³C-NMR, UPLC-MS, HPLC, melting point) to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126667>.

References

- Pessoa-Mahana H, Araya-Maturana R, Saitz C, Pessoa-Mahana D. *Mini Rev Med Chem*. 2003;3:77–93.
- Goldberg JS, Bell Jr EB, Pollard DA. *Perspect Med Chem*. 2014;6:1–8.
- Farvolden P, Kennedy SH, Lam RW. *Expert Opin Invest Drug*. 2003;12:65–86.
- Arshad S, Butt J, Iqbal J, Hassan SS. *Modern Appl Pharm Pharmacol*. 2018;1:1–6.
- Modica M, Intagliata S, Pittalà V, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25:1427–1430.
- Canale V, Kurczab R, Partyka A, et al. *Eur J Med Chem*. 2015;92:202–211.
- Waszkielewicz AM, Pytka K, Rapacz A, et al. *Chem Biol Drug Des*. 2015;85:326–335.
- Ma Y, Zheng X, Gao H, Wan Ch, Rao G, Mao Z. *Molecules*. 2016;21:1684.
- Malik I, Csöllei J, Jampilek J, et al. *Molecules*. 2016;21:1274.
- Ananda Kumar CS, Veeresh B, Ramesha KC, et al. *J Appl Chem*. 2017;6:82–290.
- Kołaczkowski M, Marcinkowska M, Bucki A, et al. *J Med Chem*. 2014;57:4543–4557.
- Kowalski P, Jaśkowska J. *Archiv der Pharm – Chem Life Sci*. 2012;345:81–85.
- (a) Bergman J, Roof RA, Ach Furman, et al. *Int J Psychopharmacol*. 2013;16:445–458; (b) Lopez-Rodríguez M, Morcillo MJ, Fernandez E, et al. *J Med Chem*. 2001;44:186–197.
- Glennon RA, Naiman NA, Lyon RA, Titeler M. *J Med Chem*. 1988;31:1968–1971.
- Stahl SM, Kaiser L, Roeschen J, Keppel Hesselink JM, Orazem J. *Int J Psychopharmacol*. 1998;1:11–18.
- Awadallah FM, Muller F, Lehmann J, Abadi AH. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;15:5811–5818.
- Abou-Gharbia M, Moyer JA, Patel U, et al. *J Med Chem*. 1989;32:1024–1033.
- Caliendo G, Fiorino F, Perissuttia E, et al. *Eur J Pharm Sci*. 2002;16:15–28.
- Mokrosz JL, Pietrasiewicz M, Duszyńska B, Cegla MT. *J Med Chem*. 1992;35:2369–2374.
- Maeda K, Sugino H, Akazawa H, et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;350:589–604.
- Shapiro DA, Renock S, Arrington E, et al. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:1400–1411.
- Kowalski P, Mitka K, Jaśkowska J, Duszyńska B, Bojarski AJ. *Archiv der Pharm – Chem Life Sci*. 2013;346:339–348.
- Kowalski P, Jaśkowska J, Bojarski AJ, Duszyńska B, Bucki A, Kołaczkowski M. *J Heterocycl Chem*. 2011;48:192–198.
- Śniecikowska J, Gluch-Lutwin M, Bucki A, Mierzejewski P, Kołaczkowski M. *Adv Psychiatry Neurol*. 2017;26:165–178.
- Bartolomeis A, Tomasetti C, Iasevoli F. *CNS Drugs*. 2015;29:773–799.
- Stępnicki P, Kondej M, Kaczor AA. *Molecules*. 2018;23:2087.
- Kulaga D, Jaśkowska J, Jasiński R. *J Heterocycl Chem*. 2019. <https://doi.org/10.1002/jhet.3520>.
- Yohn CN, Gergues MM, Samuels BA. *Mol Brain*. 2017;10:28.
- McCorvy JD, Roth BL. *Pharmacol Ther*. 2015;150:129–142.
- Lopez-Rodríguez M, Morcillo MJ, Fernandez E, et al. *J Med Chem*. 2005;48:2548–2558.
- Bronowska A, Chilmonczyk Z, Leś A, Edvardsend O, Østensen R, Syltief I. *J Comput Aided Mol Des*. 2001;15:1005–1023.
- Strzelczyk AA, Jarończyk M, Chilmonczyk Z, Mazurek AP, Chojnacka-Wójcik E, Syltief I. *Biochem Pharmacol*. 2004;67:2219–2230.
- Zlatovic MV, Sukalovic VV, Schneider Ch, Roglic GM. *Bioorg Med Chem*. 2006;14:2994–3001.
- Warszycki D, Rueda M, Mordalski S, et al. *J Chem Inf Model*. 2017;57:311–321.
- Nowak M, Kołaczkowski M, Pawłowski M, Bojarski AJ. *J Med Chem*. 2006;49:205–214.
- Kumar S, Nussinov R. *ChemBioChem*. 2002;3:604–617.
- Wang S, Che T, Levit A, Shoichet BK, Wacker D, Roth BL. *Nature*. 2018;555:269–273.
- Alqahtani S. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13:1147–1158.
- Wager TT, Hou X, Verhoest PR, Villalobos A. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7:767–775.
- Kucwaj-Brysz K, Kurczab R, Jastrzębska-Więsek M, et al. *Eur J Med Chem*. 2018;147:102–114.
- Siramshetty VB, Preissner R, Gohlke B. *J Chem Inf Model*. 2018;58:1847–1857.
- Brindisi M, Butini S, Franceschini S, et al. *J Med Chem*. 2014;57:9578–9597.
- Butini S, Nikolic K, Kassel S, et al. *Prog Neurobiol*. 2016;142:68–103.

D04. **Damian Kułaga**, Anna K. Drabczyk, Grzegorz Satała, Gniewomir Latacz, Karolina Różga, Damian Płażuk, Jolanta Jaśkowska – Design and synthesis of new potent 5-HT₇ receptor ligands as a candidate for the treatment of central nervous system diseases, *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, 227, 113931 IF*=6.427



Design and synthesis of new potent 5-HT₇ receptor ligands as a candidate for the treatment of central nervous system diseases

Damian Kułaga^{a,*}, Anna K. Drabczyk^a, Grzegorz Satała^b, Gniewomir Latacz^c, Karolina Różga^d, Damian Płażuk^d, Jolanta Jaśkowska^a

^a Faculty of Chemical Engineering and Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, ul. Warszawska 24, 31-155, Kraków, Poland

^b Department of Medicinal Chemistry, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, ul. Smetna 12, 31-343, Kraków, Poland

^c Department of Technology and Biotechnology of Drugs, Jagiellonian University Medical College, ul. Medyczna 9, 30-688, Kraków, Poland

^d Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry University of Łódź, ul. Tamka 12, 91-403, Łódź, Poland



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2021

Received in revised form

3 October 2021

Accepted 14 October 2021

Available online 21 October 2021

Keywords:

5-HT₇

Aminotriazine

lcap

Medicinal chemistry

Microvave synthesis

ABSTRACT

Owing to their multifunctional pharmacological profiles (including dual 5-HT_{1A}/5-HT₇ action), arylpiperazine derivatives are widely used for treating central nervous system diseases including the depression or neuropathic pain. Herein we describe the design, synthesis and evaluation of biological activity of novel 5-HT₇ ligands derived of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine. The studied compounds showed affinity and high selectivity towards 5-HT₇ receptor with the two most active compounds **34** ($K_i = 61$ nM), **22** ($K_i = 109$ nM) showing good metabolic stability and moderate affinity to CYP3A4 isoenzyme. Compound **22** had high hepatotoxicity at a concentration below 50 μM, while compound **34** showed low hepatotoxicity even at a concentration above 50 μM.

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The signaling pathways related to functional central nervous system (CNS) disorders are activated mainly by a system of neurotransmitters, such as serotonin–5-HT, dopamine, norepinephrine, glutamine and γ-aminobutyric acid (GABA) [1]. Serotonin and serotonin receptors are thought to be one of the most important molecular targets [1] in the context of treating mood disorders [2,3], cognitive deficit [4], schizophrenia [3,5] or neuropathic pain [6]. This action has been reported for the 5-HT₇ (5-HT_{7R}) serotonin receptor. The 5-HT_{7R} is also responsible for: thermoregulation, circadian rhythm, memory, learning [7–9]. Apart from the acting on the CNS, the 5-HT_{7R} may play an important role in the human immune system [10] as well as cardiovascular system [9,11]. Because this receptor was discovered as the latest of serotonin receptors, new functions are still being discovered. For example, 5-HT₇ receptor antagonists could be used as potential anticancer agents against triple-negative breast cancer [12], non-small cell

lung cancer [13] and prostate cancer [14]. Owing to the broad applicability of the receptor, it is an attractive therapeutic target for treating CNS disorders or in oncology.

Long-chain arylpiperazine compounds (LCAPs) are among the most extensively studied groups of compounds in terms of affinity to 5-HT_{7R} [7,15–17]. As well as having affinity to 5-HT_{7R} [15–18], the compounds also show affinity to other serotonin receptors, such as 5-HT_{1A} (5-HT_{1AR}) [19]. Other multifunctional LCAPs are also known, with simultaneous affinity to serotonins, dopamines and other receptors. Aripiprazole (Fig. 1) is an example of a well-known antipsychotic drug that exhibits such activity [20]. The multifunctionality of ligands with LCAP structures is related to the structural similarity of receptors and the similarity of the binding site of the same family. For 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors, the resemblance is as high as 49% [21]. NAN-190 and its analog (Fig. 1) are another examples of bioactive compounds belonging to LCAPs, showing dual 5-HT_{1AR}/5-HT_{7R} activity [19,22].

Changing the chemotype of a compound is one of the strategies to reduce affinity to 5-HT_{1A} receptors. Recently [23] we developed a group of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine compounds being active ($K_i < 60$ nM) and selective 5-HT₇ receptor ligands (Fig. 2). The

* Corresponding author.

E-mail address: damian.kulaga@pk.edu.pl (D. Kutaga).

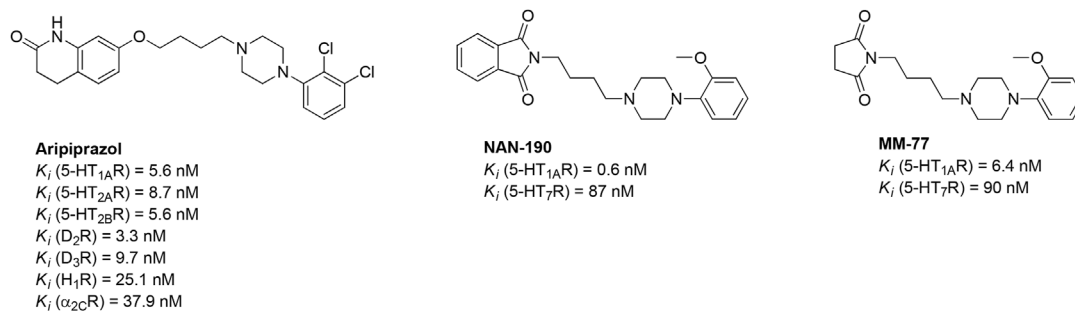


Fig. 1. Examples of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor ligands bearing arylpiperazine moiety as well as multifunctional aripiprazole [19,20,22].

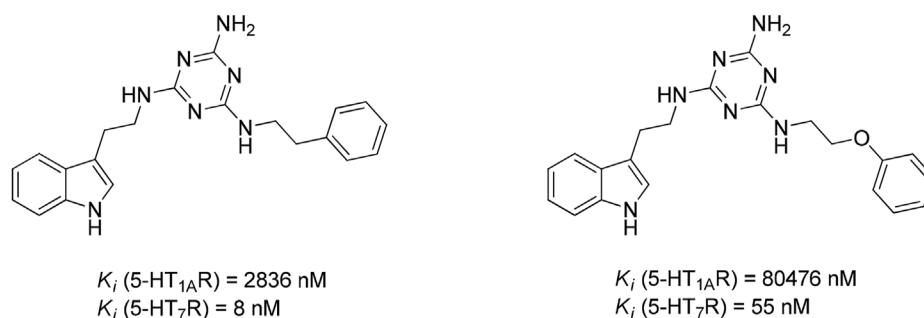


Fig. 2. Affinity (K_i) of 5-HTR ligands with triazine cores to 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors.

compounds have three-point structures without nitrogen atoms which can be protonated at pH of about 7.4.

It follows from these data that novel selective 5-HT₇ receptor ligands could be designed without an arylpiperazine core. With this in mind, we wanted to investigate the effect of selected structural modifications that changed the direction of affinity from the 5-HT_{1A} receptor to the 5-HT₇ receptor, with the ultimate aim of changing the chemotype of the compounds (Fig. 3). However, to evaluate selectivity of the compounds, the ligands were also tested in terms of affinity to other receptors, including 5-HT_{2A}, 5-HT₆ and D₂ dopamine receptors. Structural modifications were also evaluated by molecular modeling to determine bioconformation and the key

interactions involved in the formation of the ligand-5-HT₇R complex. In addition, their intrinsic function was found for selected compounds and they were evaluated in terms of safety and bioavailability in ADME-Tox screening.

Our previous studies have shown that ipsapirone derivatives (1–9 [24]) exhibit high affinity to 5-HT_{1A} receptor and moderate affinity to 5-HT₇ receptor. Therefore, this group of compounds have become the starting point for the design of new molecules [24]. We mainly focused on derivatives containing unsubstituted phenyl piperazine and phenyl piperazine substituted with an *o*-OMe group (present e.g. in NAN-190) or 2,3-Cl₂ (present e.g. in aripiprazole). As the derivatives with an aminotriazine core show affinity to 5-HT₇

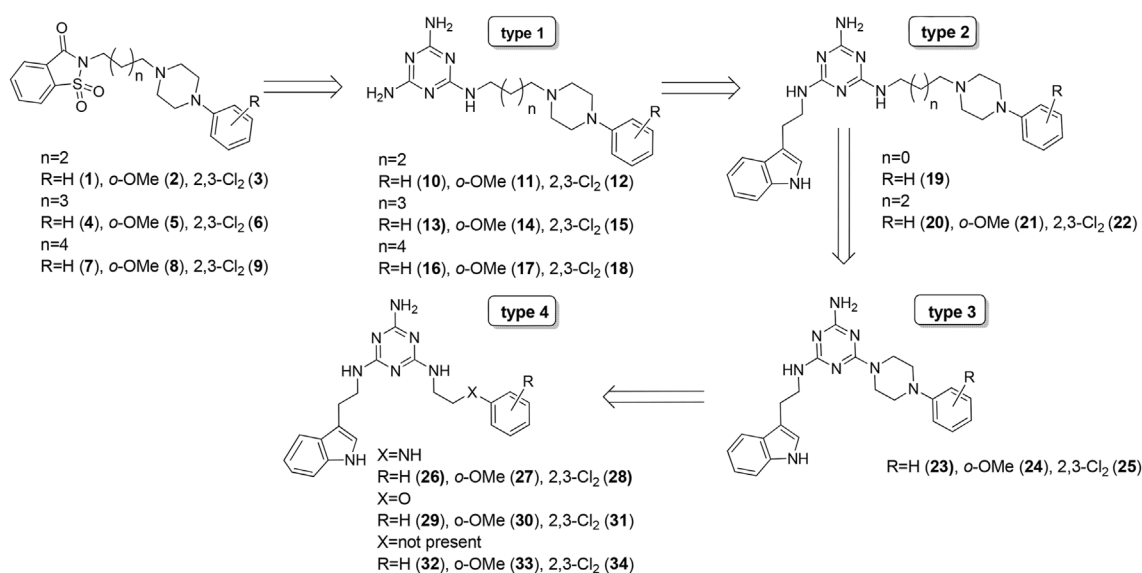


Fig. 3. Structures of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine derivatives studied herein.

receptors, we first replaced a saccharin fragment with aminotriazine to obtain the first type of compounds **10–18**. We showed [23] that aminotriazines with an indole motif could also be active only toward the 5-HT₇ receptor and therefore, we attached a tryptamine molecule to the first type of compounds and thus obtained the second type of compounds **19–22**. As for this set, we mainly focused on ligands having a butylene linker between arylpiperazine and triazine because longer linkers contributed to poorer ADME parameters *in silico* (according to SwissADME platform). Another step was to shorten the chain from butylene to ethylene and subsequently to remove the linker completely; the third type of compounds was thus obtained **23–25**. In the last step, we evaluated the effect of the ethylene bridge in the piperazine on affinity to the 5-HT₇ receptor; the fourth type of compounds was obtained **26–34**.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Compounds type 1 were prepared according to Scheme 1. In the first step, phthalimide **35** was alkylated with an excess of alkyl halides **36–38** in microwave reactor (P = 50 W) for 60 s, and desired products **39–41** were obtained with 76–91% yield [25]. The resulting ω-bromoalkylphthalimide **39–41** were further reacted using slight excess (1.1 eq.) of corresponding 1-arylpiperazines **42–44** according to the reported procedure [26]. After completion of the reaction (15 h, TLC analyzed) the reaction was quenched and desired products **45–53** were isolated by column chromatography with 83–93% yield. The resulting intermediate was subjected to Gabriel reaction and free amines **54–62** were obtained with 90–100% yield. Next, commercially available 2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine **63** reacted with an excess of **54–62** in the presence of 5 %wt. of DMF in microwave reactor (P = 50 W) for 2.5 min. After completion of the reaction (confirmed by TLC analysis) the final products **10–18** were isolated by column chromatography. The obtained products were converted to hydrochloride salts by dissolving free bases in acetone then acidification to pH 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. Overall yield of the desired compounds was in the range of 61–78%.

Compounds of type 2 were synthesized from cyanuric chloride **64** according to Scheme 2. First, **64** was transformed to amine **65** according to the reported procedure [27] which was further reacted with piperazines **54–56**. The reactions were performed in boiling

1,4-dioxane with DIPEA for 20 min and the products **66–68** were isolated with 85–90% of yield. The resulting compounds were subsequently reacted with tryptamine **69** for 2.5 min in microwave reactor (P = 50 W) [23] and compounds of type 2, **20–22** were obtained in 38–64% of yields. The obtained **20–22** were converted to hydrochloride salts by treating with HCl in the acetone solution.

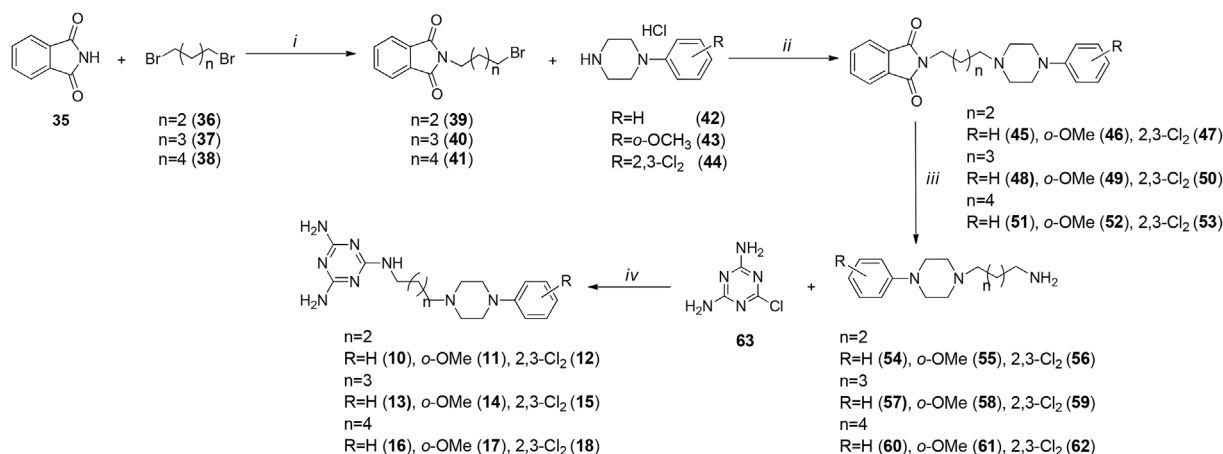
The compounds of type 3 and 4 were synthesized from readily available **70** [23] according to Scheme 3. The later compounds reacted with appropriate amines **42–44**, **71–77** and **78** according to reported procedure [23] leading to the desired compounds **19**, **23–25** and **26–34** isolated with 40–79% yield. Free bases were converted to hydrochloride salts according to the same procedure as for compounds type 2. It is important to note that compounds of type 2 (**20–22**) were initially synthesized according to Scheme 3 through N-alkylation of amines **54–56** with **70**; unfortunately, no product formation was seen on TLC. Interestingly, it was found that the same reaction had 82% yield for commercial amine **78** (finally ligand **19**).

Amines **71–73** were prepared according to Scheme 4. The reactions involved one-step reaction of appropriate aniline **79–81** with 2-chloroethylamine hydrochloride **82**. The reaction was conducted in boiling toluene for 20 h. Thereafter, desired product **71–73** was isolated with 62–77% yield.

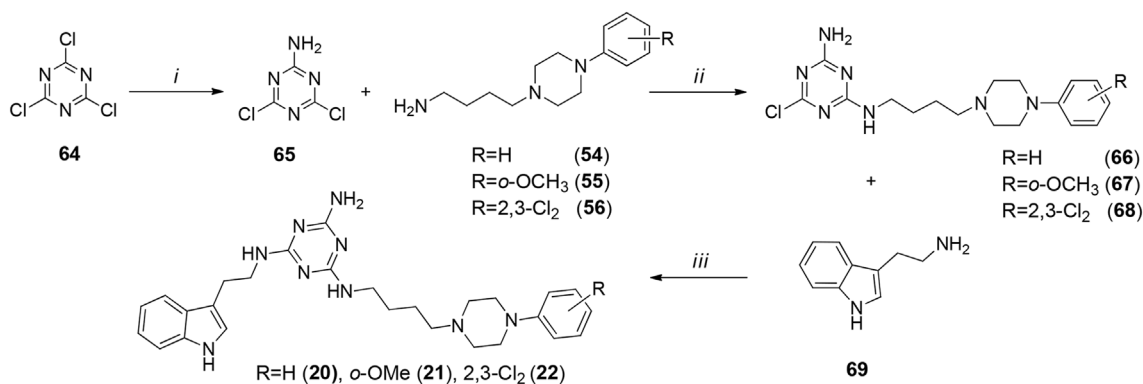
Synthesis of amines **74–75** was more complex. Initially we tried to prepare the desired products in a reaction of phenols **83–84** with 2-chloroethylamine hydrochloride **82**, but product **74–75** formation was not observed. However, 1,2-dibromoethane **85** was successfully used as an alkylating agent. The synthesis of compounds leading to amines **74–75** (Scheme 5) was conducted as reported by Groszek et al. [28] The resulting product **86–87** was reacted with potassium phthalimide **88** in the presence of potassium iodide. The reaction was conducted in DMF at 50 °C for 5 h; subsequently, water was added and the resulting precipitate was stirred at room temperature for 12 h. Creamy precipitate **89–90** was subsequently subjected to Gabriel reaction and desired amines **74–75** were obtained (analytical data, see the Supplementary material). Amines **76** and **77** used for the synthesis of set 4 compounds were acquired commercially.

2.2. Radioligand binding and SAR

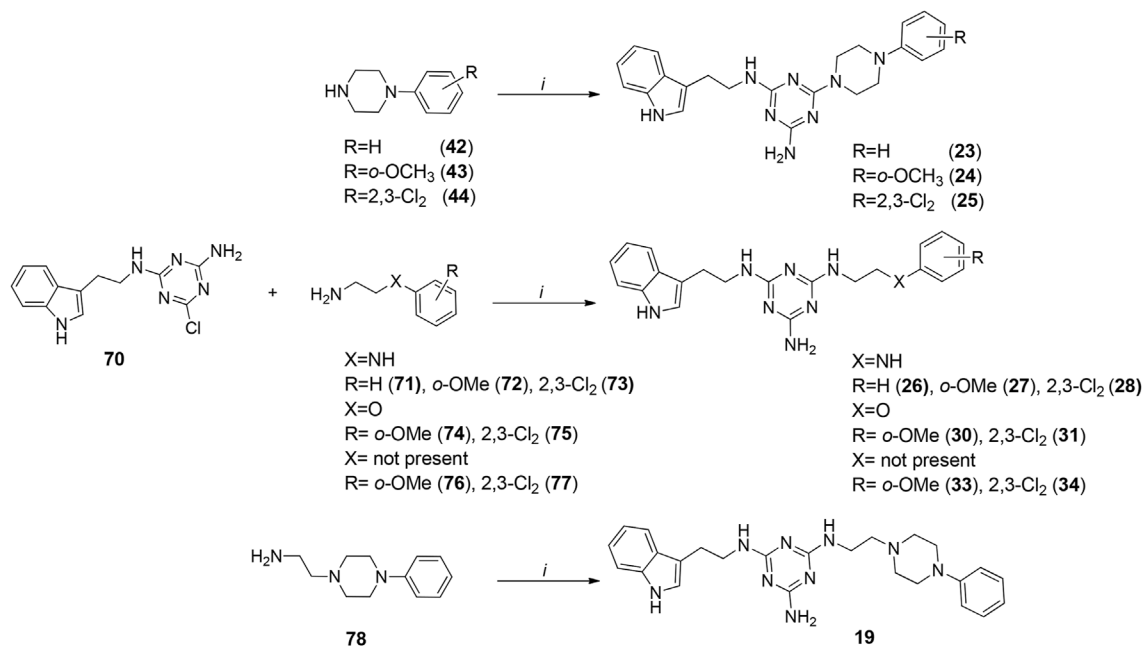
The affinity of the studied compounds to 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇ and D₂ receptors was evaluated by a radioligand assay as reported previously (Table 1) [29]. The affinity values of previously



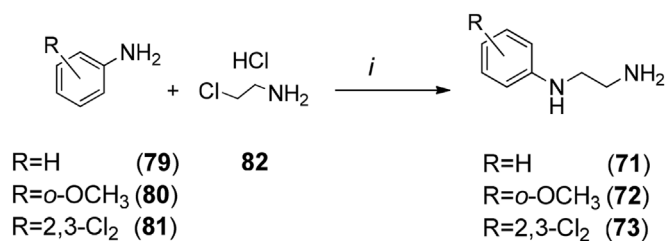
Scheme 1. Synthesis pathway of compounds of type 1 **10–18**. *i* – K₂CO₃, TBAB, MW, 50 W, 60 s; *ii* – K₂CO₃, ACN, 90 °C, 15 h; *iii* – MeNH₂, NaOH, rt, 20 h; *iv* – K₂CO₃, TBAB, MW, 50 W, 2.5 min.



Scheme 2. Synthetic pathway for type 2 compounds **45–47**. *i* – NH₃ aq., DCM, 0 °C–5 °C, 20 min; *ii* – DIPEA, 1,4-dioxane, reflux, 20 min; *iii* – K₂CO₃, TBAB, MW, 50 W, 2.5 min.



Scheme 3. Synthetic pathway for type 2 **19**, type 3 **23–25** and type 4 **26–34**. *i* – K₂CO₃, TBAB, MW, 50 W, 2.5 min.



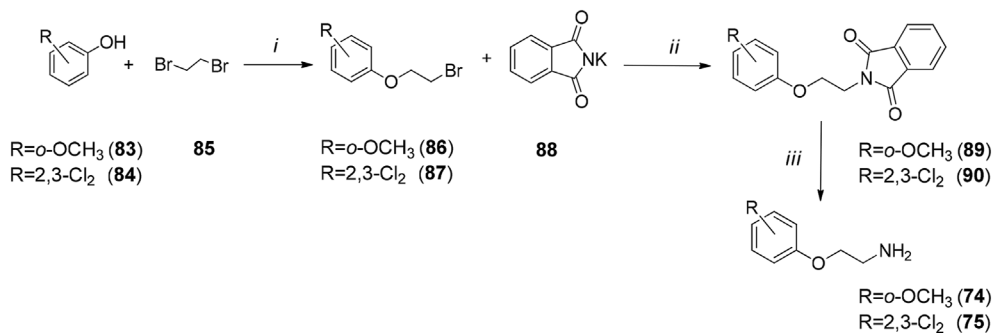
Scheme 4. Synthetic pathway for amines **71–73**. *i* – toluene, reflux, 20 h.

reported ipsapirone derivatives [24,25] were considered starting points for further proceeding and they are listed in Table 1. It is noted in a review of the available data on the affinity of ipsapirone derivatives **1–9** to 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors that the compounds had higher activity ($K_i < 50$ nM) toward 5-HT_{1A} than toward 5-HT₇ receptors [24,25]. High affinity was observed for D₂R as well [24,25].

Replacement of the saccharin core in ipsapirones with 2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine moiety yielded ligands **10–18** active

toward the 5-HT_{1A} receptor with $K_i < 100$ nM, while affinity to the 5-HT₇ receptor drastically dropped. The activity of compounds of type 1 toward 5-HT_{1A} receptor strongly depends on the aryl substituents in arylpiperazine moiety and alkyl-chain length. Compounds bearing an unsubstituted aryl ring **10**, **13**, **16** possess the lowest activity toward 5-HT_{1A} receptor ($K_i = 56$ nM for **10**, $K_i = 71$ nM for **13** and $K_i = 82$ nM for **16**). Also, the extension of the alkyl-chain length led to a decrease in the affinities. The replacement of the phenyl group with 2,3-chlorophenyl moiety in compounds of type 1 results in significant increase the affinity toward 5-HT_{1A} receptor, i.e. compound **12** $K_i = 7$ nM, **15** $K_i = 5$ nM, **18** $K_i = 4$ nM. Conversely, 2-methoxyphenyl analogues exhibit somewhat smaller activity than 2,3-Cl₂ analogues, i.e. **11** $K_i = 48$ nM, **14** $K_i = 12$ nM, **17** $K_i = 4$ nM; for the latter, the K_i value was identical as for **18**. In addition, we observed that increase of the alkyl-chain length led improve the affinity of the substituents-bearing compounds toward 5-HT_{1A} receptor.

Each compound was tested in triplicate at 7 concentrations (0.1 nM–100 μM). Inhibition constants (K_i) were calculated from the Cheng-Prusoff equation [30]. Results were expressed as means of at least two separate experiments ± standard deviation (SD),



Scheme 5. Synthetic pathway for amines. *i* – NaOH, H₂O, rt, 20 h; *ii* – KI, DMF, 50 °C; *iv* – MeNH₂, NaOH, rt.

Table 1
Affinity (K_i in [nM]) of the previous studied ligands (**1–9**) [24] and novel derivatives containing triazine motifs to 5-HT_{1A}R and D₂R.

Type No.	Ligand No.	n	R	X	5-HT _{1A} R	5-HT _{2A} R	5-HT ₆ R	5-HT ₇ R	D ₂ R
	1*	2	H	–	3	474	4664	631	249
	2*	2	<i>o</i> -OMe	–	8	382	161	96	7
	3*	2	2,3-Cl ₂	–	1	2580	2662	372	26
	4*	3	H	–	16	313	1836	148	165
	5*	3	<i>o</i> -OMe	–	3	584	1991	125	20
	6*	3	2,3-Cl ₂	–	29	126	197	149	17
	7*	4	H	–	20	321	971	192	48
	8*	4	<i>o</i> -OMe	–	10	764	779	105	1
	9*	4	2,3-Cl ₂	–	58	209	920	119	132
	10	2	H	–	56	2619	17350	1500	366
	11	2	<i>o</i> -OMe	–	48	9581	10870	1447	46
	12	2	2,3-Cl ₂	–	7	24	136	167	7
	13	3	H	–	71	4408	9302	1039	1039
	14	3	<i>o</i> -OMe	–	12	6521	6652	947	38
	15	3	2,3-Cl ₂	–	5	17	282	343	8
	16	4	H	–	82	3265	13650	984	1009
	17	4	<i>o</i> -OMe	–	4	1455	7704	713	20
	18	4	2,3-Cl ₂	–	4	13	389	193	5
	19	0	H	–	405	67	277	8	418
	20	2	H	–	32	24	506	8	52
	21	2	<i>o</i> -OMe	–	12	344	1706	156	13
	22	2	2,3-Cl ₂	–	73	222	109	109	39
	23	–	H	–	12960	10640	3220	798	8333
	24	–	<i>o</i> -OMe	–	12970	27660	2907	7872	13460
	25	–	2,3-Cl ₂	–	6806	7910	1781	1650	3207
	26	–	H	NH	38220	11050	4736	18	8749
	27	–	<i>o</i> -OMe	NH	37040	14390	2798	5823	3907
	28	–	2,3-Cl ₂	NH	23590	18190	475	1576	5003
	29**	–	H	O	8047	1352	530	55	6428
	30	–	<i>o</i> -OMe	O	3177	12830	1183	428	4402
	31	–	2,3-Cl ₂	O	1188	2637	771	474	4402
	32**	–	H	–	2836	1388	665	8	1490
	33	–	<i>o</i> -OMe	–	10280	2749	585	196	13300
	34	–	2,3-Cl ₂	–	706	5967	575	61	3077

SEM \leq 25%; * - according to Ref. [24]; ** - according to Ref. [23];

As for affinity to 5-HT₇R, increased ligand affinity was seen with increasing carbon chain length (even though the ligands had no or poor activity) for ligands with unsubstituted arylpiperazine (**10** K_i = 1500 nM, **13** K_i = 1039 nM, **16** K_i = 984 nM) and with the *o*-OMe substituent (**11** K_i = 1447 nM, **14** K_i = 947 nM, **17** K_i = 713 nM). As with ipsapirone derivatives, some of the type 1 compounds had very high affinity also to D₂R (**12** K_i = 7 nM, **15** K_i = 8 nM, **18** K_i = 5 nM). The compounds with the 2,3-Cl₂ substituent (**12**, **15**, **18**) may be considered multifunctional ligands due to their very high affinity with K_i < 25 nM to as many as three receptor types,

including 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and D₂. For the type 2 compounds (**20–22**), addition of tryptamine did not cause any significant change in affinity to 5-HT_{1A} and D₂ receptors. Shortening the linker from four (**20**, K_i = 32 nM) to two carbon atoms (**19**, K_i = 405 nM) in the same type caused almost 13-fold lower affinity to the 5-HT_{1A} receptor. Interestingly, however, the addition of tryptamine resulted in increased affinity to 5-HT₇R compared to type 1. For example, an almost 190-fold increase in activity was found for compound **20** (K_i = 8 nM) compared to compound **10** (K_i = 1500 nM). The carbon linker shortened to two atoms did not change affinity to 5-HT₇R: ligands **20** and **19** had K_i = 8 nM. By introducing substituents to

arylpiperazine, activity toward 5-HT₇R decreased. Complete removal of the carbon linker (type 3 ligands) caused further loss of activity toward 5-HT_{1A}R according to a trend: **20** ($K_i = 32$ nM), **19** ($K_i = 405$ nM) and **23** ($K_i = 12960$ nM). Unfortunately, it was found that the modification also caused total loss of activity toward 5-HT₇R and the other receptors. In the last stage of research, absent activity toward the 5-HT_{1A} receptor was obtained by removing the ethyl bridge in piperazine, while activity toward 5-HT₇R dramatically increased. It seems that the flexible chain that connects triazine with the aryl fragment (compound **26** $K_i = 18$ nM vs. **23** $K_i = 798$ nM) is important to maintain high activity and selectivity toward the 5-HT₇ receptor. For all the type 4 ligands, addition of a substituent (*o*-OMe or 2,3-Cl₂) to the aryl ring caused decreased affinity to 5-HT₇R, and the effect was strongest when substituent X was NH group and weakest when substituent X was absent. All the designed type 4 compounds had no affinity toward the 5-HT_{2A}, 5-HT₆ and D₂ receptor.

2.3. Atlas Activity analysis: 3D-SAR

To study the chemical structure-activity relationship (SAR), we used the Atlas Activity tool, a component of Forge (Cresset workbench). Based on probabilistic SAR analysis (Bayesian approach), Atlas Activity creates activity maps as functions of electrostatics, hydrophobicity and ligand shapes. In this work, we focused on the set 4 ligands due to their high activity and selectivity toward the 5-HT₇ receptor, and we evaluated hydrophobicity and ligand shapes (Fig. 4). Ligand **32** previously docked to a homological 5-HT₇ receptor model was used as the reference compound [23]. When analyzing the structure it is found that the phenyl ring of active ligands (e.g. **26**, **29**, **34**) occupies favorable hydrophobic space (checkered green area) in which stabilizing π - π bonds can be formed with the amino acid in the receptor's binding pocket. The hydrophobically favorable space overlaps the space (plain green area) in which sterically bulky substituents have a positive effect on biological activity. For inactive ligands in which arylpiperazine is directly attached to the triazine ring (**23**, **24**, **25**) and those without

the ethyl linker in piperazine (**27**, **28**), the phenyl ring is more linear than in ligands **26**, **29**, **34** and it occupies a hydrophobically unfavorable region (checkered red area). As before, the region overlaps the space (plain red area) in which sterically bulky substituents have a negative effect on biological activity.

2.4. Molecular modeling

We decided to investigate the increased activity toward the 5-HT₇ receptor using molecular modeling in a docking experiment (Fig. 5). The following compounds were analyzed: **1** ($K_i = 631$ nM), **10** ($K_i = 1500$ nM), **19** ($K_i = 8$ nM), **20** ($K_i = 8$ nM), **23** ($K_i = 798$ nM), **26** ($K_i = 18$ nM), **34** ($K_i = 61$ nM). Ligands **1** and **10** are typical long-chain arylpiperazines and therefore, the binding site and the binding mode are expected to be similar for this type of compounds [31]. Both ligands occupy an aromatic binding pocket reported by Kołaczowski et al. [31] in which phenylpiperazine group interacts with F6.52 and W6.48 through hydrophobic interactions (π - π stacking). The crucial salt bridge is found between the protonated nitrogen and D3.32 [32,33] with a length of below 3.0 Å. Unfortunately, typical hydrogen bonds characteristic of this group of compounds, for example with S5-42/Y7.43, were not found in either case [34]. It may be due to this fact that ligands **1** and **10** (even though additional hydrogen bonds exist) have no affinity toward the 5-HT₇ receptor. Addition of a tryptamine molecule to the triazine core caused dramatically increased biological activity to 5-HT₇R (**20**, $K_i = 8$ nM). Even though the chemical structure of compound **20** is spatially larger than **10**, the ligand fits in the same binding site as for previous compounds. Phenylpiperazine occupies a hydrophobic binding pocket and interacts with F6.52 and W6.48 through a π - π stacking hydrophobic bond. Another key interaction typical of all aminergic receptors is a salt bridge with D3.32 which forms a bond with the protonated piperazine nitrogen. The triazine and indole fragment faces the external side of the receptor. The triazine nitrogen atom interacts through hydrogen bonding with R7.36, the key amino acid [35]. Additional stabilizing bonds (hydrogen bonds) are seen between the amine group attached to

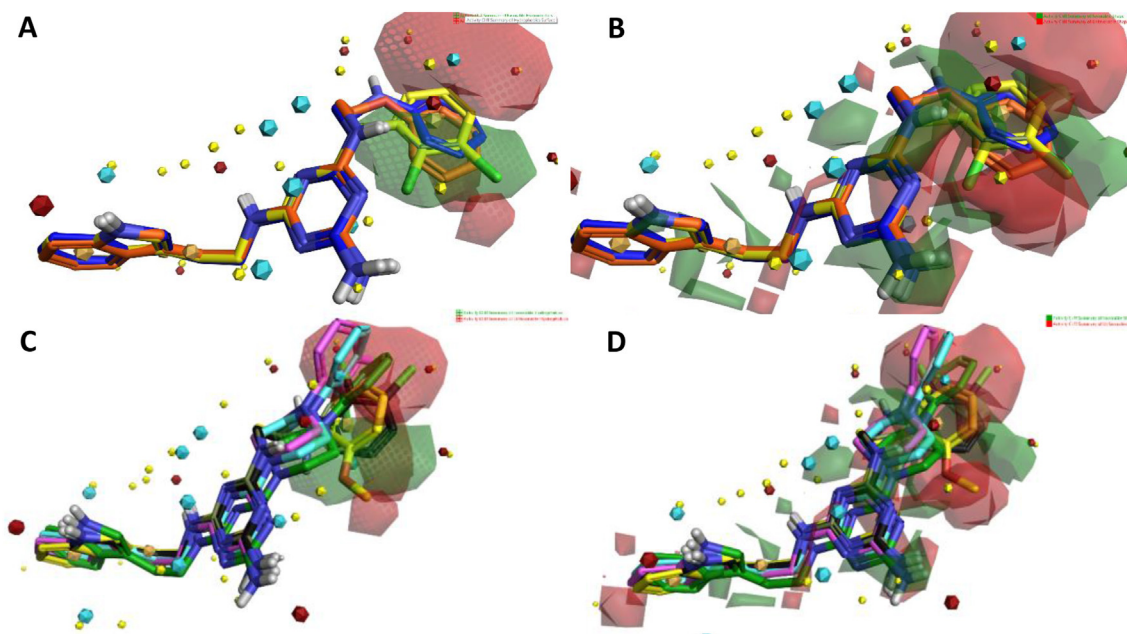


Fig. 4. Activity cliff summary map. A – favorable (checkered green)/unfavorable (checkered red) hydrophobics for **26** (blue), **29** (red), **34** (yellow); B – favorable (plain green)/unfavorable (plain red) shape for **26** (blue), **29** (red), **34** (yellow); C – favorable (checkered green)/unfavorable (checkered red) hydrophobics for **23** (green), **24** (turquoise), **25** (pink), **27** (yellow), **28** (black); D – favorable (plain green)/unfavorable (plain red) shape for **23** (green), **24** (turquoise), **25** (pink), **27** (yellow), **28** (black).

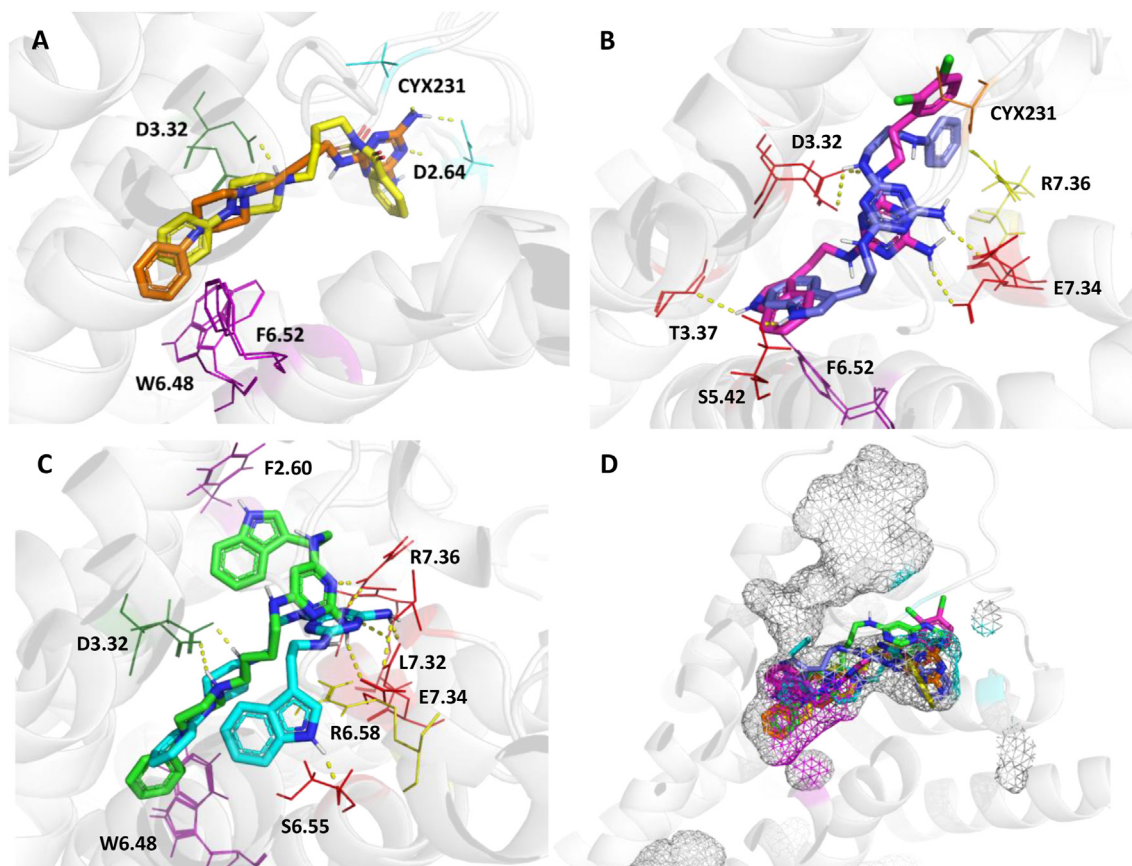


Fig. 5. Binding mode obtained in a docking study for the compounds. A – representative typical long-chain arylpiperazines: compound **1** (yellow) and **10** (orange). Color codes for the amino acids; magenta: hydrophobic binding pocket; green: conserved salt bridge, cyan, cyan: additional amino acid with no effect on ligand binding. B – representative type 2 compounds: compound **19** (cyan) and **20** (light green). Color codes for the amino acids; magenta: hydrophobic binding pocket; green: conserved salt bridge, red: hydrogen bond acceptors (R7.36 as donor), yellow: π -cation interaction. C – representative type 4 compounds: compound **26** (blue) and **34** (purple). Color codes for the amino acids; magenta: hydrophobic binding pocket; red: hydrogen bond acceptors, yellow: π -cation interaction; orange: halogen bond. D – superimposed compounds (**1**, **10**, **19**, **20**, **26**, **34**) and their visualization in the receptor.

triazine and E7.34 and L7.32. A bent indole fragment interacts with F2.60 (π - π stacking) and with F3.28 in its vicinity. Shortening the carbon linker by two atoms (**19** $K_i = 8$ nM) had no effect on receptor affinity. The ligand is anchored between TMh3, TMh5, TMh6 and TMh7 and it adopts a deeply bent conformation; however, the key interactions, including π - π stacking with hydrophobic aromatic ring F6.52, salt bridge with D3.32, hydrogen bonding with R7.36 and E7.34, are still observed. In addition, one further interaction was found, including cation- π between the indole aromatic system and R6.58 as well as hydrogen bonding between the indole NH group and S6.55. Removal of the carbon linker caused complete elimination of activity (**23**, $K_i = 798$ nM). Nitrogen protonation ($\text{pH} = 7.4 \pm 2.0$) in piperazine was not observed and, therefore, the key salt bridge with D3.32 did not form. In addition, no other characteristic hydrogen bonds, for example with R7.36 or E7.34, were found. Removal of the ethyl bridge in piperazine (**26**, $K_i = 18$ nM) increased affinity to the 5-HT₇ receptor. However, the ligand arrangement in the protein is unlike in those discussed earlier. The indole fragment occupies the internal receptor part in which the aromatic system interacts with F6.52 through π - π stacking hydrophobic interactions and the indole NH forms a hydrogen bond with S5.42. The triazine ring amine group interacts with E7.34 through a hydrogen bond. The interaction seems to be important for the aminotriazine derivatives that do not form a salt bridge with D3.32 [23]. For this ligand, a stabilizing cation- π bond was found between the phenyl ring (*N*-phenylethyl fragment) and

R7.36. For ligand **34** ($K_i = 61$ nM), a binding mode identical to that in the previously published compounds was found [23]. All the interactions typical of this group of compounds were maintained: F6.52, E7.34, D3.32 (hydrogen bond-like). Furthermore, an additional hydrogen bond was found between the indole NH nitrogen and T3.37 and also a halogen bond between the chlorine atom and CYX231.

2.5. Functional assay towards 5-HT₇ receptor

The most active compounds (**19**, **22**, **26**, **32**, **34**) toward 5-HT₇ receptor were tested in functional assay to evaluate their intrinsic function (Table 2). All of tested compounds showed antagonistic mechanism. K_b values mainly correspond to radioligand assay values (K_i).

Table 2
The results of functional assays for compound **19**, **22**, **26**, **32**, **34**.

Ligand No.	5-HT ₇ K_i [nM]	5-HT ₇ K_b [nM]
19	8	7
22	109	53
26	18	31
32 **	8**	34
34	61	300

** - according to [23].

2.6. Metabolic stability

Metabolic stability testing of compounds **22** and **34** (Table 3) was performed using mouse liver microsomes (MLMs). UPLC-MS analysis showed that after 2 h of incubation with MLMs, 40% and 39% of compound **22** and **34**, respectively, remained in the test samples. Verapamil, easy metabolized drug was used as control in the test: 24% remained in the test sample. This shows that test compounds **22** and **34** have higher stability than the reference compound. Two chlorine atoms introduced to the alkylaromatic ring (compound **34**) increased stability more than twice compared to a compound without chlorine atoms (compound **32** [23]). As for compound **22** eight possible metabolites (Supplementary material) were identified, while for compound **34** three possible metabolites (Supplementary material) were found. Using MetaSite 6.0.1 software, potential sites in the structure susceptible to enzymatic action were simulated (Fig. 6).

2.7. CYP3A4 interaction

CYP3A4, of the cytochrome P340 enzyme group, is important for the biotransformation of many xenobiotics [36]. Therefore, potential interactions between the enzyme and compounds tested should be considered at an early stage when designing novel compounds with biological activity. We found that the most active compounds possess moderate (**22**, %CYP3A4 = 56.8) or weak (**34**, %CYP3A4 = 58.8) possible drug-drug interactions with respect to ketoconazole, a reference drug. We also noted that addition of chlorine atoms decreased the risk of potential drug interactions compared to an unsubstituted compound (**32**, %CYP3A4 = 34.7 [23]). The results are shown in Fig. 7.

2.8. Hepatotoxicity

Within preliminary safety assessment, the test compounds (**22** and **34**) were evaluated using a HepG2 cell line. Ligand **22** (Fig. 8A) had a strong cytotoxic potential at above 50 μ M, and almost 100% of cells were killed above this level. It was not cytotoxic at 1–10 μ M. Ligand **34** (Fig. 8B) had lower cytotoxicity than compound **22**. At

1–10 μ M, the ligand had no cytotoxicity, while at 50 μ M, cell viability slightly decreased by approx. 65%. With 100 μ M of ligand **34**, cell viability was approx. 30%.

3. Conclusion

The goal of this paper was to design novel ligands in which the effect of structural modifications on changing affinity from the 5-HT_{1A} to the 5-HT₇ receptor will be observable. To evaluate selectivity of the studied compounds, the radioligand binding assay was extended to include D₂, 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptors. Long-chain arylpiperazines with the terminal triazine moiety (compounds type 1) showed affinity mainly to 5-HT_{1A} ($K_i \leq 82$ nM) and D₂ receptors. Addition of a tryptamine molecule (type 2: **20**, **21**, **22**) did not change the affinity profile toward 5-HT_{1A}R/D₂R and it further increased affinity toward 5-HT₇R. The carbon chain shortened to two atoms (type 2: **19**) decreased affinity toward 5-HT_{1A} and D₂ receptors. Complete removal of the carbon linker (type 3) caused loss of affinity to all the tested serotonin receptors and the dopamine D₂ receptor. The following conclusion is made here: to maintain certain affinity to the receptors tested, rotatability between the triazine core and arylpiperazine should be maintained. The conclusion is additionally supported by the fact that removal of the ethylene linker in piperazine (type 4) dramatically increased affinity, but only toward the 5-HT₇ receptor (except for ligands **27** and **28**). For type 4, the effect of various substituents X on receptor binding was also tested. It was found that affinity toward the 5-HT₇ receptor was lowest for ligands with X = N (**27**, **28**), higher for ligands with X = O and highest for ligands without substituent X. The ligands (type 2 and 4) with an unsubstituted ring maintained the highest affinity to 5-HT₇R compared to those with a substituted ring. SARs for the resulting compounds were also evaluated using 3D-QSAR computed methods and molecular modeling (docking). For the ligands with the arylpiperazine present (type 1 and 2), the compounds had binding modes typical of arylpiperazines with formation of a characteristic salt bridge between the protonated nitrogen in piperazine and D_{3.32}. The piperazine nitrogen in type 3 compounds was not protonated and, therefore, salt bridge formation was not observed. The compounds without the arylpiperazine

Table 3

Metabolic stability summary: molecular masses (see Supplement) and metabolic pathways of compounds **22**, **34** and Verapamil (reference unstable drug) after incubation with mouse liver microsomes (MLMs). Main metabolic pathways are marked in red.

Substrate	Molecular mass (<i>m/z</i>)	% remaining	Molecular mass of the metabolite (<i>m/z</i>)	Metabolic pathway
22	554.22	39.95	552.23 (M1)	dehydrogenation
			340.23 (M2)	decomposition
			570.30 (M3)	hydroxylation
			586.25 (M4)	double hydroxylation
			356.24 (M5)	decomposition and hydroxylation
			242.28 (M6)	decomposition and dehydrogenation
			231.05 (M7)	decomposition
			586.25 (M8)	double hydroxylation
32**	373.45	17.36	406.33 (M1)	double hydroxylation or oxidation
			404.33 (M2)	dehydrogenation and double hydroxylation
			390.31 (M3)	hydroxylation
			372.33 (M4)	dehydrogenation
			422.35 (M5)	triple hydroxylation or oxidation
34	442.17	38.96	474.20 (M1)	double hydroxylation
			458.25 (M2)	hydroxylation
			458.19 (M3)	hydroxylation
			440.18 (M4)	dehydrogenation
			441.42 (M1)	demethylation
Verapamil	455.54	23.93	441.42 (M2)	demethylation
			291.35 (M3)	defragmentation
			293.34 (M4)	defragmentation/hydroxylation
			277.33 (M5)	defragmentation

** - according to [23].

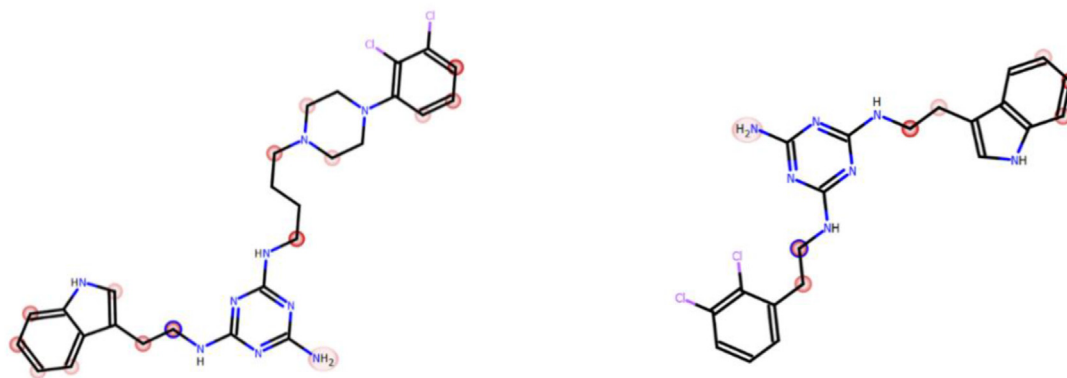


Fig. 6. MetaSite 6.0.1. software prediction of the most probable sites of metabolism for compounds **22** (left) and **34** (right). The darker red color the higher probability to be involved in the metabolic pathway. A blue circle marks the site in a compound with the highest probability of metabolic bioconversion.

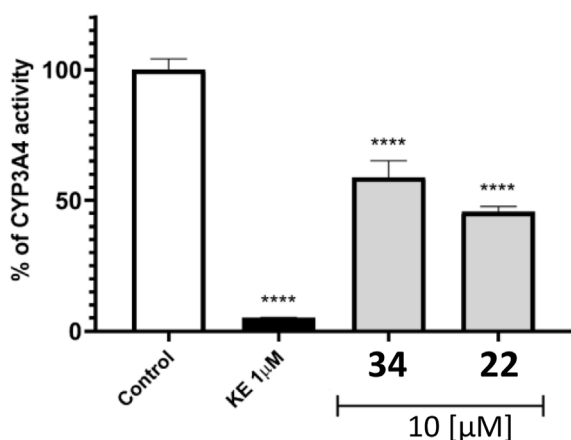


Fig. 7. Influence of **22**, **34** and the reference inhibitor (ketoconazole, KE) on CYP3A4 activity. Statistical significance (**** $p < 0.0001$) was analyzed by Graph Pad Prism 8.0.1 software using One-way ANOVA and Bonferroni's Multiple Comparison Post Test. The compounds were examined in triplicate.

motif (type 4) adopted a reverse arrangement in the receptor, and the hydrogen bond with D3.32 being formed was probably temporary only. The hydrogen bond between the triazine amine substituent and E7.34 was important during formation of the ligand-receptor complex [23]. All examined compounds (**19**, **22**, **26**, **32**, **34**) showed antagonistic mechanism. The tested compounds **22**

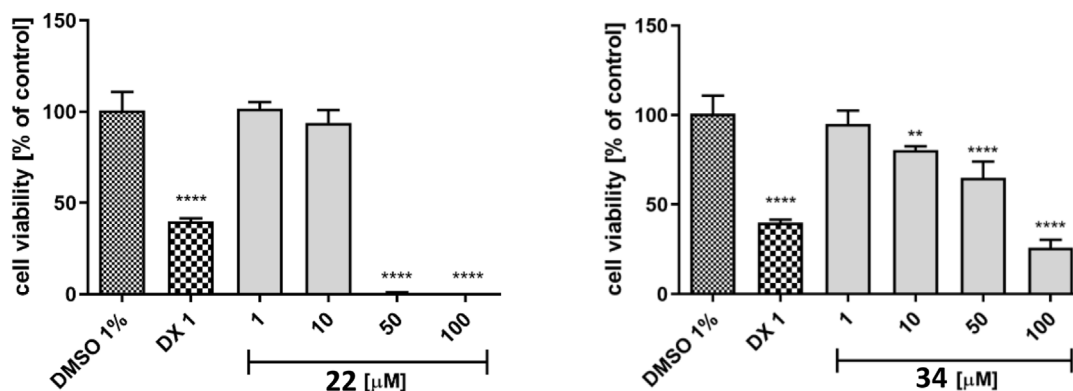


Fig. 8. Effect of cytostatic drug doxorubicin (DX) and **22** (left), **34** (right) on hepatoma HepG2 cell line viability after 72 h of incubation at 37 °C, 5% CO₂. Statistical significance (GraphPad Prism 8.0.1) was evaluated by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's Comparison Test (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ compared with negative control (DMSO 1% in growth media)).

and **34** had higher metabolic stability than verapamil and moderate or weak potential drug-drug interactions with respect to ketoconazole, the reference drug. Compound **22** had strong cytotoxicity in the HepG2 cell line already at concentrations above 50 μM. Compound **34** had reduced cytotoxicity. Based on this research we designed new one compounds with increased affinity to 5-HT₇R which will be described in our further publication.

4. Experimental section

4.1. Chemistry

4.1.1. General

All the reactants were purchased from commercial sources. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded using Bruker 400 MHz systems with TMS as an internal standard. Melting points were determined with the Bötius apparatus. UHPLC-MS analyses were performed on Shimadzu Nexera XR system equipped with PDA (SPD-M40) and LCMS-2020 detectors. Analyses were performed on Phenomenex XB-C18 1.7 mm (50 × 2.1 cm) column with isocratic or gradient of solvents as a mobile phase. Solvent A (0.01% HCOOH in water), solvent B (0.01% HCOOH in MeOH) and solvent C (0.01% HCOOH in MeCN), flow rate 0.3 ml min⁻¹, the UV-VIS detection was performed in a range of 240–700 nm, the MS data were collected in ESI + mode in a range of m/z 100–800 with scan speed 15000 u/s and event time 0.1 s. For samples **16** and **21**: the UPLC MS/MS system consisted of a Waters ACQUITY UPLC (Waters Corporation,

Milford, MA, USA) coupled to a Waters TQD mass spectrometer electrospray ionization mode ESI tandem quadrupole). Chromatographic separations were carried out using the Acquity UPLC BEH (bridged ethyl hybrid) C18 column; 2.1 × 100 mm and 1.7 μm particle size, equipped with Acquity UPLC BEH C18 VanGuard precolumn; 2.1 × 5 mm, and 1.7 μm particle size. The column was maintained at 40 °C and eluted under gradient conditions using from 95% to 0% of eluent D over 10 min, at a flow rate of 0.3 ml min⁻¹. Eluent D: (0.1% HCOOH in water); eluent E: (0.1% HCOOH in MeCN). Chromatograms were recorded using Waters eλ PDA detector. Spectra were analyzed in 200–700 nm range with 1.2 nm resolution and sampling rate 20 points/s. MS detection settings of Waters TQD mass spectrometer were as follows: source temperature 150 °C, desolvation temperature 350 °C, desolvation gas flow rate 600 l/h, cone gas flow 100 l/h, capillary potential 3.00 kV, cone potential 30 V. Nitrogen was used for both nebulizing and drying gas. The data were obtained in a scan mode ranging from 50 to 1000 *m/z* in time 0.5 s intervals. Data acquisition software was MassLynx V 4.1 (Waters). **Method A** (UHPLC-MS) – gradient of solvents: *t* = 0 min, A = 100%; *t* = 2 min, A = 100%; *t* = 4 min, A = 10%, B = 45%, C = 45%; *t* = 4.5 min, A = 10%, B = 45%, C = 45%; *t* = 7 min, A = 100%, analysis stop time 10 min. **Method B** (UHPLC-MS) – isocratic flow: 20% of B, 20% of C and 60% of A. **Method C** (UPLC-MS) – gradient of solvents 95%–0% of eluent D and E. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using 0.2 mm silica gel precoated aluminum sheets (60 F254, Merck) and UV light at 254 nm was used for visualization. A CEM Discover™ Focussed Microwave System at 50 W power was used for all microwave-assisted reactions in order to obtain final compounds. Within 2.5 min of reaction with a power of 50W, the temperature increased up to 120 °C, while the pressure increased up to 9 bar. Characterization of the intermediates and spectra for the final compounds can be found in Supporting Information.

4.1.2. General procedure for the synthesis of compounds 39–41 (microwave-assisted)

Phthalimide **35** (4 g, 27 mmol), potassium carbonate (11.3 g, 81 mmol) and TBAB (0.87 g, 2.7 mmol) were ground in a mortar and transferred to a round bottom flask. Subsequently, an appropriate alkyl halide **36–38** (81 mmol) was added followed by addition of 5 wt % DMF. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 60 s while the pressure increased up to 3 bar. Reaction progress was monitored via TLC (hexane: EtOAc 10:10 v/v). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 30 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting slurry was purified via flash chromatography with elution from 100% hexane to 100% methanol. The methanol phase was evaporated to dryness, and the crude product was crystallized from MeOH to yield white solid **39–41**.

4.1.3. General procedure for the synthesis of compounds 45–53 (conventional heating)

Intermediate **39–41** (3.5 mmol), an appropriate arylpiperazine **42–44** (3.85 mmol), potassium carbonate (10.5 mmol) followed by ACN (40 mL) were placed in a round bottom flask and heated at 90 °C for 15 h. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 90:10 v/v). After 15 h of heating, the mixture was filtered immediately through a Schott funnel and then a crude product precipitated which was then filtered again. A yellowish crude product was purified via crystallization from methanol or column chromatography (with isocratic elution using EtOAc: MeOH 95:5 v/v) to yield pure solid product **45–53**.

4.1.4. General procedure for the synthesis of compounds 54–62 and 74–75: Gabriel reaction

Intermediate **45–53** and **89–90** (3 mmol) was dissolved in 40 wt % methylamine solution in H₂O (26.7 mL, 300 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 20 h. Afterwards, the solid intermediate dissolved, and TLC (chloroform: MeOH 90:10 v/v) indicated disappearance of the starting material. 20% NaOH solution (25 mL) was added and the mixture was stirred for further 20 min and then extracted with chloroform (3 × 30 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated. Crude product **54–62** and **74–75** was used in the next step without any further purification.

4.1.5. General procedure for the synthesis of final compounds 10–18 (microwave-assisted)

2-Chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine **63** (0.1 g, 0.7 mmol), **54–62** (1.75 mmol), potassium carbonate (0.29 g, 2 mmol) and TBAB (0.02 g, 0.07 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube. Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 80:20 v/v). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 15 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform: MeOH 95:5 v/v, then chloroform: MeOH 90:10 v/v, then chloroform: MeOH 85:15 v/v. The white solid was then dissolved in acetone and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. The resulting mixture was placed in the fridge. The precipitated white or beige powder was then filtered, rinsed with acetone and dried.

4.1.6. N²-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**10**)

White solid (68% yield), mp: 244–247 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.33 (dd, *J* = 8.6, 7.4 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.00 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.86 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 3.73 (d, *J* = 10.3 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.33–3.22 (m, 6H) – superimposed with solvent residual, 1.96–1.85 (m, 2H), 1.78–1.69 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 161.0, 159.9, 156.7, 148.9, 129.0, 128.9, 121.8, 116.9, 56.2, 51.5, 47.0, 39.4, 25.9, 20.7; UHPLC-MS analysis *t* = 0.42 min (99.5% purity, method A), calc. for C₁₇H₂₆N₈ *m/z* = 342.2, found *m/z* = 343.1 [M+H]⁺

4.1.7. N²-(4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**11**)

White solid (61% yield), mp: 162–167 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.58 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.46–7.39 (m, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H), 7.14–7.08 (m, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.97–3.64 (m, 8H), 3.51 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.40–3.37 (m, 2H), 1.99–1.89 (m, 2H), 1.80–1.71 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 160.7159.7, 156.6, 152.2, 131.8, 129.2, 121.2, 120.7, 112.9, 56.2, 55.3, 49.9, 49.0, 39.4, 25.8, 20.7; UHPLC-MS analysis *t* = 7.40 min (100% purity, method A), calc. for C₁₈H₂₈N₈O *m/z* = 372.2, found *m/z* = 373.1 [M+H]⁺

4.1.8. N²-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**12**)

White solid (71% yield), mp: 164–168 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.33 (s, 1H), 7.31 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 5.9, 3.7 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 3.52 (dd, *J* = 15.5, 9.0 Hz, 4H), 3.38–3.34 (m, 1H) – superimposed with solvent residual, 3.27 (dd, *J* = 22.5, 10.2 Hz, 4H), 1.97–1.86 (m, 2H), 1.78–1.69 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 160.7, 159.8, 156.6, 149.3, 133.6, 127.9, 127.2, 125.6, 119.2, 56.3, 52.0, 48.1, 39.4, 25.9, 20.8; UHPLC-MS analysis *t* = 6.21 min (99.2% purity, method A), calc. for C₁₇H₂₄Cl₂N₈ *m/z* = 410.2, found *m/z* = 411.0 [M+H]⁺

4.1.9. N^2 -(5-(4-phenylpiperazin-1-yl)pentyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**13**)

Beige solid (69% yield), mp: 239–241 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.33–7.27 (m, 2H), 7.04 (dd, $J = 8.8, 0.9$ Hz, 2H), 6.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.57–3.37 (m, 10H), 3.24–3.13 (m, 2H), 1.93–1.80 (m, 2H), 1.74–1.64 (m, 2H), 1.55–1.43 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 162.4, 162.3, 149.8, 128.9, 120.9, 116.6, 56.5, 51.9, 51.7, 39.7, 28.4, 23.3, 23.3; UHPLC-MS analysis $t = 7.42$ min (100% purity, method A), calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_8$ $m/z = 356.2$, found $m/z = 357.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.10. N^2 -(5-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)pentyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**14**)

White solid (67% yield), mp: 157–160 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.33–7.24 (m, 2H), 7.13 (dd, $J = 8.2, 1.1$ Hz, 1H), 7.04 (td, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.83–3.71 (m, 4H), 3.66–3.57 (m, 2H), 3.55–3.43 (m, 4H), 3.28 (dd, $J = 9.5, 7.0$ Hz, 2H), 1.95–1.86 (m, 2H), 1.76–1.67 (m, 2H), 1.54–1.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 160.6, 156.7, 152.3, 135.1, 126.9, 121.0, 119.6, 112.2, 56.5, 55.0, 50.9, 48.3, 39.9, 28.2, 23.2, 23.1; UHPLC-MS analysis $t = 0.91$ min (100% purity, method A), calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_8\text{O}$ $m/z = 386.3$, found $m/z = 387.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.11. N^2 -(5-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)pentyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**15**)

White solid (78% yield), mp: 144–148 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.33 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 5.9, 3.7$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.54 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 3.47 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.32–3.22 (m, 6H) – superimposed with solvent residual, 1.95–1.86 (m, 2H), 1.75–1.67 (m, 2H), 1.55–1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 160.3, 159.8, 156.6, 149.3, 133.6, 127.9, 127.2, 125.6, 119.2, 56.6, 52.0, 48.1, 39.9, 28.2, 23.3, 23.2; UHPLC-MS analysis $t = 1.10$ min (100% purity, method A), calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_8$ $m/z = 424.2$, found $m/z = 425.0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.12. N^2 -(6-(4-phenylpiperazin-1-yl)hexyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**16**)

White solid (73% yield), mp: 172–175 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.49 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.05–6.97 (m, 3H), 3.84–3.64 (m, 4H), 3.54 (d, $J = 11.6$ Hz, 2H), 3.22–3.04 (m, 6H), 1.81–1.70 (m, 4H), 1.47–1.31 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 160.3, 159.0, 156.4, 149.7, 129.6, 121.9, 116.5, 55.66, 50.8, 45.9, 39.0, 28.1, 26.1, 26.0, 23.2; UPLC-MS analysis $t = 5.20$ min (100% purity, method C), calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_8$ $m/z = 370.0$, found $m/z = 411.3$ $[\text{M} + \text{ACN}]^+$

4.1.13. N^2 -(6-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)hexyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**17**)

White solid (67% yield), mp: 153–156 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.44 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H), 7.37–7.31 (m, 1H), 7.18 (dd, $J = 8.3, 1.1$ Hz, 1H), 7.07 (td, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.81 (bs, $J = 6.3$ Hz, 6H), 3.59 (bs, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.44 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.32–3.26 (m, 2H), 1.93–1.83 (m, 2H), 1.71–1.62 (m, 2H), 1.54–1.45 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 160.3, 160.0, 156.7, 152.2, 133.6, 128.0, 121.1, 120.1, 112.5, 56.6, 55.1, 50.4, 48.6, 47.1, 40.2, 28.4, 25.7, 23.4; UHPLC-MS analysis $t = 6.08$ min (100% purity, method A), calc. $m/z = 400.3$, found $m/z = 401.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.14. N^2 -(6-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)hexyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**18**)

White solid (65% yield), mp: 152–155 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.35–7.29 (m, 2H), 7.20 (dd, $J = 6.4, 3.2$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 3.55 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.36 (bs, $J = 9.8$ Hz, 1H) – superimposed with solvent residual, 3.31–3.18

(m, 5H), 1.91–1.82 (m, 2H), 1.71–1.62 (m, 2H), 1.54–1.43 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 159.7, 149.3, 133.7, 127.9, 127.2, 125.6, 119.1, 56.6, 52.0, 48.1, 47.1, 40.2, 28.5, 25.8, 23.5; UHPLC-MS analysis $t = 7.90$ min (100% purity, method A), calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}$ $m/z = 438.2$, found $m/z = 439.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.15. Synthesis of 2-amino-4,6-dichloro-1,3,5-triazine (**65**)

In a round bottom flask, cyanuric chloride **64** (2.0 g, 10 mmol) was suspended in 10 mL dichloromethane. The mixture was cooled to 0–5 °C and then 0.8 mL of 25% ammonia solution was added dropwise. The resulting mixture was stirred at room temperature for 20 min. Subsequently, the white solid was filtered, rinsed with dichloromethane and dried to yield 0.9 g (mp: 227–229 °C) of the title compound. The crude product was used in the next step without further purification. ESI + MS calc. for $\text{C}_3\text{H}_2\text{Cl}_2\text{N}_4$ $m/z = 164.9$; found $m/z = 187.9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

4.1.16. General procedure for the synthesis of compounds **66–68** (conventional heating)

In a round bottom flask, 2-amino-4,6-dichloro-1,3,5-triazine **65** (0.2 g, 1.2 mmol) was suspended in 5 mL of 1,4-dioxane. To the resulting suspension, a mixture of appropriate amine **54–56** (1.3 mmol) in 3 mL of 1,4-dioxane was added. Subsequently, *N,N*-diisopropylethylamine (0.52 mL, 3 mmol) was added and the mixture was stirred at 100 °C for 20 min. When TLC (chloroform: MeOH 90:10 v/v) indicated full conversion of starting material **65**, the reaction was cooled to room temperature. pH-dependent extraction was performed: reaction mixture was diluted with 10 mL of water then acidified to reach pH 4–5 with 0.1 M HCl followed by extracted with EtOAc (3 × 20 mL). Water layer was alkalinized to reach pH 10 with 1 M NaOH then extracted with EtOAc (3 × 20 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO_4 and concentrated to yield creamy solid **66–68**.

4.1.17. General procedure for the synthesis of final compounds **20–22** (microwave-assisted)

Tryptamine **69** (0.1 g, 0.6 mmol), intermediate **66–68** (1.5 mmol), potassium carbonate (0.25 g, 1.8 mmol) and TBAB (0.02 g, 0.06 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube. Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 90:10 v/v). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 15 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO_4 and concentrated. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform: MeOH 95:5 v/v, then chloroform: MeOH 90:10 v/v. The pure beige solid was then dissolved in acetone and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. The resulting mixture was evaporated and the product was collected as a hygroscopic, sticky dark semi-solid.

4.1.18. N^2 -(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)- N^4 -(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**20**)

Beige, hygroscopic semi-solid (41% yield), mp: 149–152 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.60 (dd, $J = 18.7, 7.7$ Hz, 1H), 7.40–7.30 (m, 3H), 7.17–6.98 (m, 6H), 3.85 (bd, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.81–3.66 (m, 4H), 3.54–3.39 (m, 3H), 3.33–3.21 (m, 4H), 3.16–3.00 (m, 4H), 1.94–1.65 (m, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 159.3, 156.1, 148.9, 136.7, 129.0, 127.3, 122.3, 121.9, 121.1, 117.8, 117.0, 111.4, 111.1, 110.9, 56.1, 51.4, 51.2, 41.4, 39.7, 25.8, 24.9, 20.9; UHPLC-MS analysis $t = 6.80$ min (100% purity, method A), calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_9$ $m/z = 485.3$, found $m/z = 486.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.19. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (21)

Beige, hygroscopic semi-solid (38% yield), mp: 148–150 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.59 (dd, *J* = 19.2, 7.8 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.19–7.07 (m, 4H), 7.04 (dd, *J* = 8.0, 0.9 Hz, 2H), 6.97 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.81–3.40 (m, 9H), 3.31–3.20 (m, 3H), 3.13–3.06 (m, 4H), 1.93–1.64 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 160.7, 155.1, 152.5, 137.9, 136.8, 127.3, 124.9, 122.3, 121.1, 120.8, 118.8, 118.3, 117.8, 111.7, 111.1, 56.2, 54.7, 51.8, 51.6, 41.4, 39.7, 25.8, 24.9, 21.0; UPLC-MS analysis *t* = 3.78 min (99.2% purity, method C), calc. for C₂₈H₃₇N₉O *m/z* = 515.7, found *m/z* = 516.5 [M+H]⁺

4.1.20. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (22)

Brown, hygroscopic semi-solid (64% yield), mp: 122–123 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.59 (dd, *J* = 19.1, 7.9 Hz, 1H), 7.39–7.27 (m, 3H), 7.21–6.98 (m, 4H), 3.81–3.66 (m, 4H), 3.63–3.38 (m, 6H), 3.31–3.17 (m, 2H), 3.14–3.05 (m, 4H), 1.93–1.66 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 159.1, 156.0, 149.3, 136.7, 133.7, 127.9, 127.2, 125.6, 122.3, 121.1, 119.1, 118.3, 117.8, 111.1, 110.9, 66.7, 63.0, 56.2, 52.0, 41.4, 39.7, 25.9, 24.9; UHPLC-MS analysis *t* = 6.99 min (100% purity, method A), calc. for C₂₇H₃₃Cl₂N₉ *m/z* = 553.2, found *m/z* = 554.3 [M+H]⁺

4.1.21. General procedure for the synthesis of final compounds 19, 23–25, 26–34 (microwave-assisted)

Intermediate **70** [**23**] (0.25 g, 0.8 mmol), appropriate amine **42–44**, **71–77**, **78** (2 mmol), potassium carbonate (0.34 g, 2.4 mmol) and TBAB (0.03 g, 0.08 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube. Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 90:10 v/v). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 20 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform: MeOH 95 : 5 v/v, then chloroform: MeOH 90 : 10 v/v. The pure solid was then dissolved in acetone and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. The resulting mixture was evaporated and the product was collected as a white or dark solid.

4.1.22. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-(4-phenylpiperazin-1-yl)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (19)

White solid (79% yield), mp: 166–170 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.60 (dd, *J* = 17.6, 7.8 Hz, 1H), 7.32 (dt, *J* = 16.8, 8.2 Hz, 3H), 7.17–7.01 (m, 4H), 6.94 (dd, *J* = 13.5, 7.4 Hz, 2H), 3.92–3.44 (m, 10H), 3.24–3.05 (m, 5H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 149.4, 136.8, 128.9, 127.2, 122.3, 121.2, 118.4, 118.3, 117.7, 116.7, 111.1, 110.9, 52.1, 51.8, 46.5, 46.3, 41.3, 34.8; UHPLC-MS analysis *t* = 6.46 min (96.5% purity, method A), calc. for C₂₅H₃₁N₉ *m/z* = 457.3, found *m/z* = 458.3 [M+H]⁺

4.1.23. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-6-(4-phenylpiperazin-1-yl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine hydrochloride (23)

Brown solid (43% yield), mp: 161–164 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.65–7.53 (m, 4H), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.04 (dt, *J* = 14.8, 7.0 Hz, 2H), 4.25 (d, *J* = 56.8 Hz, 4H), 3.81 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.64 (d, *J* = 48.7 Hz, 4H), 3.09 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 162.3, 156.7, 155.2, 142.0, 136.8, 130.2, 129.6, 127.3, 120.6, 118.3, 117.7, 111.2, 111.0, 54.1, 41.2, 40.8, 24.7; UHPLC-MS analysis *t* = 3.63 min (99.6% purity, method B), calc. for C₂₃H₂₆N₈ *m/z* = 414.2, found *m/z* = 415.2 [M+H]⁺

4.1.24. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-6-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine hydrochloride (24)

Brown solid (64% yield), melting point: 153–158 °C ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.65 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 14.2, 7.4 Hz, 2H), 7.34 (dd, *J* = 7.7, 5.8 Hz, 2H), 7.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.11–6.99 (m, 2H), 4.22 (d, *J* = 62.0 Hz, 4H), 4.07 (s, 3H), 3.82 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.65 (d, *J* = 54.7 Hz, 4H), 3.09 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 162.2, 156.8, 155.2, 136.8, 131.0, 127.3, 122.6, 121.4, 121.0, 120.9, 118.2, 117.7, 113.0, 111.2, 111.0, 55.7, 52.8, 41.1, 40.8, 24.7; UHPLC-MS analysis *t* = 7.17 min (88.6% purity, method A), calc. for C₂₄H₂₈N₈O *m/z* = 444.2, found *m/z* = 445.3 [M+H]⁺

4.1.25. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-6-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine hydrochloride (25)

Beige solid (55% yield), mp: 153–158 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.12–7.06 (m, 3H), 7.01 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.93 (d, *J* = 38.7 Hz, 4H), 3.77 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.07 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.98 (d, *J* = 22.2 Hz, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 161.9, 156.4, 150.7, 136.8, 133.5, 127.7, 127.1, 124.8, 122.4, 121.0, 119.1, 118.2, 117.6, 111.2, 111.0, 50.7, 43.8, 41.1, 24.8; UHPLC-MS analysis *t* = 1.97 min (92.6% purity, method A), calc. for C₂₃H₂₄Cl₂N₈ *m/z* = 482.2, found *m/z* = 483.1 [M+H]⁺

4.1.26. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-(phenylamino)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (26)

Beige solid (59% yield), mp: 147–152 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.62–7.44 (m, 6H), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.16–6.97 (m, 3H), 3.84–3.66 (m, 5H), 3.59 (s, 1H), 3.06 (dt, *J* = 20.0, 6.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 161.3, 158.1, 156.2, 136.8, 135.0, 134.6, 130.1, 130.0, 129.7, 127.3, 122.5, 121.0, 118.3, 117.7, 110.9, 49.7, 41.3, 36.3, 24.7; UHPLC-MS analysis *t* = 7.66 min (96.6% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₄N₈ *m/z* = 388.2, found *m/z* = 389.1 [M+H]⁺

4.1.27. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((2-methoxyphenyl)amino)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (27)

Beige solid (42% yield), mp: 133–137 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.58 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.35 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.31–7.22 (m, 2H), 7.14–7.06 (m, 2H), 7.03 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.48 (s, 3H), 4.16–4.07 (m, 2H), 3.79 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.76–3.67 (m, 3H), 3.06 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 161.6, 158.6, 156.3, 136.8, 129.2, 129.1, 127.3, 122.3, 121.3, 120.9, 120.6, 118.2, 117.7, 114.2, 114.1, 111.4, 110.9, 65.6, 54.9, 41.3, 40.0, 24.9; UHPLC-MS analysis *t* = 1.45 min (93.4% purity, method B), calc. for C₂₂H₂₆N₈O *m/z* = 418.2, found *m/z* = 419.2 [M+H]⁺

4.1.28. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((2,3-dichlorophenyl)amino)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (28)

Beige solid (63% yield), mp: 141–144 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.14–6.85 (m, 4H), 6.75 (dd, *J* = 19.2, 7.9 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 3.72 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.67 (s, 1H), 3.60 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.51 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.44 (s, 1H), 3.38 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.06 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.01 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 160.6, 158.7, 156.0, 145.6, 145.4, 136.8, 132.4, 127.7, 127.3, 122.3, 121.0, 118.2, 117.7, 117.2, 111.3, 110.9, 108.8, 42.5, 41.3, 39.0, 24.8; UHPLC-MS analysis *t* = 5.08 min (100% purity, method B), calc. for C₂₁H₂₂Cl₂N₈ *m/z* = 456.1, found *m/z* = 457.2 [M+H]⁺

4.1.29. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (30)

White solid (52% yield), mp: 87–92 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.12–7.07 (m, 2H), 7.04–6.87 (m, 5H), 4.12 (dt, *J* = 18.1, 4.9 Hz, 2H), 3.82 (s,

3H), 3.79–3.65 (m, 4H), 3.05 (dd, $J = 14.1, 6.9$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 156.0, 149.5, 147.8, 136.8, 127.9, 127.3, 122.7, 122.3, 121.6, 120.9, 120.8, 118.2, 117.7, 115.1, 114.2, 112.0, 110.9, 67.3, 65.8, 55.0, 40.0, 24.9; UHPLC-MS analysis $t = 1.50$ min (95.2% purity, method B), calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_2$ $m/z = 419.2$, found $m/z = 420.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.30. N^2 -(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)- N^4 -(2-(2,3-dichlorophenoxy)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**31**)

Beige solid (40% yield), mp: 139–146 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.30 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.21 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, 1H), 7.14–7.00 (m, 5H), 4.21 (dt, $J = 20.2, 5.2$ Hz, 2H), 3.75–3.68 (m, 2H), 3.45 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.09–2.98 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 160.1, 155.4, 154.9, 136.7, 133.4, 133.2, 127.7, 127.3, 123.1, 122.1, 121.6, 120.9, 118.2, 117.7, 112.2, 111.5, 110.9, 67.3, 66.7, 65.8, 38.7; UHPLC-MS analysis $t = 4.60$ min (97.8% purity, method B), calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}$ $m/z = 457.1$, found $m/z = 458.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.31. N^2 -(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)- N^4 -(2-methoxyphenethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**33**)

Beige solid (59% yield), mp: 236–239 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.56 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.13–6.93 (m, 4H), 6.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.79–3.69 (m, 5H), 3.57 (dt, $J = 16.5, 7.3$ Hz, 2H), 3.08 (bs, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.87–2.77 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 158.4, 158.3, 155.8, 136.8, 130.5, 129.4, 127.3, 124.5, 123.8, 122.1, 120.9, 118.3, 117.7, 113.5, 111.4, 110.9, 54.2, 42.2, 30.4, 29.3, 22.3; UHPLC-MS analysis $t = 1.78$ min (100% purity, method B), calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}$ $m/z = 403.2$, found $m/z = 404.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.32. N^2 -(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)- N^4 -(2,3-dichlorophenethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (**34**)

Brown solid (44% yield), mp: 98–102 °C; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.41 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.32–7.16 (m, 6H), 7.14–7.00 (m, 2H), 3.77–3.68 (m, 2H), 3.62 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.55 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.07 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.93–2.82 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 160.0, 158.6, 155.9, 138.9, 136.7, 132.6, 131.8, 129.4, 129.3, 128.5, 127.3, 127.2, 122.2, 120.9, 118.2, 117.7, 110.9, 41.3, 39.7, 33.9, 24.8; UHPLC-MS analysis $t = 5.84$ min (96.7% purity, method B), calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_7$ $m/z = 441.1$, found $m/z = 442.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

4.1.33. General procedure for the synthesis of compounds **71–73**

In a round bottom flask 2-chloroethanamine hydrochloride **82** (2.0 g, 17.2 mmol) was suspended in 16 mL of toluene. To the resulting mixture, appropriate aniline **79–81** (103.4 mmol) was added, and the mixture was refluxed for 20 h. Subsequently, pH-dependent extraction was performed: reaction mixture was diluted with 20 mL of water then acidified to reach pH 4–5 with 0.1 M HCl followed by extracted with EtOAc (3 × 30 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO_4 and concentrated. The crude product was purified via flash column chromatography with elution using chloroform: MeOH 90 : 10 v/v and then 100% MeOH. The organic fractions were concentrated to yield the title compound.

4.2. Radioligand binding

The cell culture, cell membranes, and radioligand binding assays were performed in accordance with standard protocols [29].

4.3. Atlas Activity analysis: 3D-SAR

Activity maps were prepared using the Atlas Activity tool available in Forge [37]. The type 2, 3 and 4 compounds were

uploaded to the program and marked as the 'test set'. Compound **32** previously docked to a homologous 5-HT₇R model was marked as 'reference'. Conformations of all test compounds were first determined (conformation hunt calculation method: very accurate and slow) based on the conformation of the reference compound. Subsequently, the compounds were superimposed (alignment calculation method: substructure) and activity maps were determined automatically. The other program operating parameters were default.

4.4. Molecular modeling

Docking was performed according to our previous publication [23]. The homologous 5-HT₇ receptors model was built on the 5-HT_{1B} receptor template (PDB: 5v54). The resulting model had sequence identity of 37.89% and coverage of 0.67. In addition, it was validated by docking (Induced Fit Docking (IFD), Schrodinger) known aminotriazine [38] and indoleaminotriazine 5-HT₇ receptor ligands [23]. The optimized three-dimensional structures for the ligands were determined by LigPrep (OPLS3) and the protonation state at pH 7.4 ± 2.0 using Epik. Protein Preparation Wizard was used to evaluate appropriate amino acid ionization states, to check the steric clashes and to assign bond ordering. The ligands were docked by Induced Fit Docking (IFD) with XP (extra precision) with the OPLS3 force field. A grid box size of 15 Å was centered on the rest of D3.32. The resulting poses had binding modes comparable to the literature data. Docking: The validated model was used for docking appropriate ligands according to the procedure as before. The selected ligand poses were additionally optimized through a QM/MM approach using functional DFT-B3LYP and LACVP as the basis set.

4.5. Functional assays

The functional properties of compounds were evaluated using their ability to inhibit cAMP production induced by 5-CT (10 nM) - a 5-HT_{7b}R agonist, in HEK-293 cells overexpressing 5-HT_{7b}R. Each compound was tested in triplicate at 8 concentrations (10^{-11} – 10^{-4} M). Cells (prepared with the use of Lipofectamine 2000) were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% dialysed foetal bovine serum and 500 µg/ml G418 sulphate. For functional experiments, cells were subcultured in 25 cm flasks, grown to 90% confluence, washed twice with prewarmed to 37 °C phosphate buffered saline (PBS) and were centrifuged for 5 min (160×g). The supernatant was aspirated, the cell pellet was resuspended in stimulation buffer (1 × HBSS, 5 mM HEPES, 0.5 mM IBMX, 0.1% BSA). Total cAMP was measured using the LANCE cAMP detection kit (PerkinElmer), according to the producer's directions. For cAMP levels quantification, cells (5 µl) were incubated with compounds (5 µl) for 30 min at room temperature in 384-well white opaque microtiter plate. After incubation, the reaction was stopped and cells were lysed by the addition of 10 µl working solution (5 µl Eu-cAMP and 5 µl ULIGHT-anti-cAMP). The assay plate was incubated for 1 h at room temperature. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) was detected by an Infinite M1000 Pro (Tecan) using instrument settings from LANCE cAMP detection kit manual.

4.6. 4.6–4.8 ADMET in vitro (metabolic stability; CYP3A4 activity, hepatotoxicity)

All assays were performed according to the protocols described previously [23,39–41]. References used during this study: doxorubicin, ketoconazole and verapamil were obtained from Sigma-

Aldrich (St. Louis, MO, USA). Luminescence and absorbance were measured using an EnSpire microplate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). UPLC-MS spectra were obtained using a Waters ACQUITY TQD system with a TQ Detector (Waters, Milford, USA). *In silico* prediction of the most probable sites of metabolism was done by MetaSite 6.0.1 software (Molecular Discovery Ltd, Hertfordshire, UK). Determination of metabolic pathways was performed using mouse liver microsomes (MLMs) purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Potential drug-drug interactions were predicted using CYP3A4 and an assay purchased from Promega (Madison, WI, USA). Hepatotoxicity was estimated using a hepatoma HepG2 (ATCC[®] HB-8065[™]) cell line. The CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) used for estimation of cell viability was purchased from Promega (Madison, WI, USA).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank PLG infrastructure (Prometheus, ACC-CYFRONET, AGH, project ID: drugdesign4) for performing molecular modeling (docking and QM/MM). We would also like to thank Prof. Andrzej Bojarski (Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences) for valuable comments and advice.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113931>.

References

- [1] Z. Fišar, J. Hroudová, J. Raboch, Clinical, Research and Treatment Approaches to Affective Disorders: Neurotransmission in Mood Disorders. Croatia, 2012. InTech. Retrieved from, https://psychiatrie.lf1.cuni.cz/file/5882/Neurotransmission_in_mood_disorders.pdf.
- [2] Y. Liu, J. Zhao, W. Guo, *Front. Psychol.* 9 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02201>, 2201.
- [3] R. Okubo, T. Hasegawa, K. Fukuyama, T. Shiroyama, M. Okada, *Front. Psychiatr.* 12 (2021) 623684, <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.623684>.
- [4] A. Jankowska, G. Satała, M. Kołaczowski, A. Bucki, M. Giuch-Lutwin, A. Świerczek, K. Pocięcha, A. Partyka, M. Jastrzębska-Więsek, A. Lubelska, G. Latacz, A. Gawalska, A.J. Bojarski, E. Wyska, G. Chłoń-Rzepa, *Eur. J. Med. Chem.* 201 (2020) 112437, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112437>.
- [5] H.Y. Meltzer, Z. Li, M. Huang, A. Prus, *Curr. Psychos. Ther. Rep.* 4 (2006) 12–19, <https://doi.org/10.1007/BF02629409>.
- [6] A.S. Hogendorf, A. Hogendorf, K. Popiotek-Barczyk, A. Ciechanowska, J. Mika, G. Satała, M. Walczak, G. Latacz, J. Handzlik, K. Kieć-Kononowicz, E. Pomimaskin, S. Schade, A. Zeug, M. Bijata, M. Kubicki, R. Kurczab, T. Lenda, J. Staroń, R. Bugno, B. Duszyńska, B. Piłarski, A.J. Bojarski, *Eur. J. Med. Chem.* 170 (2019) 261–275, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.017>.
- [7] M.N. Modica, E. Lacivita, S. Intagliata, L. Salerno, G. Romeo, V. Pittalà, M. Leopoldo, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 8475–8503, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01898>.
- [8] A. Nikiforuk, *CNS Drugs* 29 (2015) 265–275, <https://doi.org/10.1007/s40263-015-0236-0>.
- [9] K.M. Blattner, D.J. Canney, D.A. Pippin, B.E. Blass, *ACS Chem. Neurosci.* 10 (2019) 89–119, <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00283>.
- [10] A. Quintero-Villegas, S. Valdés-Ferrer, *Mol. Med.* 26 (2020), <https://doi.org/10.1186/s10020-019-0126-x>.
- [11] Ch Ching-Chia, H. Ling-Wei, S. Ming-Jai, *Eur. J. Pharmacol.* 748 (2015) 68–75, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.027>.
- [12] J. Gautam, S. Banskota, S.C. Regmi, S. Ahn, Y.H. Jeon, H. Jeong, S.J. Kim, T. Nam, B.-S. Jeong, J.-A. Kim, *Mol. Cancer* 15 (2016) 75, <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0559-6>.
- [13] X. Du, T. Wang, Z. Wang, X. Wu, Y. Gu, Q. Huang, J. Wang, J. Xie, *Oncotargets Ther.* 13 (2020) 2139–2151, <https://doi.org/10.2147/OTT.S244339>.
- [14] I. Cinar, B. Sirin, Z. Halici, S.S. Palabiyik-Yucelik, E. Akpinar, E. Cadirci, Naunyn-Schmiedeberg's *Arch. Pharmacol.* 394 (2021) 1205–1213, <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02051-z>.
- [15] M. Leopoldo, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 5, <https://doi.org/10.2174/0929867043455828>.
- [16] S. Thirumaran, A. Lepailleur, Ch Rochais, *Eur. J. Med. Chem.* 183 (2019) 111705, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111705>.
- [17] A. Rague, K. Tidgewell, *Mini Rev. Med. Chem.* 18 (9) (2018) 552–560, <https://doi.org/10.2174/1389557517666170913111533>.
- [18] V. Canale, P. Guzik, R. Kurczab, P. Verdier, G. Satała, B. Kubica, M. Pawłowski, J. Martínez, G. Subra, A.J. Bojarski, P. Zajdel, *Eur. J. Med. Chem.* 78 (2014) 10–22, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.03.005>.
- [19] A.J. Bojarski, B. Duszyńska, M. Kołaczowski, P. Kowalski, T. Kowalska, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 14 (23) (2004) 5863–5866, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.09.029>.
- [20] D.A. Shapiro, S. Renock, E. Arrington, L.A. Chiodo, L.-X. Liu, D.R. Sibley, B.L. Roth, R. Mailman, *Neuropsychopharmacology* 28 (2003) 1400–1411, <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300203>.
- [21] D. Hoyer, J.P. Hannon, G.R. Martin, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71 (4) (2002) 533–554, [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00746-8).
- [22] P. Kowalski, K. Mitka, J. Jaśkowska, B. Duszyńska, A.J. Bojarski, *Arch. Pharmazie* 346 (5) (2013) 339–348, <https://doi.org/10.1002/ardp.201300011>.
- [23] D. Kulaga, J. Jaśkowska, G. Satała, G. Latacz, P. Śliwa, *Bioorg. Chem.* 104 (2020) 104254–104266, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104254>.
- [24] D. Kulaga, J. Jaśkowska, G. Satała, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 42 (2021) 128028, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128028>.
- [25] D. Kulaga, J. Jaśkowska, G. Satała, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 29 (21) (2019) 126667, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126667>.
- [26] A. Hackling, R. Ghosh, S. Perachon, A. Mann, H.-D. Hörtje, C.G. Wermuth, J.-Ch Schwartz, W. Sippl, P. Sokoloff, H. Stark, *J. Med. Chem.* 46 (18) (2003) 3883–3899, <https://doi.org/10.1021/jm030836n>.
- [27] B. Viira, A. Selyutina, A.T. García-Sosa, M. Karonen, J. Sinkkonen, A. Merits, U. Maran, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (11) (2016) 2519–2529, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.018>.
- [28] G. Groszek, M. Bednarski, M. Dybała, B. Filipek, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2) (2009) 809–817, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.05.019>.
- [29] A.S. Hogendorf, A. Hogendorf, R. Kurczab, G. Satała, T. Lenda, M. Walczak, G. Latacz, J. Handzlik, K. Kieć-Kononowicz, J.M. Wierońska, M. Woźniak, P. Cieślik, R. Bugno, J. Staroń, A.J. Bojarski, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1444, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00822-4>.
- [30] Y. Cheng, W. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3099–3108, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2).
- [31] M. Kołaczowski, M. Nowak, M. Pawłowski, A.J. Bojarski, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6732–6741, <https://doi.org/10.1021/jm060300c>.
- [32] M. Nowak, M. Kołaczowski, M. Pawłowski, A.J. Bojarski, *J. Med. Chem.* 49 (1) (2006) 205–214, <https://doi.org/10.1021/jm050826h>.
- [33] D. Wacker, S. Wang, J.D. McCorvy, R.M. Betz, A.J. Venkatakrishnan, A. Levit, K. Lansu, Z.L. Schools, T. Che, D.E. Nichols, B.K. Shoichet, R.O. Dror, B.L. Roth, *Cell* 168 (3) (2017) 377–389, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.033>, e12.
- [34] M. Kołaczowski, M. Marcinkowska, A. Bucki, M. Pawłowski, K. Mitka, J. Jaśkowska, P. Kowalski, G. Kazek, A. Siwek, A. Wasik, A. Wesołowska, P. Mierzejewski, P. Bienkowski, *J. Med. Chem.* 57 (11) (2013) 4543–4557, <https://doi.org/10.1021/jm401895u>.
- [35] A.A.R. Impellizzeri, M. Pappalardo, L. Basile, O. Manfra, K.W. Andressen, K.A. Krobot, A. Messina, F.O. Levy, S. Guccione, *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) 92, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00092>.
- [36] U.M. Zanger, M. Schwab, *Pharmacol. Ther.* 138 (1) (2013) 103–141, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.
- [37] Forge, version, Cresset[®], Litlington, Cambridgeshire, UK, Cheeseright T., Mackey M., Rose S., Vinter, A.; Molecular Field Extrema as Descriptors of Biological Activity: Definition and Validation. *J. Chem. Inf. Model.* 2006, 46 (2), 665–676, <http://www.cresset-group.com/forge/>.
- [38] R.J. Mattson, D.J. Denhart, J.D. Catt, M.F. Dee, J.A. Deskus, J.L. Ditta, J. Epperson, H. King, A. Gao, M.A. Poss, A. Purandare, D. Tortolani, Y. Zhao, H. Yang, S. Yeola, J. Palmer, J. Torrente, A. Stark, G. Johnson, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 14 (2004) 4245–4248, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.06.008>.
- [39] G. Latacz, G.A.S. Hogendorf, A. Hogendorf, A. Lubelska, J.M. Wierońska, M. Woźniak, P. Cieślik, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, A.J. Bojarski, *Med. Chem. Comm.* 9 (2018) 1882–1890, <https://doi.org/10.1039/c8md00313k>.
- [40] G. Latacz, A. Lubelska, M. Jastrzębska-Więsek, A. Partyka, K. Kucwaj-Brysz, A. Wesołowska, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 28 (2018) 878–883, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.02.003>.
- [41] G. Latacz, A. Lubelska, M. Jastrzębska-Więsek, A. Partyka, A. Sobito, A. Olejarz, K. Kucwaj-Brysz, G. Satała, A.J. Bojarski, A. Wesołowska, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, *Chem. Biol. Drug Des.* 90 (2017) 1295–1306, <https://doi.org/10.1111/cbdd.13106>.

D05. **Damian Kulaga**, Anna K. Drabczyk, Grzegorz Satała, Gniewomir Latacz, Anna Boguszevska-Czubara, Damian Plażuk, Jolanta Jaśkowska – Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,3,5-triazines: effect of aromatic ring decoration on affinity to 5-HT₇ receptor, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 13308 IF*=6.628



Article

Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1,3,5-Triazines: Effect of Aromatic Ring Decoration on Affinity to 5-HT₇ Receptor

Damian Kułaga ^{1,*}, Anna Karolina Drabczyk ¹, Grzegorz Satała ², Gniewomir Latacz ³, Anna Boguszewska-Czubarą ⁴, Damian Płażuk ⁵ and Jolanta Jaśkowska ¹

¹ Department of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Cracow University of Technology, ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków, Poland

² Department of Medicinal Chemistry, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, ul. Smętna 12, 31-343 Kraków, Poland

³ Department of Technology and Biotechnology of Drugs, Jagiellonian University Medical College, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, Poland

⁴ Department of Medical Chemistry, Medical University of Lublin, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Poland

⁵ Laboratory of Molecular Spectroscopy, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, ul. Tamka 12, 91-403 Łódź, Poland

* Correspondence: damian.kulaga@pk.edu.pl

Abstract: Considering the key functions of the 5-HT₇ receptor, especially in psychiatry, and the fact that effective and selective 5-HT₇ receptor ligands are yet to be available, in this work, we designed and synthesized novel 1,3,5-triazine derivatives particularly based on the evaluation of the effect of substituents at aromatic rings on biological activity. The tested compounds showed high affinity to the 5-HT₇ receptor, particularly ligands N²-(2-(5-fluoro-1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-phenethyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine **2** (K_i = 8 nM) and N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((4-fluorophenyl)amino)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine **12** (K_i = 18 nM) which showed moderate metabolic stability, and affinity to the CYP3A4 isoenzyme. As for the hepatotoxicity evaluation, the tested compounds showed moderate cytotoxicity only at concentrations above 50 μM. Compound **12** exhibited less cardiotoxic effect than **2** on Danio rerio in vivo model.

Keywords: serotonin; microwave synthesis; CNS



Citation: Kułaga, D.; Drabczyk, A.K.; Satała, G.; Latacz, G.; Boguszewska-Czubarą, A.; Płażuk, D.; Jaśkowska, J. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1,3,5-Triazines: Effect of Aromatic Ring Decoration on Affinity to 5-HT₇ Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13308. <https://doi.org/10.3390/ijms232113308>

Academic Editor: Alessandro Cannavo

Received: 4 October 2022

Accepted: 26 October 2022

Published: 1 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

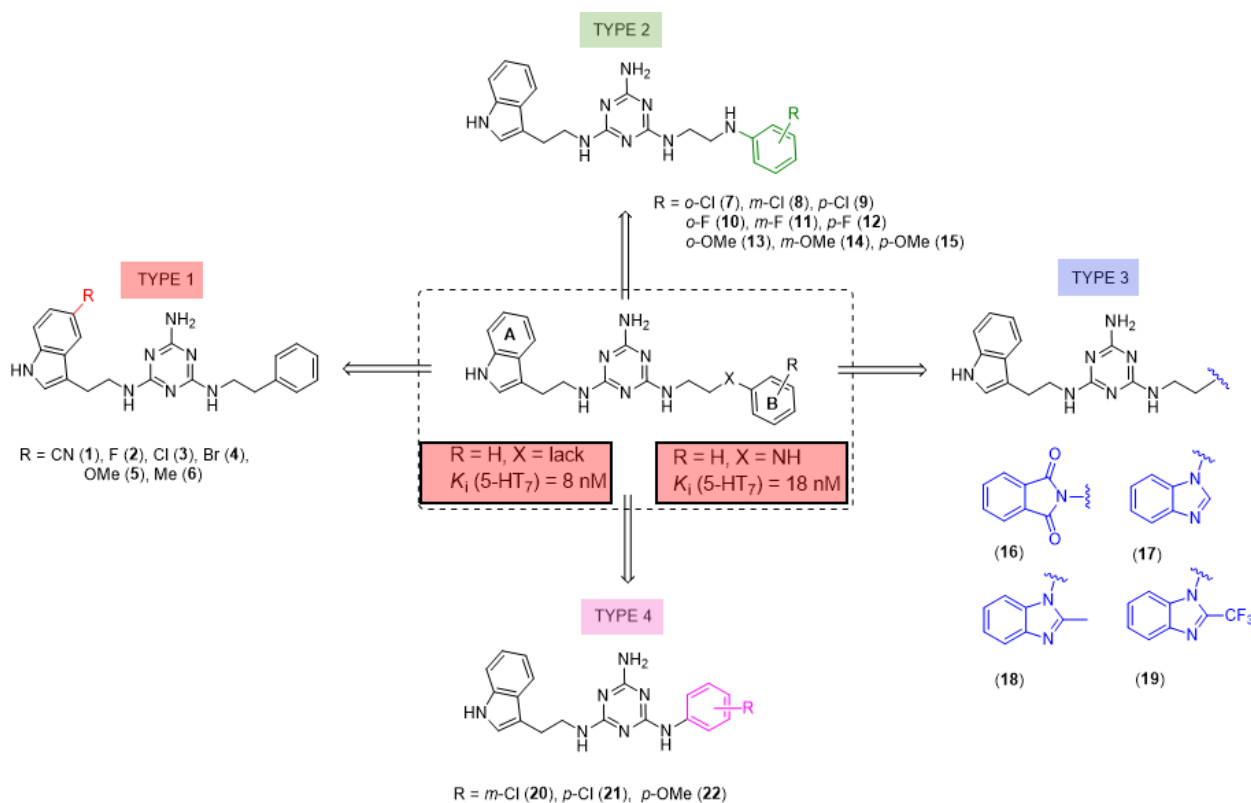
The 5-HT₇ receptor (5-HT₇R) is one of seven types of protein G-coupled aminergic serotonin receptors [1]. It is found in the central nervous system, mainly in the brain, in which it has regulatory functions, for example (the day–night cycle), and may affect behavior, mood, emotions, or memory [2,3]. The receptor is also expressed outside the central nervous system, e.g., in the intestines [4], mammary glands [5], lungs [6], or prostate [7].

Three human splicing variants (h5-HT_{7(a)}, h5HT_{7(b)}, and h5-HT_{7(d)}) have been reported so far. As long as the h5-HT_{7(a)} and h5-HT_{7(b)} variants do not differ significantly in terms of the number of amino acids in the C-terminal tail, for example, and maintain similar pharmacological properties, the h5-HT_{7(d)} variant shows the greatest differences in the C-terminal tail, which may lead to slightly different functionality [1]. The primary signaling pathway for the 5-HT₇ receptor involves the receptor binding the ligand, followed by phosphorylation of subunit G combined with its dissociation into subunit G_S and heterodimer G₁₂. In the subsequent stage, protein G_S (canonical signaling) is activated, which triggers isoform CA (adenyl cyclase) and leads to an intrinsic increase in cAMP (cyclic adenosine monophosphate) levels. cAMP induces PKA (protein kinase A) expression, which in turn induces further phosphorylation of other proteins, for example, on Ras, ERK, and Akt pathways. It has also been shown that protein G_S and protein G₁₂ (non-canonical

signaling) are activated by 5-HT₇R, which leads to further signaling in the cell and results in neurite outgrowth, synaptogenesis, and neuronal excitability [8,9].

It is well-known that 5-HT₇R is a binding site for several bioactive compounds with antidepressive or anxiolytic effects [2,3]. However, as the ligand–receptor complex may indirectly affect downstream signalization, 5-HT₇ receptor ligands may affect the expression of respective kinases or proteins (whose overexpression occurs in tumor cells). It is owing to this property, among other things, that some 5-HT₇ receptor antagonists or agonists have anticancer [10–12] or anti-inflammatory effects [13,14]. Based on the significant functions of 5-HT₇R and also the therapeutic effects that can be achieved owing to this receptor, it is justified to discover novel, selective and safe ligands of the receptor.

We recently proved that it was possible to forgo the well-known arylpiperazine pharmacophore while maintaining activity and selectivity toward 5-HT₇R [15]. The lead motif in the studies so far was an unsubstituted tryptamine core connected to aminotriazine. However, literature reports are available in which the incorporation of substituents at the indole C-5 position resulted in increased affinity toward 5-HT₇R. A particular effect was noted, with substituents being electron withdrawal groups (EWGs) [16,17]. Therefore, we decided in this report to synthesize a group of compounds 1–6 (Scheme 1, type 1) with a substituted indole C-5 position (by EWGs and EDGs (electron donating groups)) and subsequently to evaluate their effect on affinity toward the 5-HT₇ receptor. Another argument for synthesizing indole derivatives is the effect of heteroatoms on ADME-T parameters, particularly the fluorine atom [18,19]. We showed [20] that the compounds tested without any ring substituent (Figure 1A) had low in vitro metabolic stability. By incorporating chlorine in the structure [15] (Figure 1B), metabolic stability increased with a slight decrease in cytotoxicity in the HepG2 cell line. This correlation is also confirmed by the original report by Mattson et al. [21], in which the incorporation of fluorine atoms in the molecule increased stability almost five times compared to the unsubstituted compound (Figure 2).



Scheme 1. Structures of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine derivatives studied herein.

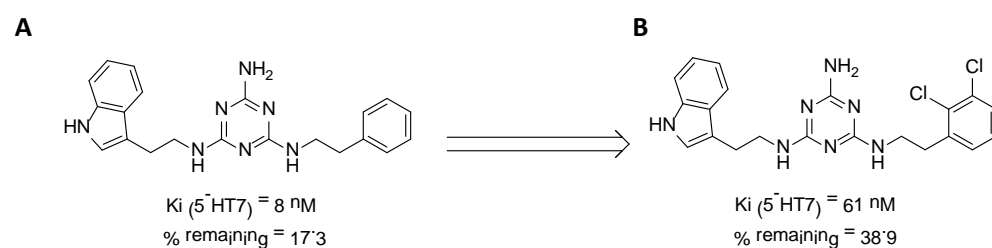


Figure 1. Effect of the chlorine atom on in vitro metabolic stability—two additional chlorine atoms (B) increase metabolic stability versus unsubstituted compound (A). % remaining: quantity of the compound that remained after incubation with mouse liver microsomes (MLMs) [15].

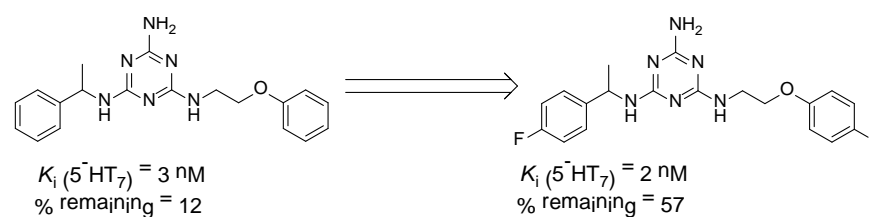


Figure 2. Effect of the fluorine atom on metabolic stability. % remaining: quantity of the compound that remained after incubation with human liver microsomes (HLMs) [21].

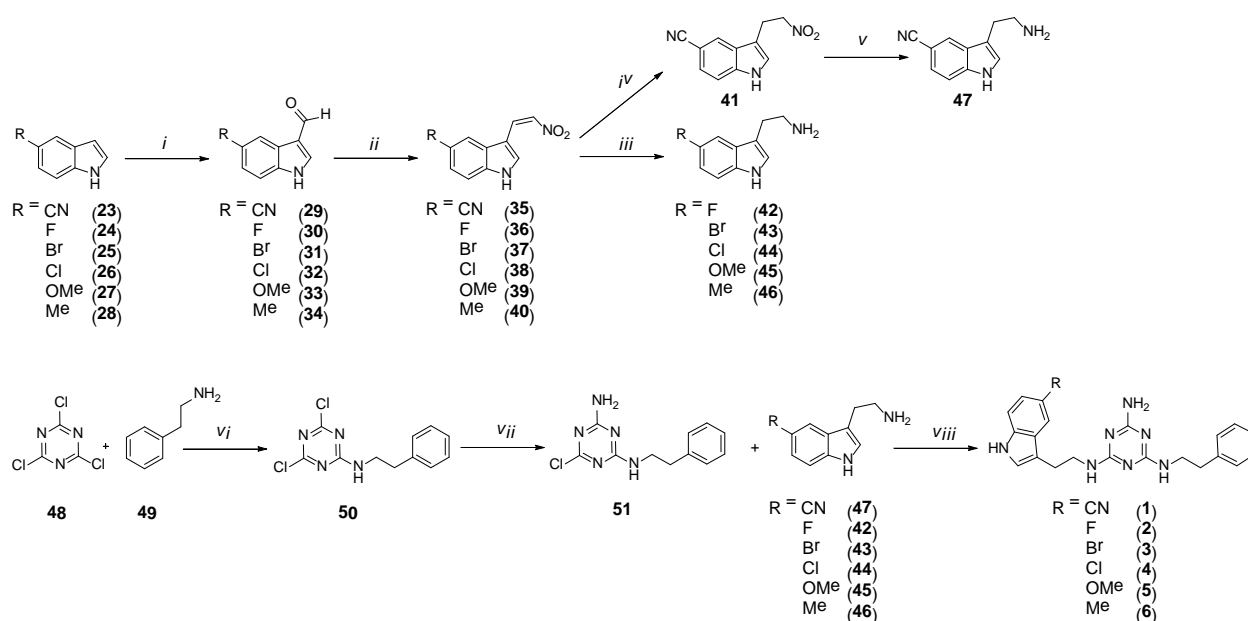
In our previous paper [15], we also investigated the effect of substituents (*ortho*-OMe and 2,3-Cl₂) at the phenyl ring attached to the aminoethyl chain on affinity toward 5-HT₇R. The substituents were found to reduce receptor affinity, but the effect of a specific substituent position on activity was not tested. To investigate this aspect, we decided to synthesize a group of ligands 7–15 (Scheme 1, type 2) containing Cl, F, and OMe at positions *ortho*-, *meta*-, and *para*- and to evaluate their effects on affinity toward 5-HT₇R. We also decided to incorporate more complex substituents into the structures of studied compounds (phthalimide 16 and benzimidazole 17–19 cores, Scheme 1, type 3) due to the potential formation of hydrogen bonds to stabilize the ligand–receptor additionally. Unexpectedly, we prepared compounds 20–22 without the aminoethyl chain in our synthesis experiments (Scheme 1, type 4). To determine the effect of the lack of an alkyl linker between the triazine and the aromatic system on affinity to the receptors in question, we also evaluated these compounds in in vitro tests. All the resulting compounds were tested in an extended receptor panel, including affinity toward 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, and D₂ receptors, to determine the selectivity of the compounds. Bioconformation and key interactions involved in the forming the ligand–receptor complex were proposed for active structures. The two best compounds were evaluated in terms of safety and bioavailability in in vitro ADME-Tox tests.

2. Results

2.1. Chemistry

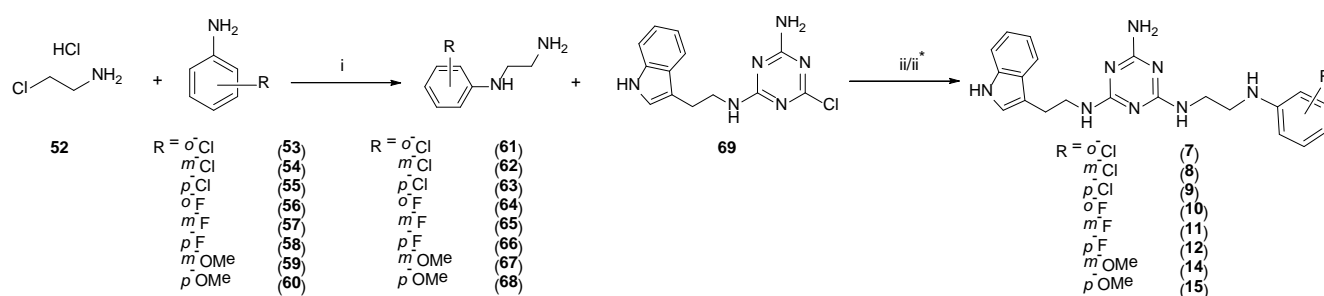
Final type 1 compounds were synthesized according to Scheme 2, starting from commercially available 5-substituted indoles 23–28, converted to 3-substituted aldehydes 29–34 via Vilsmeier-Haack formylation with 90–100% yields. In a subsequent stage, the aldehydes were subjected to the Henry reaction to obtain nitrovinyl derivatives 35–40. The synthesis of the derivatives initially followed patent [22] under conventional reflux of the reaction mixture. As long as yields of more than 90% were obtained in a small scale of 0.5–1 g, side products formed in the reaction mixture (according to TLC) with low yields of 40–56% when the scale was increased to 5 g. However, we found that performing the reactions under microwave irradiation ($P = 85 \text{ W}$) for 20 min allows obtaining desired products in more than 90% yields, irrespective of the scale. Crude 35–40 were used in the next stage without any further purification. As for compound 35, another two stages involved reduction: first of the double bond using a mild reducing agent (NaBH_4) to give 41 and subsequently

reduction of the nitro group with zinc in boiling 36% HCl solution, to finally give compound **47**. As compounds **36–40** lacked the nitrile substituent, which could also be reduced in harsher conditions, simultaneous reduction of the double bond and the nitro group could be performed in the presence of LiAlH_4 to give final 5-substituted tryptamines **42–46**, respectively. The subsequent stage was the synthesis of core compounds **51**. Cyanuric chloride **48** was reacted with phenylethylamine **49** at 0°C , and the resulting product **50** was treated with ammonia water. Synthesis was conducted at room temperature for 5 h, and core compound **51** was obtained in 86% yield, which further reacted with 5-substituted tryptamines **42–47** to give final type 1 products with a yield of more than 50%. The synthesis of compounds **1–6** was conducted under microwave irradiation, similar to our previous reports [15].

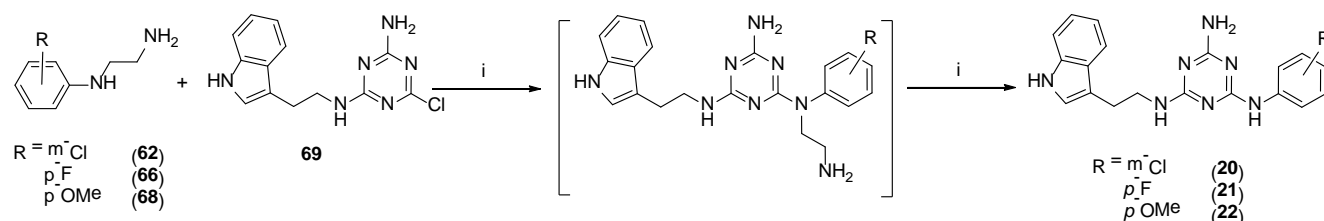


Scheme 2. Synthesis pathway for compounds of type 1 **1–6**. *i*–DMF, POCl_3 , 0°C then rt., 1 h; *ii*–ammonia acetate, nitromethane, MW, 20 min; *iii*– LiAlH_4 , THF, rt, 3 days; *iv*– NaBH_4 , MeOH/DMF, rt, 3 h; *v*–Zn, HCl, reflux, 5 h; *vi*–DIPEA, THF, 0°C , 2 h; *vii*–ammonia solution 20%, rt, 5 h; *viii*– K_2CO_3 , TBAB, DMF, MW, 2.5 min.

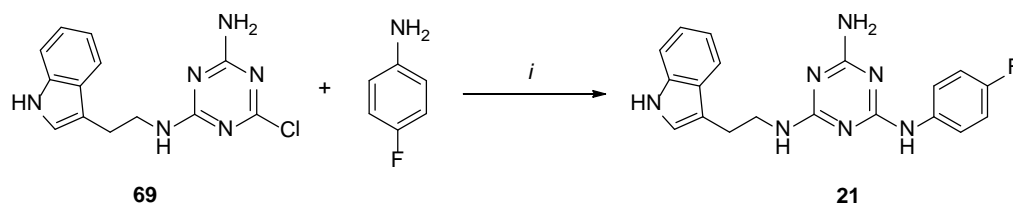
Type 2 compounds were synthesized according to Scheme 3. First, amines **61–68** were obtained in the reaction of 2-chloroethylamine hydrochloride **52** and appropriately substituted aniline **53–60**. Subsequently, the resulting compounds reacted with readily available [20] core compound **69** in the presence of K_2CO_3 and microwave irradiation ($p = 50\text{ W}$) for 2.5 min [15]. Final type 2 compounds were isolated with yields of 43–75%. In spite of the complete conversion of substrate **69** (according to TLC), compounds **8**, **12**, and **15** were not obtained. However, it was found that the ethyl bridge was probably eliminated during the reaction (see the mass spectra, Supplementary Materials) to give compounds **20–22** (Scheme 1, type 4) in which aniline derivatives were attached directly to the triazine system (Scheme 4). The resulting products were easily isolated during work-up as white precipitates, which did not require purification. Their structures were confirmed using spectroscopy: ^1H NMR, ^{13}C NMR, and MS. To confirm our hypothesis, we decided to synthesize the selected compound **21** starting from intermediate **69** and *para*-fluoroaniline (Scheme 5). The reaction was conducted similarly to the previous one in the presence of potassium carbonate (3 eq.) and sodium carbonate (3 eq.) to give title compound **21**. According to HPLC-MS analysis, the content of the desired product in the reaction mixture was 23% for potassium carbonate and 73% for sodium carbonate (see Supplementary Materials). Desired compounds **8**, **12**, and **15** were obtained with a yield of more or equal to 60% using the same synthesis method while only changing the base to sodium carbonate.



Scheme 3. Synthesis pathway for compounds of type 2, 7, 9–11, and 14. *i*–toluene, reflux, 20 h; *ii*– K_2CO_3 , TBAB, DMF, MW, 2.5 min; *ii** (for 8, 12, 15)– Na_2CO_3 , TBAB, DMF, MW, 2.5 min.

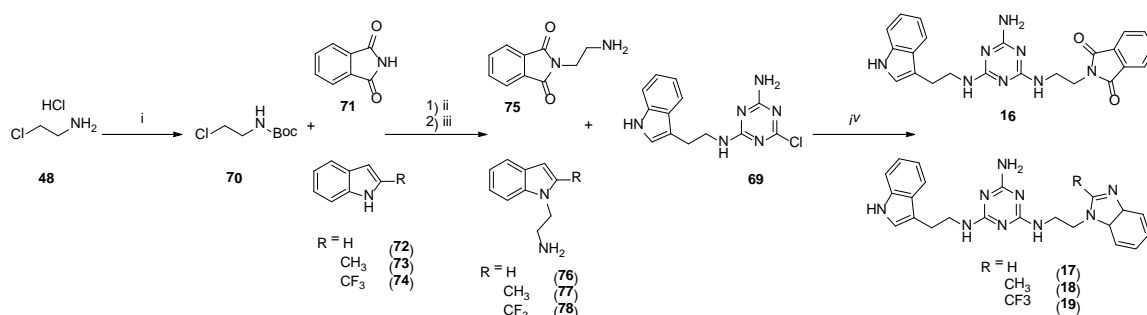


Scheme 4. Proposed synthesis pathway for compounds of type 4, 20–21. *i*– K_2CO_3 , TBAB, DMF, MW, 2.5 min.



Scheme 5. Synthesis of 21 in alternative pathway. *i*–base, TBAB, DMF, MW, 2.5 min.

The synthesis of type 3 compounds (Scheme 6) started with protecting 2-chloroethylamine hydrochloride **52** with a Boc group, followed by coupling of the resulting product **70** with phthalimide **71** or benzimidazole **72** and its derivatives **73** and **74**. The reactions were performed under microwave irradiation ($P = 60$ W) for 60 s in the presence of sodium hydroxide and TBAB (tetrabutylammonium bromide). Isolated products **75**–**78** reacted with **69** under microwave irradiation ($P = 50$ W) in the presence of K_2CO_3 and TBAB to give final compounds **15**–**18** with yields of 25–56%.



Scheme 6. Synthesis pathway for compounds of type 3, 16–19. *i*– Boc_2O , Et_2N , DCM, 0°C then rt, 12 h; *ii*– NaOH , TBAB, DMF, MW, 60 s; *iii*– 3N HCl in dioxane, DCM, rt, 12 h; *iv*– K_2CO_3 , TBAB, DMF, MW, 2.5 min.

2.2. Radioligand Binding and SAR

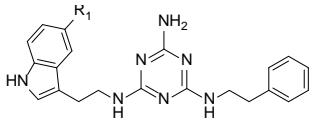
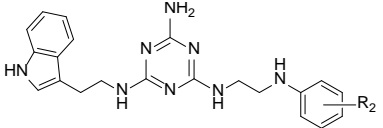
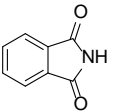
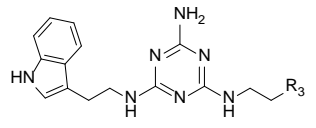
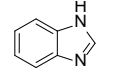
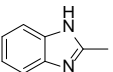
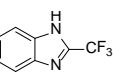
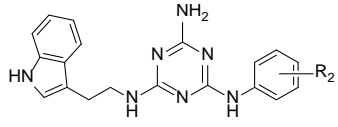
The affinity of the studied compounds to 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, 5-HT₇, and D₂ receptors was evaluated by a radioligand assay, as reported previously (Table 1) [17]. Each compound was tested in triplicate at seven concentrations (from 0.1 nM to 100 μ M). Inhibition constants (K_i) were calculated from the Cheng–Prusoff equation [23].

The substituent at indole position 5 in the A ring (type 1 compound) had no significant effect on increased binding to the 5-HT₇ receptor. The ligand with a weakly deactivating fluorine substituent **2** was found to be the most active among the tested type 1 compounds and showed an affinity of $K_i = 8$ nM toward 5-HT₇R. In addition, in terms of the effect of the halogen atom, ligand **3** with bromine (5-HT₇R $K_i = 126$ nM) had moderate activity, followed by ligand **4** with chlorine (5-HT₇R, $K_i = 481$ nM). Indole substitution at position 5 with CN, a strongly deactivating substituent (compound **1**), resulted in activity toward the 5-HT₇ receptor being lost. As for two activating substituents: Me (weakly activating) and OMe (strongly activating), moderate activity toward the 5-HT₇ receptor was shown for ligand **6** ($K_i = 100$ nM), while ligand **5** had a low activity with $K_i = 629$ nM. As for type 1 compounds, a halogen substituent at the B ring resulted in active (**9**, **11**, **12**) or moderately active ligands (**7**, **8**, **10**) with respect to 5-HT₇R, while a slightly larger substituent (OMe) resulted in the loss of activity. When analyzing the effect of the substituted position, ligands in the *para* position had the highest activity, and the *ortho* position was the least active. It is concluded based on analysis of the data that the fluorine substituent (*para* > *meta* > *ortho*) is the strongest, followed by chlorine (*para* > *meta* > *ortho*) and finally methoxy (*para* > *meta* > *ortho*). For example, *para*-F (**18**) and *para*-Cl (**9**), with K_i values of 18 nM and 19 nM, respectively, were found to be the most active ligands. Isomeric *meta*-F (**11**) and *meta*-Cl (**8**) compounds had slightly lower activity compared to the previous ones, with K_i values of 24 nM and 131 nM, respectively. Even though the compounds with the OMe substituent were inactive, a tendency for a relatively stronger *para* position compared to the weaker *meta* and, finally, the weakest *ortho* position was also seen in this group. As for type 3 ligands, incorporation of larger substituents R₃ resulted in most cases in the loss of activity ($K_i > 1000$ nM) toward 5-HT₇R (ligands **16**, **18**, and **19**). Only the ligand with an unsubstituted benzimidazole ring (**17**) had a moderate activity with $K_i = 227$ nM. The type 4 compounds are also found to be inactive (**20**, **21**) or weakly active (**22**), but they provide further evidence of the significant effect of the linker between the triazine core and the aromatic system [20]. When analyzing affinity to the other receptors tested (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₆, and D₂), most of the designed compounds have no activity ($K_i > 1000$ nM) or low activity (500 nM < K_i < 1000 nM).

2.3. Atlas Activity Analysis: 3D-SAR

To better understand SAR, we determined specific activity maps as a function of shape, hydrophobicity, and electrostatics using Activity Atlas (Flare, Cresset) [24]. According to the ligand shape, the incorporation of large substituents at indole position 5 (A ring) results in reduced activity toward 5-HT₇R. A similar effect is found for substituents at the alkyaromatic ring (B ring). It can be concluded based on Figure 3B,D that large substituents (ligands **13–19**, $K_i > 226$ nM) cannot be accommodated in the receptor binding pocket, resulting in the loss of activity as shown by an increased number of steric clashes found between the ligand and the binding pocket. Ligands **7–12** with small substituents such as chlorine or fluorine show a much better fit to the binding pocket (lower number of steric clashes) as shown by their high or moderate activity to the 5-HT₇ receptor (Figure 3A,C). It is noted that no steric clashes were found between the substituent and the receptor binding pocket for the most active type 2 ligand **12** ($K_i = 18$ nM). This is due to the fact that ligands at the *para* positions are most preferred with the best fit to the receptor.

Table 1. Affinity (K_i in [nM]) and SD of the novel derivatives containing triazine motifs to 5-HT_{1A}R and D₂R.

Type No.	Ligand No.	R ₁	R ₂	R ₃	5-HT _{1A} R	5-HT _{2A} R	5-HT ₆ R	5-HT ₇ R	D ₂ R
	1	CN	-	-	12,980 ± 2354	927 ± 927	1563 ± 1563	2883 ± 351	-
	2	F	-	-	13,900 ± 1759	413 ± 67	505 ± 61	8 ± 2	-
	3	Br	-	-	10,950 ± 1598	942 ± 112	234 ± 27	126 ± 17	-
	4	Cl	-	-	3913 ± 581	559 ± 41	702 ± 48	481 ± 23	14,530 ± 2697
	5	OMe	-	-	3128 ± 758	883 ± 108	509 ± 33	629 ± 148	-
	6	Me	-	-	16,560 ± 1943	835 ± 168	714 ± 112	100 ± 15	-
	7	-	<i>o</i> -Cl	-	30,830 ± 4238	2125 ± 352	892 ± 144	423 ± 37	4294 ± 1028
	8	-	<i>m</i> -Cl	-	15,630 ± 1927	1800 ± 264	4022 ± 719	131 ± 16	1238 ± 257
	9	-	<i>p</i> -Cl	-	16,160 ± 2566	2698 ± 581	641 ± 84	19 ± 4	-
	10	-	<i>o</i> -F	-	36,510 ± 8652	1514 ± 362	982 ± 115	132 ± 9	20,410 ± 3695
	11	-	<i>m</i> -F	-	34,580 ± 5581	1277 ± 168	979 ± 237	24 ± 5	13,760 ± 2491
	12	-	<i>p</i> -F	-	43,250 ± 9541	3570 ± 491	1630 ± 301	18 ± 3	2999 ± 679
	13 *	-	<i>o</i> -OMe	-	37,040	14,390	2798	5823	3907
	14	-	<i>m</i> -OMe	-	108,900 ± 18,654	2449 ± 273	2790 ± 342	1036 ± 81	35,960 ± 8432
	15	-	<i>p</i> -OMe	-	-	-	-	756 ± 107	-
	16	-	-	-		138,800 ± 31,821	22,350 ± 3546	8760 ± 1762	21,560 ± 5127
	17	-	-		63,010 ± 13,591	11,150 ± 2571	2629 ± 427	227 ± 37	-
	18	-	-		180,200 ± 41,983	9355 ± 831	1958 ± 269	4128 ± 725	-
	19	-	-		76,200 ± 18,615	4035 ± 537	825 ± 72	3464 ± 284	-
	20	-	<i>m</i> -Cl	-	14,100 ± 2594	2690 ± 549	2226 ± 528	1952 ± 261	2267 ± 153
	21	-	<i>p</i> -F	-	249,500 ± 54,268	884 ± 73	1765 ± 243	2052 ± 419	7033 ± 439
	22	-	<i>p</i> -OMe	-	79,830 ± 16,252	3110 ± 438	3742 ± 539	727 ± 107	-

Each compound was tested in triplicate at 7 concentrations (from 0.1 nM to 100 μM). Inhibition constants (K_i) were calculated from the Cheng–Prusoff equation [23]. Results were expressed as means of at least two separate experiments ± standard deviation (SD), *-according to ref. no [15].

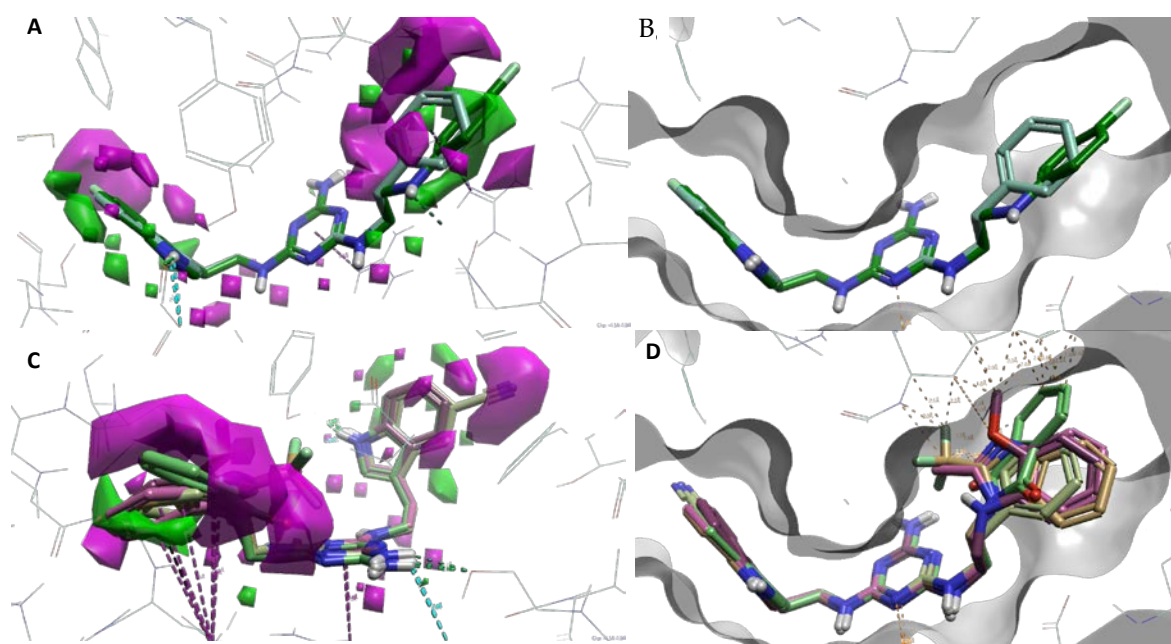


Figure 3. (A,B)—activity cliff summary maps as function of shape. (A)—map showing representative ligands **2** (teal) and **12** (green). Magenta represents unfavorable shape (more steric bulk leads to lower activity), and green represents favorable shape (more steric bulk leads to higher activity). (B)—map showing representative inactive ligands **16** (light brown), **18** (pink), and **19** (light green). (C,D)—binding side surface and sterically clashes (marked in dotted orange lines). (C)—representative active ligands **2** and **12**. (D)—representative inactive ligands **16**, **18**, and **19**. Magenta dotted lines represent π - π interactions, while turquoise and green represent hydrogen bonds with appropriate amino acids.

According to ligand hydrophobicity, type 2 ligands (ligands 7–12) show the best fit to the favorable hydrophobic region (squared green) due to the presence of a hydrophobic aromatic ring which may contribute to π - π interactions (B ring, Figure 4A). The unfavorable hydrophobic region (squared magenta) is not occupied by hydrophobic substituents. Type 3 ligands (ligands 16–19) are a different case. The favorable hydrophobic region is occupied by hydrophilic parts of the substituents (imide and imidazole systems), while the unfavorable hydrophobic region is occupied by the hydrophobic aromatic ring (Figure 4B). The effect of the hydrophobic/hydrophilic properties of substituents at indole position 5 (A ring) for type 1 ligands was difficult to determine based on our studies.

2.4. Molecular Modelling

The highly active compounds (**2** $K_i = 8$ nM and **12** $K_i = 18$ nM) were selected for studying their bioconformation and binding modes through molecular modeling using Induced Fit Docking (Schrodinger, Maestro [25]) followed by ligand–receptor complex optimization using a QM-MM mixed quantum mechanical method (Schrodinger, Maestro [25]) [15,20]. Both ligands occupy a binding pocket typical of 5-HT₇ receptor ligands [26]. They are oriented toward the inside of the receptor (between TMh3 and TMh5, TMh–transmembrane helix) with the tryptamine part, while the alkylaromatic part faces the external receptor surface (between TMh2 and TMh6). Both ligands have more linear bioconformation (Figure 5) with a clear bend of the alkylaromatic moiety and almost completely overlapping hydrogen bonds with the following amino acids: Glu366 (E7.34), Asp162 (D3.32), Ile233, Ser243 (S5.42) (for ligand **2**), and π - π stacking hydrophobic interactions with the following amino acids: Trp340 (W6.48) and Phe343 (F6.51). The binding mode for ligands **2** and **12** corresponds to the results reported previously [15,17,20,26].

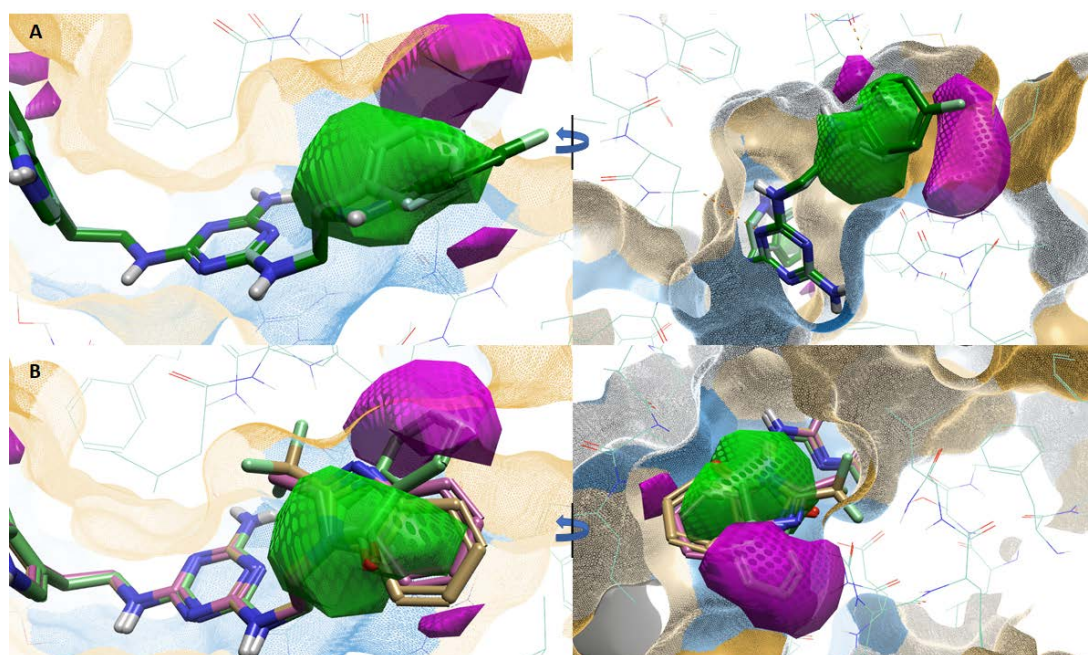


Figure 4. (A)—favorable (checked green)/unfavorable (checked magenta) hydrophobics for active ligands: 2 (teal) and 12 (green). (B)—favorable (checked green)/unfavorable (checked magenta) hydrophobics for representative, inactive ligands: 16 (light brown), 18 (pink), and 19 (light green). The orange area represents the hydrophobic surface of the receptor binding site, and the blue area represents the hydrophilic surface of the receptor binding site.

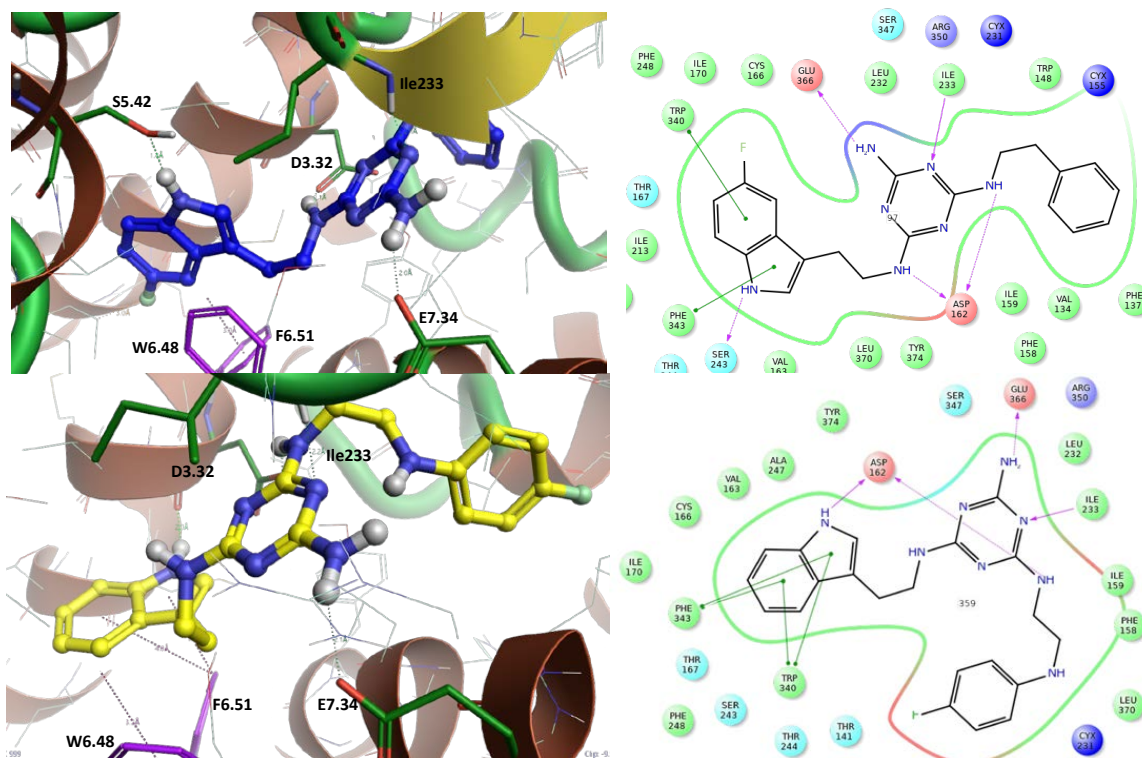


Figure 5. The left side represents the binding mode of ligand 2 (blue) and ligand 12 (yellow) in a homologous model of the 5-HT₇ receptor. Blue amino acids form hydrogen bonds, and purple amino acids represent π - π stacking hydrophobic interactions. The right side represents ligand–protein interactions.

2.5. Metabolic Stability

Highly active compounds **2** and **12** were submitted for metabolic stability evaluation tests using mouse liver microsomes (MLMs). UHPLC-MS analysis of the samples after compounds **2** and **12** were incubated for 2 h in the presence of MLMs showed that 20% and 29% of the original compound remained, respectively. Table 2 shows potential metabolic pathways for the tested compounds as well as Figure 6 shows possible main metabolites predicted by Metasite 6.0.1. It was found, based on the results, that the presence of fluorine at indole position C-5 (ligand **2**) did not have a significant effect on increased metabolic stability compared to the unsubstituted compound [20]. It seems, however, that substituents at the B ring of the ligands have a more important role. Compound **12**, containing a fluorine atom, was found to be more stable than compound **2** and the reference verapamil. The data correspond to our previous results [15], in which substituents at the B ring increased metabolic stability. Potential sites in the molecules sensitive to enzyme activity and leading to degradation were proposed using an in silico approach, also with MetaSite 6.0.1 (Figure 7).

Table 2. Metabolic stability summary: the molecular masses and metabolic pathways of compounds **2**, **12**, and verapamil (reference unstable drug) after incubation with mouse liver microsomes (MLMs). Main metabolic pathways are marked in red.

Substrate	Molecular Mass (m/z)	% Remaining	Molecular Mass of the Metabolite (m/z)	Metabolic Pathway
2	392.33	19.79	408.28 (M1)	hydroxylation
			406.28 (M2)	ketone formation
			424.29 (M3)	double hydroxylation
			390.27(M4)	dehydrogenation
			390.27 (M5)	dehydrogenation
			424.29 (M6)	double hydroxylation
			408.34 (M7)	hydroxylation
			422.30 (M8)	ketone formation and hydroxylation
			424.29 (M9)	hydroxylation
12	407.35	29.12	312.25 (M1)	decomposition
			423.30 (M2)	hydroxylation
			405.29 (M3)	dehydrogenation
			405.29 (M4)	dehydrogenation
			439.31 (M5)	double hydroxylation
			423.30 (M6)	hydroxylation
			405.02 (M7)	dehydrogenation
Verapamil *	455.54	23.93	441.42 (M1)	demethylation
			441.42 (M2)	demethylation
			291.35 (M3)	defragmentation
			293.34 (M4)	defragmentation/hydroxylation
			277.33 (M5)	defragmentation

[*] previously published [27].

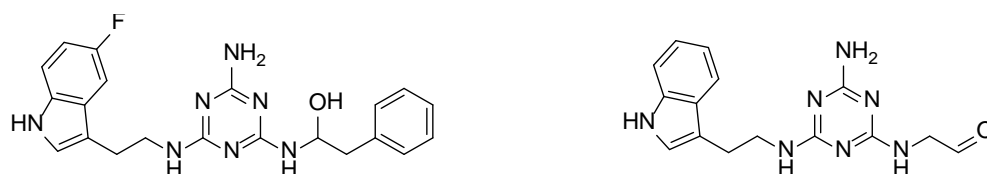


Figure 6. The proposed by MetaSite structure of hydroxylated main metabolite M1 of compound **2** (left) and decomposed main metabolite M1 of compound **12** (right).



Figure 7. The MetaSite 6.0.1. software prediction of the most probable sites of tested compounds metabolism-2 (left), **12** (right). The darker red color—the higher probability of being involved in the metabolism pathway. The blue circle marked the site of compound with the highest probability of metabolic bioconversion.

2.6. CYP3A4 Interaction

Potential drug–drug interactions (DDIs) are an important aspect that should be considered when designing new compounds. Isoenzyme CYP3A4 is one of the varieties of enzymes responsible for xenobiotic metabolism [28]. We evaluated active compounds **2** and **12** in terms of affinity toward this isoenzyme (Figure 8). Both compounds at concentrations identical to that of ketoconazole, the reference compound (1 μM) or lower were shown to have no or slight inhibition activity toward CYP3A4. Compound **2** at 10 μM showed moderate (%CYP3A4 activity = 50) and compound **12** showed high (%CYP3A4 activity = 20) inhibition effect, respectively. A very high inhibition effect was observed for both compounds at 25 μM (%CYP3A4 activity < 15).

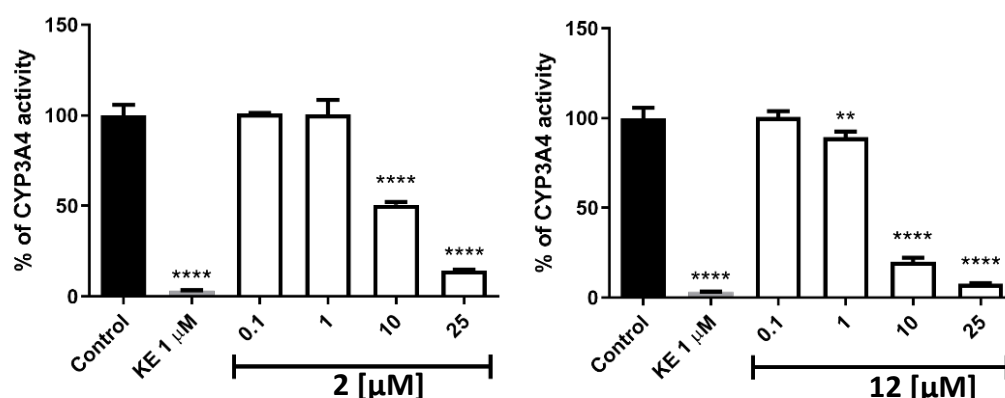


Figure 8. The influence of **2** (left), **12** (right), and ketoconazole (KE) on CYP3A4 activity. Statistical significance (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$) was analyzed by Graph Pad Prism 8.0.1 software using One-way ANOVA and Bonferroni's Multiple Comparison Post Test in comparison with the negative control (100% of CYP3A4 activity). The compounds were examined in triplicate.

2.7. Hepatotoxicity

The tested compounds **2** and **12** were evaluated in terms of cytotoxicity against the HepG2 cell line to assess their hepatotoxic potential (Figure 9). It was an interesting finding that both compounds had proliferative activity in lower concentrations (<10 μM). A cytotoxic effect appeared only at 50 μM (**2**, % cell viability = 35; **12**, % cell viability = 20); at 100 μM , the cells were practically no viable.

2.8. In Vivo Cardiotoxicity

The compounds were evaluated for their ecotoxicity on the Danio rerio experimental model. OECD 236 test [29] with modifications was applied. Both compounds were found cardiotoxic within the non-toxic range, based on the heart rate measurement. For the compound **2**, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was found cardiotoxic (Figure 10) and for **12**, 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 11). The results were confirmed by malformations observation. Pericardial edema (PE) was

observed at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for **2** (Figure 12) and at 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for **12** (Figure 13). Moreover, scoliosis (S) and tail autophagy (TA) were also noted.

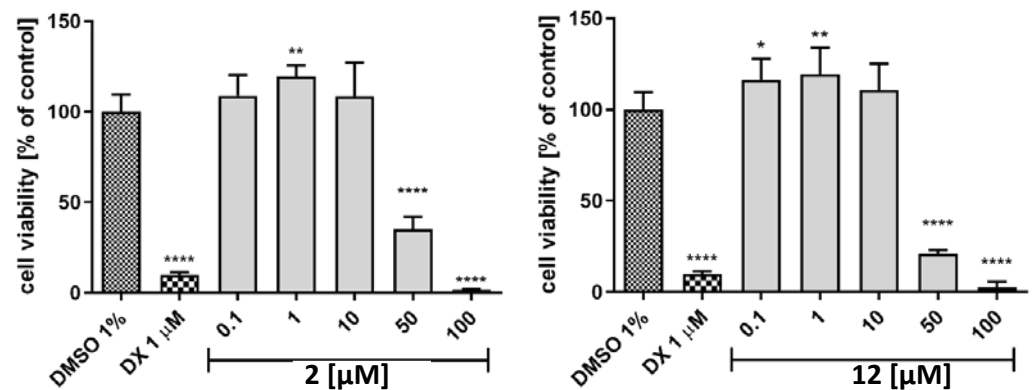


Figure 9. The effect of cytostatic drug doxorubicin and **2** (left), **12** (right) on hepatoma HepG2 cell line viability after 72 h of incubation at 37°, 5% CO₂. The statistical significance (GraphPad Prism 8.0.1) was evaluated by a one-way ANOVA, followed by Bonferroni's Comparison Test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and **** $p < 0.0001$ compared with negative control DMSO 1% in growth media).

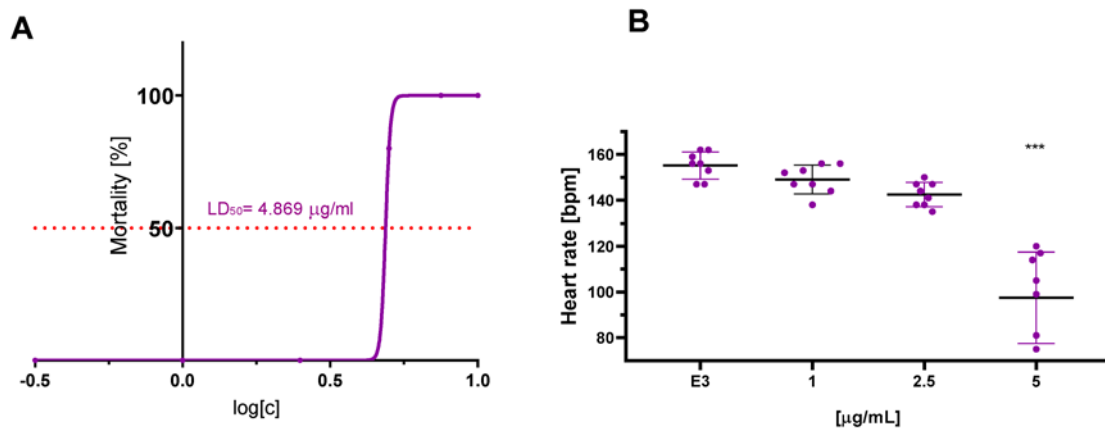


Figure 10. The effect of compound **2** on *Danio rerio*—(A). mortality and (B). cardiotoxicity after 96 h of incubation at 28 °C. The statistical significance (GraphPad Prism 8.0.1) was evaluated by a one-way ANOVA, followed by Tukey post hoc (***) $p < 0.001$ compared with negative control DMSO 1% in growth medium (E3).

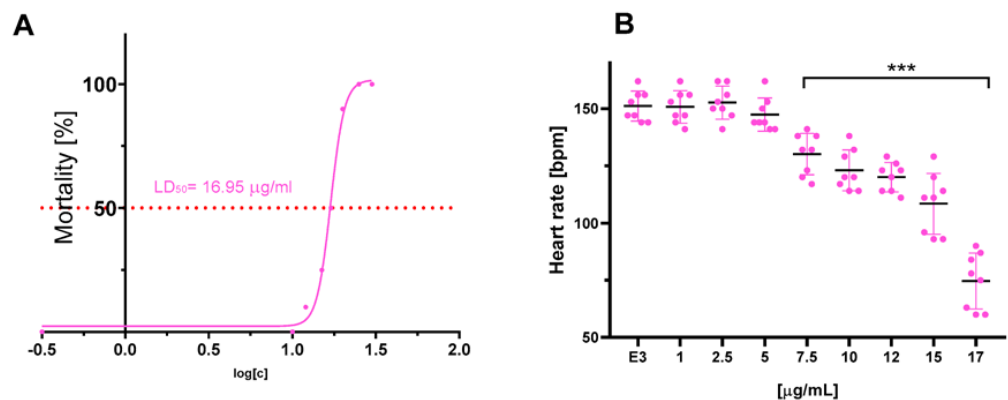


Figure 11. The effect of compound **12** on *Danio rerio*—(A). mortality and (B). cardiotoxicity after 96 h of incubation at 28 °C. The statistical significance (GraphPad Prism 8.0.1) was evaluated by a one-way ANOVA, followed by Tukey post hoc (***) $p < 0.001$ compared with negative control DMSO 1% in growth medium (E3).

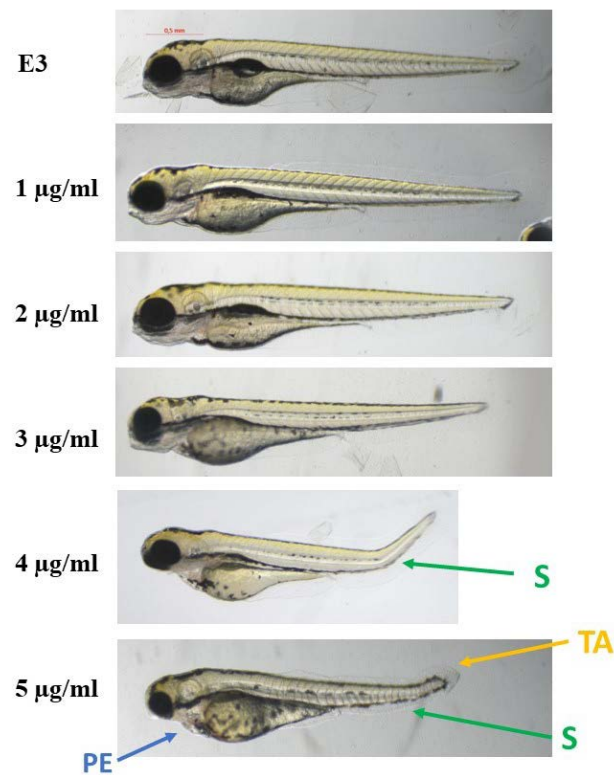


Figure 12. The effect of compound 2 on *Danio rerio* development after 96 h of incubation at 28 °C. PE—pericardial edema; S—scoliosis; TA—tail autophagy; E3—growth medium.

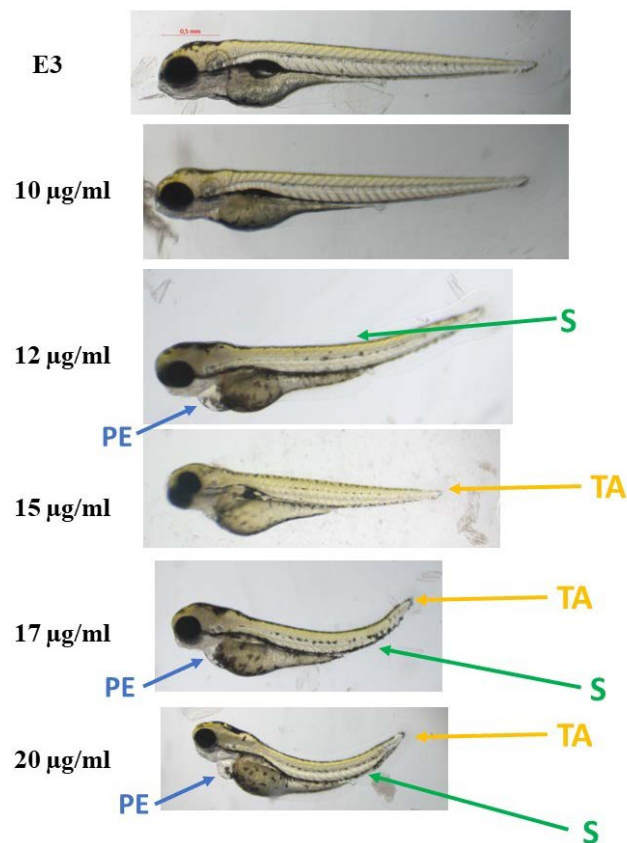


Figure 13. The effect of compound 12 on *Danio rerio* development after 96 h of incubation at 28 °C. PE—pericardial edema; S—scoliosis; TA—tail autophagy; E3—growth medium.

3. Discussion and Conclusions

In spite of the significant functions of the 5-HT₇ receptor [30] both in and outside the central nervous system and the recent progress in medicinal chemistry and pharmacology, a drug having selectivity toward 5-HT₇R is yet to be fully developed [30]. Taking this into consideration, the objective of this paper was to design ligands showing high activity and selectivity toward the 5-HT₇ receptor without incorporating the arylpiperazine pharmacophore, which may increase affinity to other aminergic GPCRs.

All finally synthesized compounds were obtained by a condensation reaction supported by microwave irradiation for 2.5 min with a yield of more than 50%. An interesting fact turned out to be the synthesis of ligands **8**, **12**, and **15**. So far, working on 1,3,5-triazines with indole motif [15,20], we have successfully used a mild alkaline agent, which was potassium carbonate, obtaining final products with medium or high yield. In the case of the mentioned ligands, the reactions did not proceed as it was expected, leading to the elimination of the ethyl bridge. The usage of a slightly weaker base, which was sodium carbonate, resulted in obtaining the desired products with good yield. It was found when studying type 1 compounds that incorporation of EWG or EDG substituents in most cases did not improve affinity toward the 5-HT₇ receptor in the majority of synthesized compounds. Compounds **1** and **3–6** had lower activity than the unsubstituted compound (Figure 1A). Ligand **2**, whose activity did not change compared to the unsubstituted compound, was an exception (Figure 1A). The fact may be accounted for by the effect of bioisosterism of the fluorine atom (hydrogen bioisostere). When exploring the aromatic region of the B ring, ligands with chlorine, fluorine, and methoxy substituents in the *ortho* position showed the lowest activity; higher activity was shown for the substituents in the *meta* position and the highest for substituents in the *para* position (ligand **12**, $K_i = 18$ nM). It is noted that ligands with small substituents (Cl, F) were more active than those with slightly larger substituents (OMe). The incorporation of much larger heterocyclic compounds (type 3) resulted in the loss of activity on the 5-HT₇ receptor. Type 4 compounds showed once more that the distance between the triazine core and the aromatic system, which should be two or three atoms, was crucial [15,20]. The SARs for the resulting compounds were supported using 3D-QSAR computed methods. The bioconformation and the binding mode for the two best compounds (**2** and **12**) were determined using molecular modeling (docking), and the results were consistent with our previous reports [15,20]. The tested ligands (**2** and **12**) are 5-HT₇ receptor antagonists, have moderate metabolic activity (higher or similar to verapamil and still higher than unsubstituted ligands which were described in our publication [20]), and moderate or weak potential drug-drug interactions with respect to ketoconazole. As for hepatotoxicity, both compounds at more than 50 μ M showed cytotoxicity against the HepG2 cell line. The ecotoxicity tests with the use of *Daio rerio* as a model organism turned out **2** to be more toxic than **12**. Moreover, cardiotoxicity expressed as heart rate abnormalities was observed at higher doses for **2** than **12**, and it suggests that cardiotoxic potential needs to be reduced in the future.

4. Materials and Methods

4.1. Chemistry

4.1.1. General

All primary substrates were purchased commercially from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The solvents used for column chromatography (purchased from Merck, Kenilworth, NJ, USA), thin layer chromatography (TLC), and preparative thin layer chromatography (pTLC) had purity above 99.5%. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded using Bruker 400 MHz systems with TMS as an internal standard. Melting points were determined with the Bötetius apparatus. HPLC–MS analyses were performed on the Shimadzu Nexera XR system equipped with PDA (SPD-M40) and LCMS-2020 detectors. Analyses were performed on Phenomenex XB-C18 1.7 μ m (50 \times 2.1 mm) (method A) column with gradient of solvents as a mobile phase: Solvent A (0.01% HCOOH in water) and B (0.01% HCOOH in methanol); t = 0 min, 10% of B, t = 4 min, 90% of B, t = 6 min, 90% of B,

$t = 6.1$ min 10% of B, stop time 11 min or Phenomenex C18 $1.7 \mu\text{m}$ (50×2.1 mm) (method B) column with gradient of solvents as a mobile phase: solvent A (0.01% HCOOH in water) and solvent B (0.01% HCOOH in MeOH): $t = 0$ min 5% of B, $t = 3$ min 90% of B, $t = 4$ min 90% of B, $t = 4.5$ min 5% of B stop time 7 min; flow rate 0.4 mL min^{-1} ; the UV-VIS detection was performed in a range of 240–700 nm, the MS data were collected in ESI + mode in a range of m/z 100–800 with scan speed 15,000 u/s and event time 0.1 s. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using 0.2 mm silica gel precoated aluminum sheets (60 F254, Merck), and UV light at 254 nm was used for visualization. Preparative thin-layer chromatography (pTLC) was performed using 2000 μm silica gel precoated glass backed (F254, Silicycle). A CEM Discover™ Focused Microwave System at 50 W power was used for all microwave-assisted reactions in order to obtain final compounds. Within 2.5 min of reaction with a power of 50 W, the temperature increased up to 120°C , while the pressure increased up to 9 bar. Characterization of the intermediates and spectra for the final compounds can be found in Supporting Information.

4.1.2. General Procedure for the Synthesis of Compounds 29–34

12 mL of DMF was cooled to 0°C , and phosphoryl chloride (38.5 mmol) was added dropwise. In this temperature solution of commercially available indoles 23–28 (35.5 mmol) in 3 mL of DMF was added dropwise, and the resulting mixture was stirred at room temperature for one hour. The reaction became a thick, pale suspension. Sodium hydroxide solution (10%, 40 mL) was added slowly to the reaction mixture ($\text{pH} = 13\text{--}14$), followed by precipitation of pale solid 29–34. The solid was filtered, rinsed with distilled water, and dried.

4.1.3. General Procedure for the Synthesis of Compounds 35–40

Intermediate 29–34 (23.5 mmol) was placed in a one-necked round bottom flask and dissolved in 60 mL nitromethane, and then, ammonia acetate (44.2 mmol) was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 80 W (100°C) for 20 min. Reaction progress was monitored via TLC (hexane:EtOAc 1:1 v/v). After this time, TLC indicated full conversion of starting material, and the mixture was cooled to room temperature with precipitation of yellow solid 35–40. The solid was filtered, rinsed with distilled water, and dried.

4.1.4. Synthesis of 3-(2-Nitroethyl)-1H-Indole-5-Carbonitrile (41)

Intermediate 35 (4.1 g, 19.2 mmol) was dissolved in the 330 mL mixture of DMF:MeOH (1:1, v/v), followed by the addition of sodium borohydride (8 g, 21.1 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 5 h. Reaction progress was monitored via TLC (hexane:EtOAc 1:1 v/v). After reaction completion reaction was diluted with 2M HCl to reach $\text{pH} = 7$. The solvent was reduced and extracted with EtOAc (3×150 mL). The crude product was triturated with a mixture of MeOH:chloroform to yield 2.17 g of the titled compound. The mother liquor was concentrated to dryness and purified at column chromatography eluted with hexane:EtOAc (v/v) 8:2 \rightarrow 6:4 to yield 0.8 g of the titled compound. Creamy solid (71% yield); mp.: $131\text{--}133^\circ\text{C}$ (ref. $134\text{--}136^\circ\text{C}$ [31]); method B: ESI+MS calc. for $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ $m/z = 215$; found $m/z = 214$ $[\text{M-H}]^-$.

4.1.5. General Procedure for the Synthesis of Compounds 42–46

Lithium aluminum hydride (25.9 mmol) was placed in a three-necked round bottom flask, followed by the addition of 20 mL dry THF. The resulting suspension was cooled to 0°C , and mixture of intermediates 36–40 (4.7 mmol) in 20 mL THF was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 72 h and then quenched with slow addition of mixture $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (9:1, v/v). The suspension was filtered by a Celite bed, and pH-dependent extraction was performed: filtrate was acidified to reach $\text{pH} 2\text{--}3$ with 1 M HCl, followed by extraction with EtOAc (3×100 mL). The water layer was alkalized to reach

pH 10 with 1 M NaOH and then extracted with EtOAc (3 × 100 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄, and concentrated to yield brown, sticky oil **42–46**.

4.1.6. Synthesis of 3-(2-Aminoethyl)-1H-Indole-5-Carbonitrile (**47**)

A solution of **41** (1.5 g, 6.9 mmol) in 205 mL MeOH was added to the solution of zinc (10.4 g, 0.16 mol) in 205 mL 2M HCl and refluxed for 1.5 h. After this time mixture was cooled to room temperature and filtered. The filtrate was alkalized to pH 12, and MeOH was removed under reduced pressure. The resulting mixture was extracted with EtOAc (3 × 200 mL), and organic layers were combined, dried over MgSO₄ then evaporated to dryness. It obtained 0.87 g (67% yield) of titled compound **47**, which was used in the next step without any further purification.

4.1.7. Synthesis of 4,6-Dichloro-N-Phenethyl-1,3,5-Triazin-2-Amine (**50**)

To a solution of cynuric chloride **48** (8.35 g, 45.2 mmol) in 100 mL THF cooled to 0 °C, a solution of phenylethylamine **49** (5 g, 41.2 mmol) in 5 mL THF was added dropwise. The reaction was carried out at 0–3 °C for 2 h. The resulting precipitate was filtered, and the filtrate was diluted with 0.1 M HCl and extracted with chloroform (3 × 100 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄, and concentrated to yield a brown solid. The solid was triturated with acetone and then filtered. The black filtrate was purified using column chromatography eluted with hexane:EtOAc (*v/v*) 9:1-> 6:4 to yield 3.74 g of the titled compound. Creamy solid (34% yield); method B: ESI-MS calc. for C₁₁H₁₀Cl₂N₄ *m/z* = 268.0; found *m/z* = 269.1 [M+H]⁺.

4.1.8. Synthesis of 6-Chloro-N²-Phenethyl-1,3,5-Triazine-2,4-Diamine (**51**)

Briefly, **50** (3.5 g, 13.0 mmol) was dissolved in 50 mL acetone, followed by the addition of 5.7 mL 25% ammonia solution. The reaction was carried out at room temperature for 5 h. The resulting precipitate was filtered, and the filtrate evaporated to dryness, yielding 2.8 g of titled compound **51**. Creamy solid (86% yield); ESI-MS calc. for C₁₁H₁₂ClN₅ *m/z* = 249; method B: found *m/z* = 250 [M+H]⁺.

4.1.9. General Procedure for the Synthesis of Final Compounds **1–6** (Microwave-Assisted)

Briefly, **51** (0.25 g, 1.0 mmol), potassium carbonate (0.41 g, 3.0 mmol), and TBAB (0.032 g, 0.1 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube which was previously charged with appropriate amine **42–47** (2.5 mmol). Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 9:1 *v/v*). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 20 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄, and concentrated. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform then chloroform:MeOH (*v/v*) 99:1-> 97:3. The white or beige sticky oil was then dissolved in acetone and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. The resulting mixture was crushed by the addition of cold diethyl ether, then the white or beige powder was filtered and rinsed with cold diethyl ether and then dried to yield final product **1–6**.

4.1.10. 3-(2-((4-Amino-6-(Phenethylamino)-1,3,5-Triazin-2-yl)Amino)Ethyl)-1H-Indole-5-Carbonitrile Hydrochloride (**1**)

Beige solid (54% yield), mp: 95–98 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.02 (s, 1H), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 7.34–7.15 (m, 6H), 3.76–3.70 (m, 2H), 3.64 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.59 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.09 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.91 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 2.86 (t, J = 7.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.0, 138.6, 138.5, 128.4, 128.1, 128.1, 127.3, 126.0, 125.1, 125.1, 123.8, 123.7, 120.5, 112.9, 112.1, 100.9, 42.0, 41.3, 35.0, 24.5; HPLC-MS analysis t_r = 5.84 min (94% purity, method A), calc. for C₂₂H₂₂N₈ *m/z* = 398.2, found *m/z* = 399.2 [M+H]⁺.

4.1.11. N²-(2-(5-Fluoro-1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-Phenethyl-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (2)

Beige solid (67% yield), mp: 110–114 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.33–7.29 (m, 2H), 7.27–7.14 (m, 6H), 6.87 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 3.76–3.67 (m, 2H), 3.63 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.03 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.90 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 2.86 (t, J = 7.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 158.2, 156.7, 156.1, 133.3, 132.2, 131.0, 128.5, 128.1, 126.0, 124.3, 111.7, 109.1, 108.9, 102.5, 102.3, 42.0, 41.3, 35.0, 24.8; HPLC-MS analysis t–6.13 min (99% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₂FN₇ m/z = 391.2, found m/z = 392.2 [M+H]⁺.

4.1.12. N²-(2-(5-Bromo-1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-Phenethyl-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (3)

Beige solid (63% yield), mp: 82–85 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.70 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 7.33–7.17 (m, 8H), 3.71 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.64 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.02 (dd, J = 12.8, 5.8 Hz, 2H), 2.91 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 2.87 (t, J = 7.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.1, 138.7, 135.4, 129.2, 128.4, 128.1, 128.1, 126.1, 126.0, 123.9, 123.6, 120.4, 112.6, 111.5, 111.4, 66.98, 47.2, 42.0, 41.4, 35.0, 24.7; HPLC-MS analysis t–6.41 min (98% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₂⁷⁹BrN₇ m/z = 451.1, found m/z = 452.2 [M+H]⁺, calc. for C₂₁H₂₂⁸¹BrN₇ m/z = 453.1, found m/z = 454.2 [M+H]⁺.

4.1.13. N²-(2-(5-Chloro-1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-Phenethyl-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (4)

White solid (58% yield), mp: 106–108 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.55 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 17.0, 8.0 Hz, 2H), 7.28–7.15 (m, 5H), 7.07 (dd, J = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 3.74–3.67 (m, 2H), 3.64 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.04 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.91 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 2.87 (t, J = 7.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.0, 138.6, 135.1, 128.5, 128.5, 128.4, 128.1, 128.1, 126.0, 124.0, 121.1, 117.3, 117.2, 112.1, 111.4, 42.0, 41.4, 35.0, 24.7; HPLC-MS analysis t–6.11 min (94% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₂³⁵ClN₇ m/z = 407.2, found m/z = 408.4 [M+H]⁺, calc. for C₂₁H₂₂³⁷ClN₇ m/z = 409.2, found m/z = 410.4 [M+H]⁺.

4.1.14. N²-(2-(5-Methoxy-1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-Phenethyl-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (5)

White solid (52% yield), mp: 111–115 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.27–7.21 (m, 4H), 7.18 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.07 (t, J = 20.0 Hz, 1H), 6.78 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 3.83 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.70 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 3.66–3.61 (m, 1H), 3.57 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.05 (dd, J = 14.5, 7.3 Hz, 2H), 2.90 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 2.85 (t, J = 7.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.0, 153.5, 138.6, 132.0, 128.4, 128.1, 128.1, 127.6, 126.1, 126.0, 123.0, 111.5, 111.3, 111.2, 111.1, 54.9, 42.0, 41.5, 35.0, 24.8; HPLC-MS analysis t–5.91 min (98% purity, method A), calc. for C₂₂H₂₅N₇O m/z = 403.2, found m/z = 404.2 [M+H]⁺.

4.1.15. N²-(2-(5-Methyl-1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-Phenethyl-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (6)

White solid (57% yield), mp: 118–121 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.31 (dd, J = 15.8, 8.7 Hz, 2H), 7.28–7.21 (m, 4H), 7.18 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 21.7 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 12.1, 8.5 Hz, 1H), 3.75 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.70 (bs, 1H), 3.63 (bs, 1H), 3.56 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.05 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.90 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 2.85 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H)–hydrogen bonded rotamer H₃C-C_{Ar}; ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.0, 138.6, 135.1, 128.5, 128.4, 128.1, 128.1, 127.6, 127.3, 126.1, 126.0, 122.6, 122.3, 117.4, 110.6, 42.0, 41.5, 35.1, 24.9, 20.3 (H₃C-C_{Ar}). HPLC-MS analysis t–6.00 min (98% purity, method A), calc. for C₂₂H₂₅N₇ m/z = 387.2, found m/z = 388.4 [M+H]⁺.

4.1.16. General Procedure for the Synthesis of Compounds 61–68

In a round bottom flask, 2-chloroethanamine hydrochloride **52** (1.0 g, 8.6 mmol) was suspended in 8 mL of toluene. To the resulting mixture, appropriate aniline **53–60** (51.7 mmol) was added, and the mixture was refluxed for 20 h. After this period, toluene was evaporated, and residues were triturated with dichloromethane to yield solid as titled compounds **61–68** (optionally solid may be washed with diethyl ether).

4.1.17. General Procedure for the Synthesis of Final Compounds 7, 9–11, and 14 (microwave-assisted)

Briefly, **69** [20] (0.25 g, 0.8 mmol), amines **61, 63–65, 67** (2.0 mmol) potassium carbonate (0.36 g, 2.5 mmol) and TBAB (0.032 g, 0.1 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube. Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 9:1 *v/v*). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 20 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄, and concentrated. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform then chloroform:MeOH (*v/v*) 99:1 → 97:3. Colorless sticky oil was then dissolved in acetone, and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. The resulting mixture was crushed by the addition of cold diethyl ether, and then the white or beige powder was filtered and rinsed with cold diethyl ether and then dried to yield final products **7, 9–11, and 14**.

4.1.18. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((2-Chlorophenyl)amino)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (7)

White solid (72% yield), mp: 105–108 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.56 (dd, J = 19.1, 7.7 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.33–6.99 (m, 5H), 6.99–6.87 (m, 1H), 6.82–6.66 (m, 1H), 3.72 (dd, J = 15.3, 7.2 Hz, 2H), 3.66 (dd, J = 13.3, 6.3 Hz, 1H), 3.54 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.49 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 3.41 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 3.07 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 3.03 (t, J = 7.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.0, 142.0, 136.8, 129.1, 127.7, 127.3, 122.3, 121.0, 119.8, 118.9, 118.3, 118.2, 117.7, 112.8, 111.3, 110.9, 43.3, 41.4, 38.8, 24.8; HPLC-MS analysis t–5.92 min (98% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₃³⁵ClN₈ *m/z* = 422.2, found *m/z* = 423.2 [M+H]⁺, calc. for C₂₁H₂₃³⁷ClN₈ *m/z* = 424.2, found *m/z* = 425.2 [M+H]⁺.

4.1.19. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((4-Chlorophenyl)amino)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (9)

White solid (70% yield), mp: 97–100 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.54–7.46 (m, 2H), 7.43 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.12 (dd, J = 18.5, 13.7 Hz, 2H), 7.03 (dt, J = 14.8, 7.5 Hz, 1H), 3.79–3.73 (m, 2H), 3.71 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.58 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.56 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 3.16 (d, J = 18.8 Hz, 1H), 3.09 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.04 (t, J = 6.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.1, 136.8, 129.9, 127.3, 123.0, 122.8, 122.4, 122.3, 121.0, 118.3, 117.7, 117.7, 111.2, 111.0, 110.9, 41.3, 41.2, 36.8, 24.8; HPLC-MS analysis t–5.94 min (92% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₃³⁵ClN₈ *m/z* = 422.2, found *m/z* = 423.4 [M+H]⁺, calc. for C₂₁H₂₃³⁷ClN₈ *m/z* = 424.2, found *m/z* = 425.4 [M+H]⁺.

4.1.20. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((2-Fluorophenyl)amino)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (10)

White solid (70% yield), mp: 94–97 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.60–7.52 (m, 1H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.34–6.95 (m, 7H), 3.74 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 3.61–3.54 (m, 2H), 3.48 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 3.08 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 3.04 (t, J = 7.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 158.5, 156.1, 136.8, 127.3, 127.2, 125.0, 124.9, 122.4, 122.3, 121.0, 118.2, 117.7, 115.4, 115.3, 111.3, 110.9, 45.4, 41.3, 38.0, 24.8; HPLC-MS analysis t–5.79 min (99% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₃FN₈ *m/z* = 406.2, found *m/z* = 407.4 [M+H]⁺.

4.1.21. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((3-Fluorophenyl)amino)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (11)

White solid (52% yield), mp: 74–79 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.10 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.02 (bs, 2H), 6.46–6.23 (m, 3H), 3.67 (bs, 2H), 3.53 (bs, 2H), 3.28 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.04 (t, J = 7.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 165.0, 163.4, 136.8, 129.8, 127.3, 122.2, 120.9, 118.2, 117.9, 111.7, 110.8, 108.2, 102.3, 102.1, 98.5, 98.3, 42.8, 41.1, 39.4, 25.0; HPLC-MS analysis t–5.75 min (94% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₃FN₈ m/z = 406.2, found m/z = 407.3 [M+H]⁺.

4.1.22. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((3-Methoxyphenyl)amino)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (14)

White solid (77% yield), mp: 140–143 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.17–7.07 (m, 3H), 7.06–6.98 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.59 (dd, J = 5.3, 4.0 Hz, 2H), 3.08 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.03 (t, J = 6.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 160.9, 156.1, 136.8, 130.7, 130.7, 127.3, 127.2, 122.5, 122.4, 121.0, 118.3, 117.8, 117.7, 111.2, 111.0, 110.9, 54.8, 41.3, 41.2, 36.6, 24.8; HPLC-MS analysis t–5.58 min (99% purity, method A), calc. for C₂₂H₂₆N₈O m/z = 418.2, found m/z = 419.4 [M+H]⁺.

4.1.23. General Procedure for the Synthesis of Final Compounds 8, 12, and 15 (Microwave-Assisted)

Briefly, **69** [20] (0.25 g, 0.8 mmol), amines **62**, **66**, and **68** (2.0 mmol), sodium carbonate (0.26 g, 2.5 mmol) and TBAB (0.032 g, 0.1 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube. Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 9:1 v/v). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 20 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄, and concentrated. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform then chloroform:MeOH (v/v) 99:1→97:3. Colorless sticky oil was then dissolved in acetone, and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. The resulting mixture was crushed by the addition of cold diethyl ether; then, the white or beige powder was filtered and rinsed with cold diethyl ether then dried to yield final products **8**, **12**, and **15**.

4.1.24. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((3-Chlorophenyl)amino)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (8)

White solid (70% yield), mp: 77–82 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.10 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.05–6.92 (m, 2H), 6.73–6.51 (m, 3H), 3.68 (s, 2H), 3.53 (s, 2H), 3.28 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.04 (t, J = 7.1 Hz, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 150.0, 136.8, 134.4, 129.8, 127.3, 122.2, 122.2, 121.0, 120.9, 118.2, 117.9, 115.8, 111.7, 111.5, 110.8, 110.6, 42.5, 41.1, 39.4, 25.0; HPLC-MS analysis t–5.60 min (100% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₃³⁵ClN₈ m/z = 422.2, found m/z = 423.2 [M+H]⁺, calc. for C₂₁H₂₃³⁷ClN₈ m/z = 424.2, found m/z = 425.2 [M+H]⁺.

4.1.25. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((4-Fluorophenyl)amino)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (12)

White solid (81% yield), mp: 140–143 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.60 (dd, J = 17.7, 5.8 Hz, 2H), 7.52 (dd, J = 20.8, 8.3 Hz, 1H), 7.38–7.28 (m, 2H), 7.22 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 20.8, 13.1 Hz, 2H), 7.03 (dt, J = 15.0, 7.5 Hz, 1H), 3.79 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 3.77–3.72 (m, 2H), 3.69 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 3.59 (dd, J = 10.3, 4.5 Hz, 2H), 3.09 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.05 (t, J = 6.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.2, 136.8, 127.3, 124.3, 122.4, 122.3, 121.0, 118.3, 117.7, 117.7, 116.9, 116.8, 111.2, 111.0, 110.9, 41.3, 41.2, 36.5, 24.8; HPLC-MS analysis t–5.61 min (100% purity, method A), calc. for C₂₁H₂₃FN₈ m/z = 406.2, found m/z = 407.3 [M+H]⁺.

4.1.26. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-((4-Methoxyphenyl)amino)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (**15**)

White solid (60% yield), mp: 150–153 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.59 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.54–7.44 (m, 2H), 7.40–7.35 (m, 2H), 7.11 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 7.03 (dd, J = 19.2, 7.7 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 3.83 (d, J = 13.4 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.71 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.65 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 3.56 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 3.09 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 3.04 (t, J = 6.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 160.4, 156.2, 136.8, 127.4, 127.3, 127.0, 123.6, 122.4, 121.0, 118.3, 117.7, 115.1, 111.2, 111.0, 110.9, 54.8, 41.35, 36.7, 36.3, 24.8; HPLC-MS analysis t–5.20 min (100% purity, method A), calc. for C₂₂H₂₆N₈O *m/z* = 418.2, found *m/z* = 419.2 [M+H]⁺

4.1.27. Synthesis of Tert-Butyl-(2-Chloroethyl)Carbamate (**70**)

To a suspension of 2-chloroethanamine hydrochloride **52** (5 g, 43.1 mmol) in 60 mL DCM cooled to 0 °C, triethylamine (12 mL, 86.1 mmol) was added, followed by di-tert-butyl decarbonate (11.2 g, 51.4 mmol). The reaction was carried out at room temperature for 12 h. After this period reaction mixture was washed three times with 0.1M HCl and water. Organic layers were combined, dried over MgSO₄ then evaporated to dryness, yielding colorless sticky oil **70**.

4.1.28. General Procedure for the Synthesis of **75–78** (Microwave-Assisted)

Starting material **71–74** (3.7 mmol), tert-butyl-(2-chloroethyl)carbamate **70** (5.6 mmol), sodium hydroxide (5.6 mmol), and TBAB (0.4 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube. Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 65 W for 60 s. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 9:1, *v/v*). The mixture was extracted with chloroform (3 × 30 mL), organic layers were combined, dried over MgSO₄ then evaporated to dryness. The crude product was purified via column chromatography, eluting with chloroform then chloroform:MeOH (*v/v*) 99:1 → 97:3. Obtained pale yellow solid was then dissolved in 30 mL DCM followed by the addition of 4M HCl in 1,4-dioxane to reach pH = 2. The mixture was stirred at room temperature for 12 h, and then the solid was filtered, washed with DCM and diethyl ether, and dried, yielding titled compounds **75–78**.

4.1.29. General Procedure for the Synthesis of Final Compounds **16–19** (Microwave-Assisted)

Briefly, **69** [20] (0.25 g, 0.8 mmol), amine hydrochloride **75–78** (2.0 mmol), potassium carbonate (0.36 g, 2.5 mmol) and TBAB (0.032 g, 0.1 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube. Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 9:1 *v/v*). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 20 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄, and concentrated. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform then chloroform:MeOH (*v/v*) 99:1 → 88:12. Beige sticky oil was then dissolved in acetone, and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. The resulting mixture was crushed by the addition of cold diethyl ether, and then the beige powder was filtered and rinsed with cold diethyl ether and then dried to yield final product **16–19**.

4.1.30. 2-(2-((4-((2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)amino)-6-Amino-1,3,5-Triazin-2-yl)amino)ethyl)is-oidoline-1,3-Dione Hydrochloride (**16**)

White solid (59% yield), mp: 136–138 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.87–7.66 (m, 4H), 7.56 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 14.8, 7.9 Hz, 1H), 7.14–6.95 (m, 3H), 3.91 (bs, 1H), 3.84 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 3.69–3.50 (m, 4H), 3.07–2.88 (m, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 168.5, 168.3, 136.7, 133.9, 131.9, 127.3, 122.7, 122.4, 121.0, 120.9, 118.3, 118.1, 117.8, 111.4, 110.8, 41.1, 38.7, 36.9, 24.9; HPLC-MS analysis t–5.41 min (100% purity, method A), calc. for C₂₃H₂₂N₈O₂ *m/z* = 442.2, found *m/z* = 443.2 [M+H]⁺.

4.1.31. N²-(2-(1H-Benzo[d]imidazol-1-yl)ethyl)-N⁴-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (17)

White solid (60% yield), mp: 195–200 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 9.44 (s, 1H)–hydrogen bonded rotamer H-N_{benzimid.}, 8.00–7.84 (m, 1H), 7.80 (dd, J = 21.4, 8.3 Hz, 1H), 7.70–7.45 (m, 3H), 7.34 (dd, J = 32.3, 7.9 Hz, 1H), 7.14–7.00 (m, 3H), 4.80 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.55 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 3.97 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 3.68 (dd, J = 19.7, 4.9 Hz, 2H), 3.24 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 15.5, 7.9 Hz, 1H), 2.90 (t, J = 6.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.1, 140.7, 136.7, 130.7, 127.2, 126.9, 126.5, 122.5, 121.0, 118.2, 117.7, 114.3, 112.5, 111.2, 111.0, 46.3, 40.9, 39.4, 24.8; HPLC-MS analysis t–4.76 min (96% purity, method A), calc. for C₂₂H₂₃N₉ m/z = 413.2, found m/z = 414.2 [M+H]⁺.

4.1.32. N²-(2-(1H-indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-(2-methyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine hydrochloride (18)

White solid (55% yield), mp: 190–194 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.73–7.63 (m, 1H), 7.63–7.48 (m, 3H), 7.41–7.29 (m, 2H), 7.12 (dd, J = 14.4, 7.8 Hz, 1H), 7.09–7.00 (m, 2H), 4.69 (bs, 1H), 4.44 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 3.93 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 3.69 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 3.62 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.30 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.14–2.97 (m, 4H), 2.75 (s, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 156.1, 150.9, 136.7, 132.0, 127.3, 126.3, 125.9, 122.6, 121.0, 118.3, 117.9, 113.3, 112.1, 111.2, 111.0, 44.3, 41.0, 38.9, 24.7, 10.3; HPLC-MS analysis t–4.25 min (97% purity, method A), calc. for C₂₃H₂₅N₉ m/z = 427.2, found m/z = 428.2 [M+H]⁺.

4.1.33. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(2-(2-(Trifluoromethyl)-1H-Benzo[d]imidazol-1-yl)ethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (19)

White solid (76% yield), mp: 108–110 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 8.15–7.72 (m, 2H), 7.61–7.47 (m, 2H), 7.44 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 24.3, 17.3 Hz, 2H), 7.06–6.95 (m, 1H), 3.77 (dt, J = 47.9, 6.7 Hz, 2H), 3.11 (t, J = 6.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 156.1, 140.8, 136.7, 136.0, 127.5, 125.6, 123.9, 123.3, 121.2, 120.4, 118.6, 118.5, 112.1, 111.8, 111.4, 44.7, 41.1, 30.0, 27.5, 24.9; HPLC-MS analysis t–5.85 min (92 % purity, method A), calc. for C₂₃H₂₂F₃N₉ m/z = 481.2, found m/z = 482.2 [M+H]⁺.

4.1.34. General Procedure for the Synthesis of Final Compounds 20–22 (Microwave-Assisted)

Briefly, **69** [20] (0.25 g, 0.8 mmol), amines **62**, **66**, and **68** (2.0 mmol) potassium carbonate (0.36 g, 2.5 mmol) and TBAB (0.032 g, 0.1 mmol) were ground in a mortar and transferred to a sealed tube. Subsequently, 5 wt % DMF was added. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. Reaction progress was monitored via TLC (chloroform: MeOH 9:1 v/v). The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3 × 20 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄, and concentrated. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform then chloroform:MeOH (v/v) 99:1-> 97:3. Colorless sticky oil was then dissolved in acetone, and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in 1,4-dioxane. The resulting mixture was crushed by the addition of cold diethyl ether, then the white powder was filtered and rinsed with cold diethyl ether and then dried to yield the final product **20–22**.

4.1.35. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(3-Chlorophenyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (20)

White solid (84% yield), mp: 174–178 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.80 (d, J = 20.9 Hz, 1H), 7.63–7.42 (m, 2H), 7.38–7.27 (m, 2H), 7.20–7.08 (m, 3H), 7.06–6.98 (m, 1H), 3.84–3.70 (m, 2H), 3.11 (t, J = 7.0 Hz, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 136.8, 133.9, 129.6, 127.2, 124.0, 122.4, 121.2, 121.0, 119.5, 118.3, 117.7, 111.0, 110.9, 41.6, 24.5; HPLC-MS analysis t–6.53 min (100% purity, method A), calc. for C₁₉H₁₈³⁵ClN₇ m/z = 379.1, found m/z = 380.1 [M+H]⁺, calc. for C₁₉H₁₈³⁷ClN₇ m/z = 381.1, found m/z = 382.1 [M+H]⁺.

4.1.36. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(4-Fluorophenyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (**21**)

White solid (82% yield), mp: 232–235 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.69–7.46 (m, 3H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.16–6.99 (m, 5H), 3.75 (bs, 2H), 3.09 (bs, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 136.8, 127.2, 123.8, 122.3, 121.0, 118.3, 117.7, 115.0, 114.8, 111.2, 110.9, 41.4, 24.6; HPLC-MS analysis t–5.97 min (100% purity, method A), calc. for C₁₉H₁₈FN₇ m/z = 363.2, found m/z = 364.4 [M+H]⁺.

4.1.37. N²-(2-(1H-Indol-3-yl)ethyl)-N⁴-(4-Methoxyphenyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6-Triamine Hydrochloride (**22**)

White solid (83% yield), mp: 194–196 °C; ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.61–7.38 (m, 3H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.15–7.08 (m, 2H), 7.06–6.91 (m, 2H), 6.84 (bs, 1H), 3.84–3.67 (m, 5H), 3.07 (bs, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, MeOD) δ 136.8, 127.2, 123.5, 122.3, 121.0, 118.3, 117.8, 114.1, 113.6, 111.2, 110.9, 54.5, 41.4, 24.6; HPLC-MS analysis t–5.88 min (100% purity, method A), calc. for C₂₀H₂₁N₇O m/z = 375.2, found m/z = 376.1 [M+H]⁺.

4.2. Radioligand Assay

The cell culture, cell membranes, and radioligand binding assays were performed in accordance with standard protocols [17].

4.3. Atlas Activity

Activity maps were prepared using the Atlas Activity tool available in Flare [24] according to the procedure described in a previous paper [15].

4.4. Molecular Modelling

A homologous model developed by us earlier was used for molecular modeling studies [15]. The docking procedure and the QM–MM optimization of the ligand–receptor complex were performed according to a previously described protocol [15,20,32].

4.5. Metabolic Stability

All assays were performed according to the protocols described previously [15,33–35].

4.6. CYP3A4 Activity

All assays were performed according to the protocols described previously [15,33–35].

4.7. Hepatotoxicity

All assays were performed according to the protocols described previously [15,33–35].

4.8. In Vivo Cardiotoxicity

To determine the toxicity of the compounds, the fish embryo toxicity (FET) test was performed on zebrafish (*Danio rerio*) according to OECD Test Guideline 236. The collected embryos were transferred to a Petri dish with E3 medium (5 mM NaCl, 0.33 mM MgCl₂, 0.33 mM CaCl₂, 0.17 mM KCl; pH 7.2) and then placed in 6-well plates, 10 embryos per well. Stock solutions **2** and **12** were prepared in DMSO. In these experiments, the range of different concentrations of the solutions was prepared by dissolving stock solutions in the E3 medium each time directly before addition to the wells. The solutions were changed once daily, and the embryos were maintained in the incubator at 28.5 °C. At the end of the exposure period (96 hpf–hours postfertilization), acute toxicity was determined based on a positive outcome in any of the four visual indicators of lethality, including the coagulation of fertilized eggs, lack of somite formation, lack of detachment of the tailbud from the yolk sac and lack of heartbeat. The value of LD₅₀ was calculated. Heartbeats were recorded to observe cardiotoxic effects. Moreover, images of the fish from each group were taken at the final time point to monitor the occurrence of developmental malformations. For the observations, a Discovery V8 Stereo optical microscope and Zeiss hardware were used.

A dose-response curve was generated using Prism 8.0.1 (GraphPad Software) by fitting a sigmoid curve model to experimental data points. The concentrations of the compounds of interest causing 50% mortality (LD₅₀) of 96 hpf larvae of *Danio rerio* were calculated.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232113308/s1>, Copies of the ¹H and ¹³C NMR spectra and HPLC-MS analysis, metabolic stability-MS spectrograms and 5-HT₇ receptor homology model validation can be found in the Supplementary Material.

Author Contributions: Conceptualization, D.K.; methodology, D.K.; software, D.K. and G.L.; validation, D.K.; formal analysis, D.K. and D.P.; investigation, D.K., A.K.D., G.S., G.L., D.P. and A.B.-C.; writing—original draft preparation, D.K.; writing—review and editing, D.K., D.P. and J.J.; visualization, D.K.; supervision, D.K.; project administration, D.K.; funding acquisition, D.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by National Center for Research and Development (project No. LID-ER/41/0206/L-12/20/NCBR/2021) and PL-Grid infrastructure (Prometheus, ACCCYFRONET, AGH, project ID: drugdesign5).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vanhoenacker, P.; Haegeman, G.; Leysen, J.E. 5-HT₇ receptors: Current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 70–77. [[CrossRef](#)]
2. Naumenko, V.S.; Popova, N.K.; Lacivita, E.; Leopoldo, M.; Ponimaskin, E.G. Interplay between serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in depressive disorders. *CNS Neurosci. Ther.* **2014**, *20*, 582–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hauser, S.R.; Hedlund, P.B.; Roberts, A.J.; Sari, Y.; Bell, R.L.; Engleman, E.A. The 5-HT₇ receptor as a potential target for treating drug and alcohol abuse. *Front. Neurosci.* **2015**, *8*, 448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kim, J.J.; Khan, W.I. 5-HT₇ receptor signaling: Improved therapeutic strategy in gut disorders. *Front. Behav. Neurosci.* **2014**, *8*, 396. [[CrossRef](#)]
5. Stull, M.A.; Pai, V.; Vomachka, A.J.; Marshall, A.M.; Jacob, G.A.; Horseman, N.D. Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16708–16713. [[CrossRef](#)]
6. Cadirci, E.; Halici, Z.; Bayir, Y.; Albayrak, A.; Karakus, E.; Polat, B.; Unal, D.; Atamanalp, S.S.; Aksak, S.; Gundogdu, C. Peripheral 5-HT₇ receptors as a new target for prevention of lung injury and mortality in septic rats. *Immunobiology* **2013**, *218*, 1271–1283. [[CrossRef](#)]
7. Cinar, I.; Sirin, B.; Halici, Z.; Palabiyik-Yucelik, S.S.; Akpınar, E.; Cadirci, E. 5-HT₇ receptors as a new target for prostate cancer pathophysiology and treatment: An experimental study on PC-3 cells and FFPE tissues. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2021**, *394*, 1205–1213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Modica, M.N.; Lacivita, E.; Intagliata, S.; Salerno, L.; Romeo, G.; Pittalà, V.; Leopoldo, M. Structure-Activity Relationships and Therapeutic Potentials of 5-HT₇ Receptor Ligands: An Update. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 8475–8503. [[CrossRef](#)]
9. Guseva, D.; Wirth, A.; Ponimaskin, E. Cellular mechanisms of the 5-HT₇ receptor-mediated signaling. *Front. Behav. Neurosci.* **2014**, *8*, 306. [[CrossRef](#)]
10. Ye, D.; Xu, H.; Tang, Q.; Xia, H.; Zhang, C.; Bi, F. The role of 5-HT metabolism in cancer. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer* **2021**, *1876*, 188618. [[CrossRef](#)]
11. Gautam, J.; Banskota, S.; Regmi, S.C.; Ahn, S.; Jeon, Y.H.; Jeong, H.; Kim, S.J.; Nam, T.G.; Jeong, B.S.; Kim, A.J. Tryptophan hydroxylase 1 and 5-HT₇ receptor preferentially expressed in triple-negative breast cancer promote cancer progression through autocrine serotonin signaling. *Mol. Cancer* **2016**, *15*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Du, X.; Wang, T.; Wang, Z.; Wu, X.; Gu, Y.; Huang, Q.; Wang, J.; Xie, J. 5-HT₇ Receptor Contributes to Proliferation, Migration and Invasion in NSCLC Cells. *Onco Targets Ther.* **2020**, *13*, 2139–2151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Quintero-Villegas, A.; Valdés-Ferrer, S.I. Role of 5-HT₇ receptors in the immune system in health and disease. *Mol. Med.* **2020**, *26*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Albayrak, A.; Halici, Z.; Cadirci, E.; Polat, B.; Karakus, E.; Bayir, Y.; Unal, D.; Atasoy, M.; Dogrul, A. Inflammation and peripheral 5-HT₇ receptors: The role of 5-HT₇ receptors in carrageenan induced inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *715*, 270–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Kułaga, D.; Drabczyk, A.K.; Satała, G.; Latacz, G.; Rózga, K.; Plażuk, D.; Jaśkowska, J. Design and synthesis of new potent 5-HT₇ receptor ligands as a candidate for the treatment of central nervous system diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *227*, 113931. [CrossRef]
16. Vermeulen, E.S.; Schmidt, A.W.; Sprouse, J.S.; Wikström, H.V.; Grol, C.J. Characterization of the 5-HT₇ receptor. Determination of the pharmacophore for 5-HT₇ receptor agonism and CoMFA-based modeling of the agonist binding site. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5365–5374. [CrossRef]
17. Hogendorf, A.S.; Hogendorf, A.; Kurczab, R.; Satała, G.; Lenda, T.; Walczak, M.; Latacz, G.; Handzlik, J.; Kiec-Kononowicz, K.; Wierońska, J.M.; et al. Low-basicity 5-HT₇ Receptor Agonists Synthesized Using the van Leusen Multicomponent Protocol. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1444. [CrossRef]
18. Gillis, E.P.; Eastman, K.J.; Hill, M.D.; Donnelly, D.J.; Meanwell, N.A. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8315–8359. [CrossRef]
19. Smith, D.A. *Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicity of Functional Groups: Impact of Chemical Building Blocks on ADMET*; Drug Discovery; The Royal Society of Chemistry: London, UK, 2010; Chapter 2; pp. 61–98.
20. Kułaga, D.; Jaśkowska, J.; Satała, G.; Latacz, G.; Śliwa, P. Aminotriazines with indole motif as novel, 5-HT₇ receptor ligands with atypical binding mode. *Bioorg. Chem.* **2020**, *104*, 104254. [CrossRef]
21. Mattson, R.J.; Denhart, D.J.; Catt, J.D.; Dee, M.F.; Deskus, J.A.; Ditta, J.L.; Epperson, J.; Dalton King, H.; Gao, A.; Poss, M.A.; et al. Aminotriazine 5-HT₇ antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4245–4248. [CrossRef]
22. Chen, Z.; Cohen, M.P.; Fisher, M.J.; Gillig, J.R.; McCowan, J.R.; Miller, S.C.; Schaus, J.M.; Giethlen, B. N-(2-arylethyl) Benzylamines as Antagonists of the 5-HT₆ Receptor. EP1859798A1, 28 November 2007.
23. Cheng, Y.; Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108. [PubMed]
24. Flare, version 5, Cresset®, Litlington, Cambridgeshire, UK. Available online: <http://www.cresset-group.com/flare> (accessed on 2 May 2022).
25. *Schrödinger Release 2016-4: Maestro*; Schrödinger; LLC: New York, NY, USA, 2016.
26. Impellizzeri, A.A.R.; Pappalardo Basile, M.L.; Manfra, O.; Andressen, K.W.; Krobert, K.A.; Messina, A.; Levy, F.O.; Guccione, S. Identification of essential residues for binding and activation in the human 5-HT_{7(a)} serotonin receptor by molecular modeling and site-directed mutagenesis. *Front. Behav. Neurosci.* **2015**, *9*, 92. [CrossRef] [PubMed]
27. Wichur, T.; Godyń, J.; Góral, I.; Latacz, G.; Bucki, A.; Siwek, A.; Głuch-Lutwin, M.; Mordyl, B.; Śniecikowska, J.; Walczak, M.; et al. Development and crystallography-aided SAR studies of multifunctional BuChE inhibitors and 5-HT₆ R antagonists with β -amyloid anti-aggregation properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *225*, 113792. [CrossRef] [PubMed]
28. Luo, G.; Guenther, T.; Gan, L.; Humphreys, W.G. CYP3A4 Induction by Xenobiotics: Biochemistry, Experimental Methods and Impact on Drug Discovery and Development. *Curr. Drug Metab.* **2004**, *5*, 483–505. [CrossRef]
29. OECD. *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; Section 2*; OECD Publishing: Paris, France, 2013. [CrossRef]
30. Hedlund, P.B. The 5-HT₇ receptor and disorders of the nervous system: An overview. *Psychopharmacol.* **2009**, *206*, 345–354. [CrossRef]
31. Gregory, A.W.; Jakubec, P.; Turner, P.; Dixon, D.J. Gold and BINOL-Phosphoric Acid Catalyzed Enantioselective Hydroamination/N-Sulfonyliminium Cyclization Cascade. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4330–4333. [CrossRef]
32. Kułaga, D.; Jaśkowska, J.; Satała, G. Design, synthesis and biological evaluation of novel serotonin and dopamine receptor ligands being 6-bromohexyl saccharine derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 126667. [CrossRef]
33. Latacz, G.; Hogendorf, G.A.S.; Hogendorf, A.; Lubelska, A.; Wieronska, J.M.; Wozniak, M.; Cieslik, P.; Kiec-Kononowicz, K.; Handzlik, J.; Bojarski, A.J. Search for a 5-CT alternative. In vitro and in vivo evaluation of novel pharmacological tools: 3-(1-alkyl-1H-imidazol-5-yl)-1H-indole-5-carboxamides, low-basicity 5-HT₇ receptor agonists. *Med. Chem. Comm.* **2018**, *9*, 1882–1890. [CrossRef]
34. Latacz, G.; Lubelska, A.; Jastrzebska-Wiesek, M.; Partyka, A.; Kucwaj-Brysz, K.; Wesółowska, A.; Kiec Kononowicz, K.; Handzlik, J. MF-8, a novel promising arylpiperazine-hydantoin based 5-HT₇ receptor antagonist: In vitro drug-likeness studies and in vivo pharmacological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 878–883. [CrossRef]
35. Latacz, G.; Lubelska, A.; Jastrzebska-Więsek, M.; Partyka, A.; Sobilo, A.; Olejarz, A.; Kucwaj-Brysz, K.; Satała, G.; Bojarski, A.J.; Wesółowska, A.; et al. In the search for a lead structure among series of potent and selective hydantoin 5-HT₇R agents: The drug-likeness in vitro study. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *90*, 1295–1306. [CrossRef]

D06. **Damian Kułaga**, Jolanta Jaśkowska, Grzegorz Satała, Gniewomir Latacz, Paweł Śliwa –
Aminotriazines with indole motif as novel, 5-HT₇ receptor ligands with atypical binding mode,
Bioorg. Chem. **2020**, 104, 104254 IF*=5.321



Aminotriazines with indole motif as novel, 5-HT₇ receptor ligands with atypical binding mode



Damian Kułaga^{a,*}, Jolanta Jaśkowska^a, Grzegorz Satała^b, Gniewomir Latacz^c, Paweł Śliwa^a

^a Faculty of Chemical Engineering and Technology, Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, 24 Warszawska Street, 31-155 Kraków, Poland

^b Department of Medicinal Chemistry, Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 12 Smętna Street, 31-343 Kraków, Poland

^c Department of Technology and Biotechnology of Drugs, Jagiellonian University Medical College, 9 Medyczna Street, 30-688 Kraków, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Drug design
Microwave chemistry
Medicinal chemistry
Docking
Molecular dynamics
5-HT₇R ligands

ABSTRACT

Developing new and selective 5-HT₇R ligands may have a key impact on the treatment of central nervous system diseases including depression. We have found that indoleaminotriazine core fused with alkyl aryl moiety exhibits high affinity and selectivity to 5-HT₇R. SAR analysis demonstrated that the ethyl or ethoxy group (**5c** 5-HT₇R K_i = 8 nM; **5d** 5-HT₇R K_i = 55 nM) is the optimal carbon linker between triazine and aryl moiety. The results of the molecular dynamics simulations show stable interaction with E7.34 upon binding to a 5-HT₇R. Compounds **5c** and **5d** were tested for early ADMET parameters. Compounds are not hepatotoxic and exhibit moderate potential interaction with other drugs metabolized by CYP3A4 or CYP2D6.

1. Introduction

Depression is a common mental disorder, with key symptoms including lowered mood, anxiety, decreased energy, feeling guilty or low self-esteem, loss of motivation or ability to experience pleasure (anhedonia), suicidal ideation, etc. [1]. In the near future, depression will become one of the most common diseases leading to the destabilization of human life, and it is estimated to be the most frequently occurring disease by 2030 [1]. Commonly available antidepressant drugs exhibit a wide number of adverse effects and as many as 30% of patients do not respond to treatment. Therefore, the need for further research into antidepressants is justified [2],[3]. Early studies of some antipsychotics and antidepressants revealed their high affinity for the 5-HT₇ receptor (5-HT₇R); and due to its distribution in particular areas of the brain it was proposed that this receptor might play a role in psychological disorders and other CNS pathologies [4]. Forced swim test and tail suspension test demonstrated that inhibition of the 5-HT₇R synergistically enhances effects of antidepressants used in clinical settings [5], [6]. Currently known representatives of 5-HT₇R ligands include long arylpiperazine [7], ergoline [8], apomorphine [9], indoleimidazole [10], (Fig. 1). Despite their high activity toward the 5-HT₇R, the compounds exhibit affinity to other types of 5-HT receptors as well. For example, a compound with biological activity antagonist such as DR4004 (with pharmacological profile: 5-HT_{1A}R K_i = 200 nM;

5-HT₆R K_i = 524 nM; 5-HT₇R K_i = 2.13 nM; D₂R K_i = 104 nM; H₁R K_i = 125 nM) [7],[11] is used in *in vitro* or *in vivo* evaluations, although considered 'selective,' to a greater or lesser extent exhibit affinity for other receptors [6].

In 2001, Bristol-Myers patented 3 series of derivatized analogues of 1-phenylethylamine with diaminotriazine (Fig. 2), diaminopyrimidine, and diaminopyridine cores [12]. Such compounds exhibited exceptionally high affinity only for the 5-HT₇R (K_i < 50 nM) and behaved as antagonists. An extended pharmacological profile for the most active ligands revealed, however, moderate affinity against 5-HT₆R and α_1 R with K_i = 100–380 nM. Three years later, these results were published [13], and to date, no mention of further research on these ligands has been made. Three distinguishable elements (two alkyl aryl moieties and triazine core) are found in the structures of these compounds. In docking study, Kołaczowski et al. [14], proposed a model in which one protonated nitrogen atom in the triazine core interacted with aspartic residues (D3.32) by the formation of salt bridge (Fig. 3). Additionally, the hydrogen bond formation between D3.32 and secondary amine group attached to the triazine moiety were observed as well. It was also suggested that phenyl or phenoxy rings may interact with phenylalanine (F3.28) and arginine (R7.36) through π - π stacking and ion- π interactions (Fig. 3) [14]. In the initial studies, molecules were poorly bioavailable (oral bioavailability %F₀ of approximately 12%), which was subsequently improved to the level of almost 60% by the

Abbreviations: ACN, acetonitrile; TBAB, tetrabutylammonium bromide; TEAC, tetraethylammonium chloride

* Corresponding author.

E-mail address: damian.kulaga@doktorant.pk.edu.pl (D. Kułaga).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104254>

Received 29 May 2020; Received in revised form 21 July 2020; Accepted 27 August 2020

Available online 02 September 2020

0045-2068/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

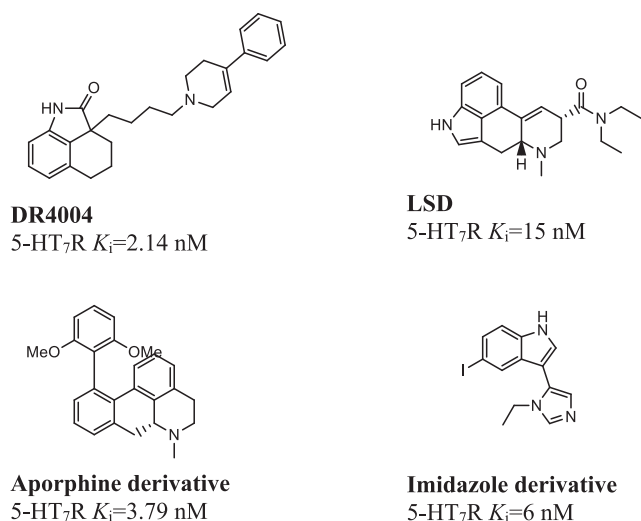


Fig. 1. Examples of known active 5-HT₇R ligands [7,8,9,10].

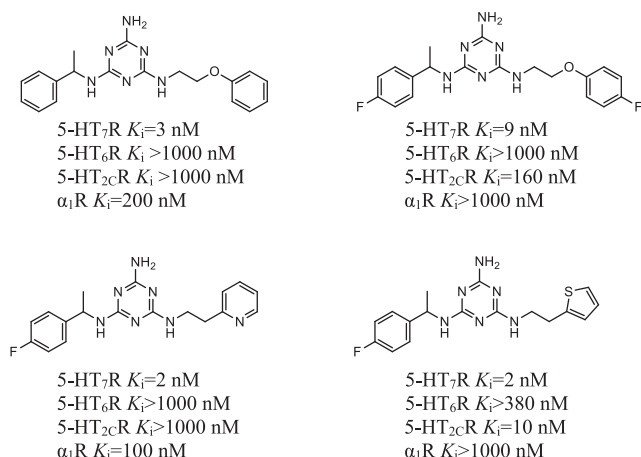


Fig. 2. Examples of known selective 5-HT₇R aminotriazine ligands developed by Bristol-Myers [13].

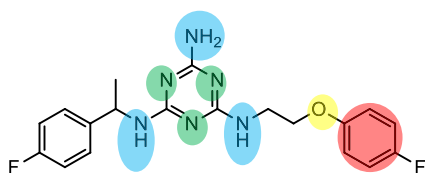
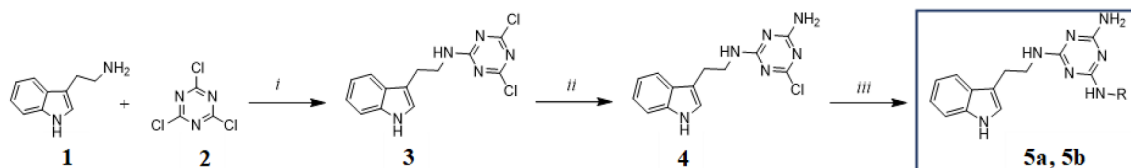


Fig. 3. Hypothetical interactions in lead compound proposed by Kołaczowski et al. [14]. Green area – possible salt bridge (with D3.32), blue area – possible hydrogen bond (with D3.32), yellow area – possible ion- π interaction (with R7.36), red area – possible π - π stacking (with F3.28). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Scheme 1. Synthetic pathway for new compounds similarly to the original procedure [13], *i* – THF, DIPEA, $-5-0$ °C, 30 min, 87% yield; *ii* – THF, ammonia solution, rt, 24 h, 92% yield; *iii* – THF, DIPEA, R-NH₂ (for **5a** R = Me; for **5b** R = benzyl; 5 eq.), reflux, 24–48 h.

introduction of a fluorine atom. The researchers ceased the studies at this stage and did not describe any significant issues related to synthesis, toxicity, or stability of the compounds.

On the other hand, many ligands containing an indole or substituted indole moiety exhibit high affinity for serotonin receptors due to high structural similarity to serotonin [10,15,16,17]. Encouraged by the fact that aminotriazine derivatives are not particularly tested for their affinity to serotonin or dopamine receptors, we initiated preliminary research and design of new molecules with indole triazine scaffold. At the designing stage, molecular modeling including docking and molecular dynamics (MD) techniques were utilized. Novologues were synthesized in eco-friendly, *solvent-free* microwave-assisted protocol. Then bioactivity, including radioligand binding and ADME-Tox (drug-drug interactions, hepatotoxicity, metabolic pathways and BBB penetration), were evaluated.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

At the beginning of this study, compounds **5a** and **5b** were obtained *via* the original procedure described by Mattson R. J. et al. [13]. Ligands were obtained in a three-step *N*-alkylation reaction (Scheme 1). In the first reaction, tryptamine **1** was alkylated by cyanuric chloride **2**. To avoid formation of by-products, the reaction temperature was maintained at $-5-0$ °C, with a slow addition of cyanuric chloride **2**. The second step relied on chlorine atom substitution by an amino group *via* reaction with an ammonia solution. The reaction was carried out at room temperature. The third step was *N*-alkylation of an appropriate amine. To improve the reaction yield, excess of amine up to 5 equivalents was highly recommended. THF was used as a solvent for this reaction, and the mixture was refluxed for 24–48 h. The yields for new ligands exceeded 50% (Table 1). The reaction was controlled *via* HPLC/TLC, and a crude product was purified using column chromatography.

Considering our previous achievement in the field of *green chemistry* [18–20], we attempted to synthesize the same ligands in *solvent-free* reactions supported *via* microwave irradiation to explore the possibility to obtain such compounds using milder conditions. In the case of aminotriazines, this approach has not been studied so far. Intermediate **4** was used as a starting material. Preparation of the compounds **5a** and **5b** was conducted according to our previously described procedure [18]. The synthesis time was 3 min, with microwave power of 50 W. As per the requirements of the *solvent-free* procedure, we eliminated toxic solvent as a THF and instead used 1–5% wt. (all of the amount in the reaction mixture) of DMF or ACN or water which only served as a factor to transfer microwave energy [18],[21]. Because reagents were in thermodynamically different phases, using PTC (Phase Transfer Catalyst) facilitated their passing to one single phase and allowed reaction occurrence. Therefore, various PTCs as well as bases (form reaction environment) were used (Table 2). The reaction was monitored by HPLC/TLC, and the crude product was purified using column chromatography. According to Table 2, new compounds can be obtained under milder conditions than those required by the original procedure [13]. We have demonstrated that it is possible to shorten reaction times from

Table 1

Product content in the reaction mixture and yield after purification of new ligands, obtained according to conventional synthesis [13].

Ligand No	Product content [%]	Yield [%]
5a	42	53
5b	45	59

48 h to 3 min and reduce amine excess to 3 eq. or even 1 eq. The best conditions for the synthesis of new ligands are: 3% wt. in the reaction mixture of DMF as a microwave energy transferring factor, potassium carbonate as a base and TBAB as a PTC. Under these conditions, reaction mixture contained 96% (Reaction No. 1) and 95% (Reaction No. 9) for **5a** and **5b**, respectively, of the product by HPLC. Exchange of DMF to water, or complete solvent elimination for **5a** caused the product content to drop down to 52% (Reaction No. 3) and 62% (Reaction No. 4), respectively. This approach facilitates the utilization of post-reaction wastes and allows for reduction of synthesis costs. The procedure is also more economical and safer for the environment. Having determined the most favorable conditions, we synthesized the designed compounds (Scheme 2). The overall yield was > 75% of hydrochloride salt (see details in the Experimental section). The structure and purity of novel compounds were confirmed within analytical data described in Experimental section.

2.2. Radioligand binding and SAR

All obtained compounds have been tested in *in vitro* assays to determine the affinity for selected serotonin and dopamine receptors. According to a known procedure [10], the assays were performed via the displacement of the respective radioligands from cloned human receptors, all stably expressed in HEK293 cells (except for 5-HT_{2A}R which was expressed in CHO cells): [³H]-8-OH-DPAT for 5-HT_{1A}R, [³H]-ketanserin for 5-HT_{2A}R, [³H]-LSD for 5-HT₆R, [³H]-5-CT for 5-HT₇R and [³H]-raclopride for D₂R. The results are presented in Table 3.

The aim of the initial research was to find general key functional groups taking part in 5-HT₇R binding. The R and R₁ positions were examined. According to Table 3, the presence of an amino group (R₁) is one of the important factors responsible for binding. Because of the presence of amine group instead of chlorine atom, ligand **5c** (K_i = 8 nM) is > 12 000 times potent than **6b** (K_i > 100,000 nM). Although **5a** (K_i = 13410 nM) and **6a** (K_i > 100,000 nM) are not active toward 5-HT₇R, the presence of the -NH₂ group caused about 8-fold increase of affinity in case of the compound **5a**, which is additional evidence that this group as one of the key groups responsible for binding. Such results are consistent with molecular models, where -NH₂ strongly and stably interacts with E7.34. However, the NH₂ substituent is not the only factor affecting affinity to 5-HT₇R. The second crucial factor is the presence of the aryl alkyl group in the R

Table 2

Investigation of appropriate synthesis conditions used in the microwave synthesis. Product content in the reaction mixture and yield after purification.

Reaction No.	Ligand	Energy transfer factor %wt	Base	PTC	Amine amount [eq.]	Product content [%]	Yield [%]	
1	5a	DMF	3	K ₂ CO ₃	TBAB	3	96	86
2	5a	ACN	3	K ₂ CO ₃	TBAB	3	93	75
3	5a	water	3	K ₂ CO ₃	TBAB	3	52	37
4	5a	DMF	-	K ₂ CO ₃	TBAB	3	62	48
5	5a	DMF	3	K ₂ CO ₃	TBAB	1	70	78
6	5a	DMF	3	NaOH	TBAB	3	63	43
7	5a	DMF	3	Et ₃ N	TBAB	3	58	35
8	5a	DMF	3	K ₂ CO ₃	TEAC	3	65	51
9	5b	DMF	3	K ₂ CO ₃	TBAB	3	95	80
10	5b	ACN	3	K ₂ CO ₃	TBAB	3	90	84
11	5b	DMF	3	K ₂ CO ₃	TBAB	1	81	75

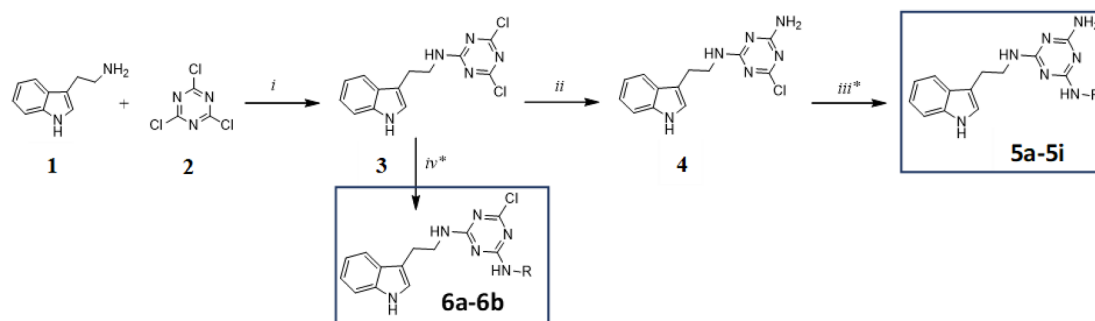
position. Ligand **5b** (K_i = 709 nM) with benzyl group is about 19 times more potent than **5a** but extension of benzyl by an extra -CH₂- group rendered the affinity of the ligand **5c** (K_i = 8 nM) to be 88 and 1600 times higher than the affinity of ligands **5b** and **5a**, respectively. In line with the structure of **5d** (K_i = 55 nM), the introduction of oxygen atom to the ethyl chain resulted in slight (about 9 times) loss of affinity. Further elongation of ethyl chain to propyl and butyl resulted in further loss of affinity to K_i = 243 nM for **5e** and K_i = 1036 nM for **5f**. Introduction of a bulky naphthyl group (**5g**, K_i = 537 nM) in the position of the phenyl group (**5c**, K_i = 8 nM) decreased the affinity to 5-HT₇R. Surprisingly, simultaneous elongation of ethyl chain to propoxy (**5h**) and butoxy (**5i**) caused the increase of activity to 5-HT₆ receptor. Designed ligands exhibit very low affinity for D₂, 5-HT_{1A}, and 5-HT_{2A} receptors.

2.3. CNS MPO calculation

Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) is one of the most commonly used parameters that can predict whether test compounds will exhibit drug-like properties. For all synthesized compounds, CNS MPO has been calculated according to the procedure described by Wager et al. [22], based on logP, logD, TPSA, MW, HBD and pKa values. We found that for active ligands **5c** and **5d**, the CNS MPO score exceeded 3.5. Elongation of carbon linker, and/or introduction of bulky naphthyl substituent resulted in a decrease of the CNS MPO score. According to Wager's theory, compounds with the CNS MPO score higher than 3.5 may exhibit high CNS drugability. It is worth mentioning that CNS MPO for original Bristol-Myers compounds [13], is around 4.0, which is close to the compounds described in this paper (Table 3).

2.4. Molecular modeling

The postulated binding mode of original Bristol-Myers compounds, which are 1-phenethyl derivatives, has been described in the introduction [14]. The typical feature for binding to the 5-HT₇R (and other serotonin receptors) is the formation of strong salt bridge between the positive ionized nitrogen atom and D3.32 as well as other interactions such as hydrogen and halogen bonds or hydrophobic bonds [23]. In this study, we decided to elucidate the activity of new indoleaminotriazine derivatives based on the model proposed by Kołaczowski et al. [14], as well as assess salt bridge parameters as a key binding for aminergic GPCRs. The homology model of the 5-HT₇R was built based on 5-HT_{1B}R crystal structure, co-crystallized with the antagonist methiothepin (PDB ID: 5V54), using Swiss-Model server [31]. The model was then optimized based on the structure of the known and active aminotriazines [14], using the Induced Fit Docking protocol (IFD) from the Schrödinger suite [24]. Next, the compounds **5b-d** and **6b** were docked in flexible mode also using the IFD protocol. Hogendorf et al. [10], suggested that indole nucleus moiety is located near TMH6



Scheme 2. Synthetic pathway for new compounds. *i* – THF, DIPEA, –5–0 °C, 30 min, 87% yield; *ii* – THF, ammonia solution, rt, 24 h, 92% yield; *iii** – DMF, K₂CO₃, TBAB, amine – R-NH₂ (3 eq.), MW (50 W), 2.5 min; *iv** – DMF, K₂CO₃, TBAB, amine – R-NH₂ (3 eq.), MW (50 W), 2.5 min.

and interacts with F6.51 or F6.52 which is convergent with Kolačzkowski et al.'s hypothesis [25]. Based on this data the chosen poses were then optimized using QM/MM calculation to full optimization of the ligand-receptor complex. Results showed that the binding site was divided into two pockets (Fig. 4). The indole-binding pocket is hydrophobic and located deeper in the receptor, where indole ring binds preferentially in the cavity between TMH3, TMH5 and TMH6 helices forming CH- π type interactions with F5.47, W6.48, F6.51 or F6.52. The alkylaryl moiety is placed in the cavity between TMH2 and TMH7 helices (Fig. 4, Fig. 5).

The postulated general binding mode was closely similar to that reported in the literature [10],[25]. By analyzing a dozen docked poses for considered ligands (5b–d) we established a frequently occurring hydrogen bond between E7.34 and a free amine substituted to C6 of the triazine core. The mean donor-acceptor bond length ranged between 2.5 and 3.0 Å. Characteristically for 5-HT₇R ligands, the salt bridge with D3.32 was formed with nitrogen substituted to C4 of triazine ring. The hydrogen bond between S5.43 and indole nitrogen was observed as well (Fig. 5A). Interestingly, very similar binding mode was adopted by an inactive ligand 6b (Fig. 5D). However, in this case, we observed the lack of indole moiety interaction with aromatic residues from TMH6. Based on the above, we hypothesized that key interaction for the binding to 5-HT₇R of triazine-based ligands was the hydrogen bond with E7.34. Considering that the replacement of NH₂ by Cl atom dramatically decreased affinity to the receptor, we decided to explore the importance of salt bridge with D3.32 and/or H-bond with E7.34 by means of molecular dynamics (MD) simulations. For molecular dynamics studies, as a starting structure, for each active ligand 5b, 5c and

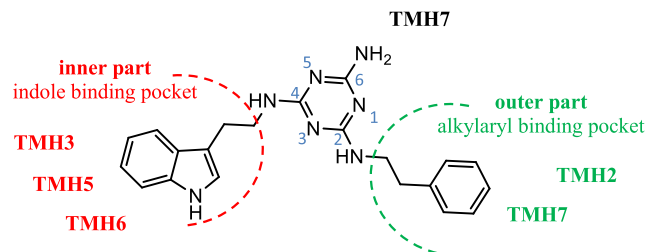
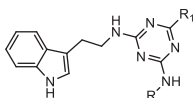


Fig. 4. Postulated binding sites for new ligands. Red dotted line represents part of the molecule in the inner region of 5-HT₇R, located near TMH3, TMH5 and TMH7. Green dotted line represents part of the molecules in the outer region of 5-HT₇R located between TMH2 and TMH7. Amino group at C6 position is located near TMH7. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

5d, we selected three similar poses from previous IFD. In the case of inactive 6b only top conformation was used. After phospholipid membrane building, adding water and salt molecules, the 100 ns MD simulations were performed using Desmond from Schrödinger suite [26]. In a series of nine simulations, ligands 5b–d formed stable hydrogen bond *via* NH₂ group of a triazine ring with deprotonated oxygen of E7.34. For example, in the case of 5d, analyzing the O–N distance during 100 ns of simulation, we observed its significant shortening up to 3.0 Å. According to Fig. 6, the initial value of the angle formed between one hydrogen of the NH₂ group oscillated around 150°, then decreased to 120° and then to 90°, and finally reached about 45°. The angle value between the second hydrogen of the NH₂ group was exactly

Table 3

Affinity of novel compounds for 5-HT₇ receptor. Constant K_i in [nM]. CNS MPO parameters were calculated according to Wager et al. [22], procedure.



Ligand No	R	R ₁	D ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT ₆	5-HT ₇	CNS MPO
5a	-Me	-NH ₂	nt	nt	nt	nt	13,410 ± 2716	4.6
5b	-(CH ₂) ₂ -Ph	-NH ₂	10370 ± 1248	22960 ± 3945	4143 ± 719	2511 ± 338	709 ± 112	4.0
5c	-(CH ₂) ₂ -Ph	-NH ₂	11490 ± 1643	2836 ± 131	1388 ± 163	665 ± 94	8 ± 3	3.8
5d	-(CH ₂) ₂ -O-Ph	-NH ₂	6428 ± 515	8047 ± 1689	1352 ± 288	530 ± 42	55 ± 7	3.7
5e	-(CH ₂) ₃ -O-Ph	-NH ₂	4607 ± 354	19050 ± 4731	1515 ± 253	1148 ± 172	243 ± 32	3.4
5f	-(CH ₂) ₄ -O-Ph	-NH ₂	5391 ± 724	64700 ± 14573	758 ± 96	1529 ± 287	1036 ± 198	3.0
5g	-(CH ₂) ₂ -Naphthyl	-NH ₂	6386 ± 831	12550 ± 2259	5590 ± 1225	895 ± 61	537 ± 76	2.6
5h	-(CH ₂) ₃ -O-Naphthyl	-NH ₂	7319 ± 1157	16640 ± 3872	5124 ± 772	785 ± 49	2863 ± 411	2.2
5i	-(CH ₂) ₄ -O-Naphthyl	-NH ₂	11020 ± 2172	45280 ± 8347	5330 ± 841	373 ± 22	2851 ± 315	1.7
6a	-Me	-Cl	nt	nt	nt	nt	> 100,000	4.0
6b	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Cl	nt	nt	nt	nt	> 100,000	3.5

nt – not tested. Each compound was tested in triplicate at 7 concentrations (0.1 nM–100 μM). The inhibition constants (K_i) were calculated from the Cheng-Prusoff equation [47]. Results were expressed as means of at least two separate experiments ± standard deviation (SD).

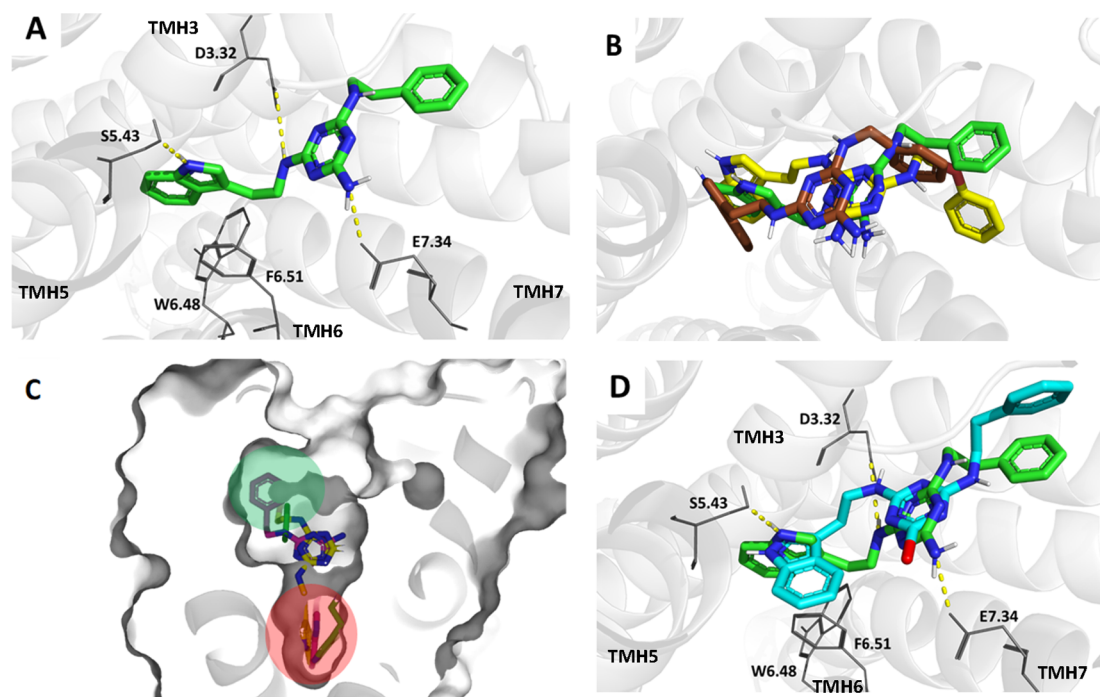


Fig. 5. Docking results. Yellow dotted lines represent hydrogen bonds. **A** – Binding mode for **5c** in 5-HT₇R; **B** – The imposition of **5b**, **5c**, **5d** in 5-HT₇R (**5b** = brown; **5c** = green; **5d** = yellow); **C** – Binding site and two binding pockets for **5b**, **5c**, **5d** in 5-HT₇R (**5b** = brown; **5c** = green; **5d** = yellow). Green circle – alkylaryl binding pocket, red circle – indole-binding pocket; **D** – The imposition of compounds **5c** (green, active) and **6b** (cyan, inactive) in 5-HT₇R. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

opposite. Namely, in the initial phase of the simulation, the hydrogen bond participated with one hydrogen and then rotated and interacted with the other one. The geometry of the hydrogen bond was fully consistent with the values reported in the literature [27]. Geometrical parameters for interactions between E7.34 and active/inactive ligands over the simulations are listed in Table 4.

Surprisingly, analyzing MD results, we observed lack of a stable salt bridge with D3.32 during whole simulations for all considered ligands. For example, in **5c**, what is illustrated in Fig. 7, initially the salt bridge was preserved but after few nanoseconds was broken and it remained to be unstable.

Finally, after clustering of molecular dynamics trajectories, we received the most representative structures of ligand-receptor complexes for **5b–d** (Fig. 8). Similarly to after docking, ligands adopted extended conformation, where indole-binding pocket was located in the inner part of a receptor, and alkyl aryl binding pocket was placed on the outer part of the receptor. All ligands interacted with F6.51 residue via hydrophobic bond with indole moiety. However, the key interaction seemed to be a stable hydrogen bond between E7.34 and amine substituent of triazine ring. Additionally, for **5d** and **5b**, interactions with D2.64 or with R6.58, R7.35 were observed, respectively.

Although the formation of a salt bridge with D3.32 residue seems to

Table 4

Characterization of hydrogen bonds between E7.34 residue and amino group attached to triazine core during molecular dynamics simulations.

Ligand No.	5-HT ₇ K _i [nM]	RMSD	% interaction	Mean O-N distance [Å]	Mean OHN angle [°]
5c	8	1.0	93%	3.2	154
		0.7	97%	3.0	113
		1.6	81%	3.0	167
5d	55	1.8	68%	3.1	153
		1.5	70%	3.0	162
		1.0	73%	3.2	157
5b	709	1.2	97%	4.2	140
		2.5	69%	4.4	140
		1.3	59%	4.1	125
6b	> 1,000,000	2.4	–	–	–

be required for binding to 5-HT₇R, literature reports of interactions without the said salt bridge are available. Harris et al. [28], described that in the case of non-basic 5-HT₆R ligands the key salt bridge with D3.32 residue has no significant influence on the affinity to the ligands. On the other hand, Wang et al. [29], described that the role of D3.32 residue in an antagonistic mode for 5-HT_{1A}R is irrelevant. An

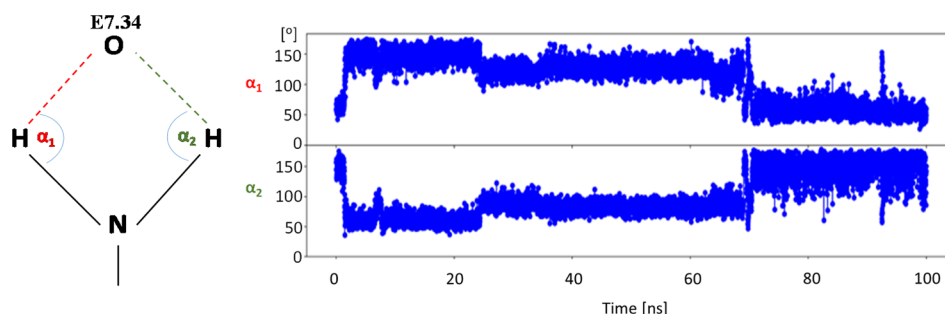


Fig. 6. Angle fluctuations between E7.34 and amino group of triazine core for **5d**.

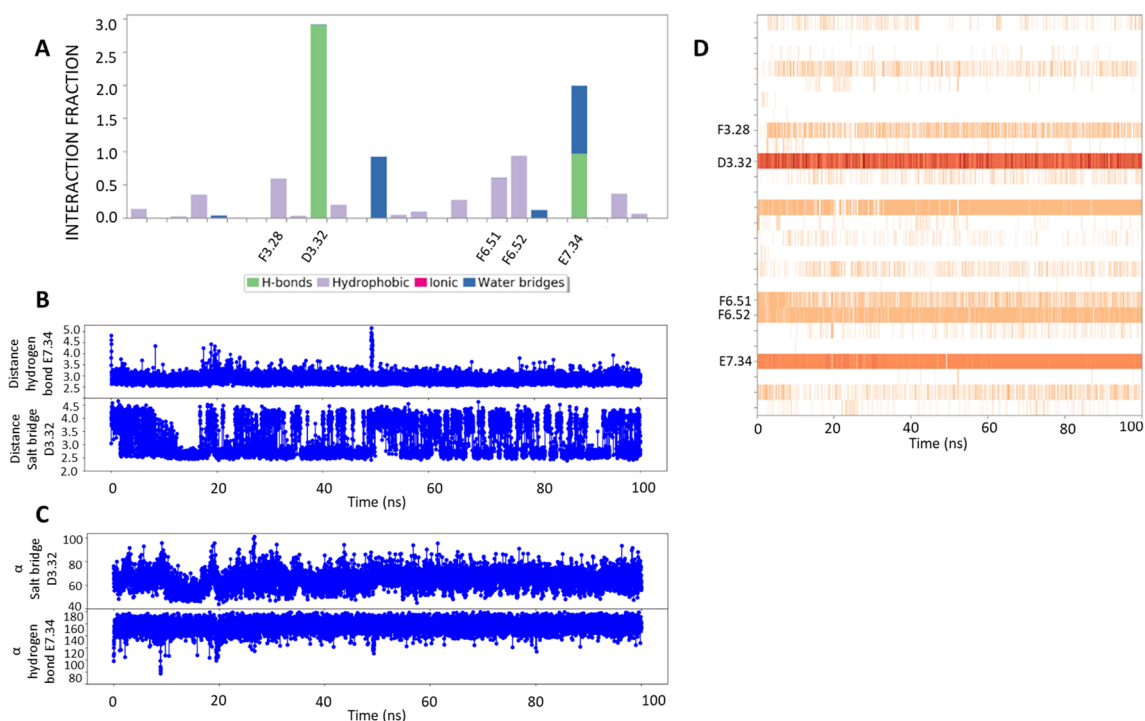


Fig. 7. Characterization of **5c** in molecular dynamics. **A** – participation of various interaction types with amino acids in ligand-protein complex; **B** – length changes in interaction with E7.34 and D3.32; **C** – angle changes in interactions with E7.34 and D3.32; **D** – interaction fingerprint during 100 ns simulations.

interesting study was published by Levy et al. [30]. A mutagenesis study revealed key amino acids involved in 5-CT (agonist) and SB269970 (antagonist) binding to 5-HT₇R, namely E7.34, R7.36 and Y7.43, with R8.52 being a significant amino acid taking part in the G-protein activation. To define physicochemical features (related to physicochemical properties of mutated amino acids) of a binding cavity located in TMH7, point mutations of E7.34 residue were introduced. Levy et al. [30], found that tested ligands bearing E7.34D mutation

maintain their high affinity to the receptor. Mutations of E7.34R and E7.34T resulted in loss of activity to all ligands, while E7.34A mutation resulted in loss of activity to agonist only. Based on the MD simulations, we hypothesized that the designed ligands do not tend to form a stable interaction with D3.32 residue, and may form a strong hydrogen bond with E7.34 residue. This hypothesis can be confirmed, inter alia, by reports of Harris et al. [28], or Wang et al. [29], and the above-referenced study described by Levy et al. [30]. However, to confirm this

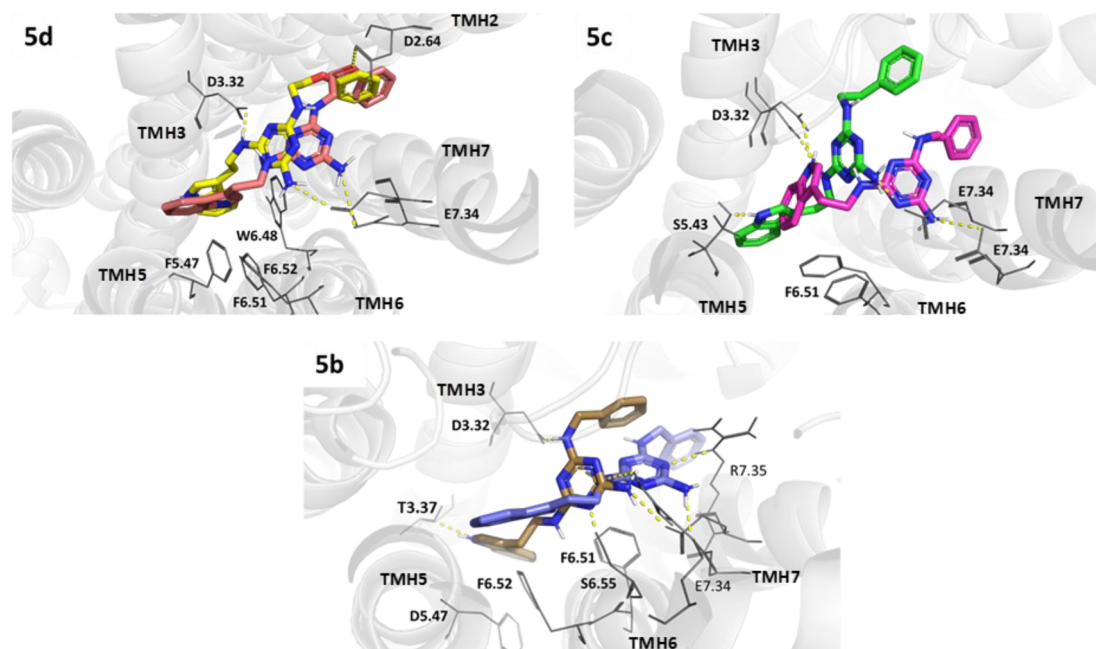


Fig. 8. The most common binding modes generated after clustering (MD) aligned to docking poses with a key amino acid residues. Brown **5b** ligand chosen from docking and blue one chosen from MD clustering. Green **5c** ligand chosen from docking and magenta one chosen from MD clustering. Yellow **5d** ligand chosen from docking and red one chosen from MD clustering. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

hypothesis, further experimental research should be performed.

2.5. Preliminary pharmacokinetics study

Considering Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity (ADME-Tox) is crucial in stepping from hit identification to lead generation, and only drug candidates that fulfill all ADME-Tox criteria may become medically usable in the future [32]. At the beginning stage of indoleaminotriazines research, we decided to examine early ADME-Tox parameters *in vitro*. Up to date, in the literature there have been no reports on ADME-Tox properties for indoleaminotriazines acting on CNS, thus investigation in this field is justified. ADME – *in silico* parameters (Table 3) preliminarily indicated that novel compounds may have drug-like properties, therefore, we decided to confirm this in experimental stages. Thus, compounds **5c** and **5d** were subjected to preliminary pharmacokinetic studies.

2.5.1. Blood-brain barrier

The anatomy of the BBB is very complex, and its existence protects CNS from external adverse chemical factors. Designing small molecules that penetrate the BBB and achieve optimal concentration in the target area of the brain is very challenging for medicinal chemists [33]. Initial study about BBB penetration was considered in PAMPA model to assess the ability of a molecule for passive diffusion through biological membranes. The experiment consisted of measuring how much of the test compounds (**5c** and **5d**) passed through the artificial membrane from donor wells (D1) to acceptor wells (A1) in a period of time. According to UPLC-MS analysis (Fig. 9), after 5 h of incubation, we did not observe the analyzed compounds in acceptor wells. In conclusion, no passive transport of tested compounds was observed under *in vitro* conditions. Further study needs to be performed to improve passive transport through the membrane.

2.5.2. Drug – drug interactions

Possible drug – drug interactions (DDI) are associated with CYP450 enzyme system. The majority of common drugs, including antidepressants, are metabolized through CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 and a few other cytochromes. A potential drug candidate may be an inhibitor or inducer of CYP450 (and its subenzymes) [34]. In our study we used luminescence-based CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9 P450-Glo™ assays (Promega®), which measure the influence of compounds on the CYP-mediated reaction of pro-luciferin into luciferin. We have found that **5c** and **5d** may exhibit moderate drug – drug interactions with CYP3A4 ($IC_{50} = 0.14 \mu\text{M}$ for reference KE and $IC_{50} = 6.4 \mu\text{M}$ for **5c**/

$IC_{50} = 5.9 \mu\text{M}$ for **5d**). Tested compounds exhibit also moderate DDI with CYP2D6 ($IC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$ for reference QD and $IC_{50} = 14.61 \mu\text{M}$ for **5c**/ $IC_{50} = 11.71 \mu\text{M}$ for **5d**). Unfortunately **5c** and **5d** exhibit high DDI with CYP2C9 ($IC_{50} = 0.11 \mu\text{M}$ for reference QD and $IC_{50} = 0.82 \mu\text{M}$ for **5c**/ $IC_{50} = 0.99 \mu\text{M}$ for **5d**) where possible drug-drug interactions may be observed. The results were described in Fig. 10.

2.5.3. Metabolic stability

The UPLC analysis of **5c** after 120 min incubation with mouse liver microsomes (MLMs) indicated that only 17.36% of the parent compound **5c** remained in the reaction mixture (Fig. 11A). A similar situation was also observed in **5d**. After incubation with MLMs, only 21.57% of the parent compound **5d** remained in the reaction mixture (Fig. 11B). The obtained results indicated that tested compounds were unstable. Based on MS spectral analyzes (in Appendix A), we identified 11 and 13 possible metabolites for compounds **5c** and **5d**, respectively. Using MetaSite ver. 6.0.1., potential sites with susceptibility to enzymes, leading to bioconversion to various metabolites, were marked and are shown on Fig. 12. The proposed main metabolic pathways are presented in Tables 5 and 6.

2.5.4. Hepatotoxicity

The liver is the first line of defense against xenobiotics. The evaluation of hepatotoxicity at an early stage is crucial in the context of the subsequent design of indoleaminotriazine compounds, as it allows to eliminate compounds that may lead to drug-induced liver injury [35]. In our study, we used hepatoma HepG2 cell line to evaluate hepatotoxicity. Ligands **5c** (Fig. 13A) and **5d** (Fig. 13B) do not exhibit hepatotoxic properties in the range concentration of 1–50 μM . Using concentration of 1–10 μM , the viability of cells exceeded 95%. In 50 μM , the viability was slightly lower and amounted to up to 80%. In the concentration of 100 μM , the compounds exhibited statistically significant hepatotoxic properties.

3. Conclusion

The aim of the study was to design, synthesize and evaluate biological properties of novel indoleaminotriazine derivatives. Due to the importance of the 5-HT₇R in CNS disorders, we focused mainly on this receptor. To check selectivity, we performed radioligand binding assay to 5-HT_{1A},

5-HT_{2A}, 5-HT₆ and D₂ receptors. We proved that compounds may be obtained in a rapid, eco-friendly method *via solvent-free* reactions

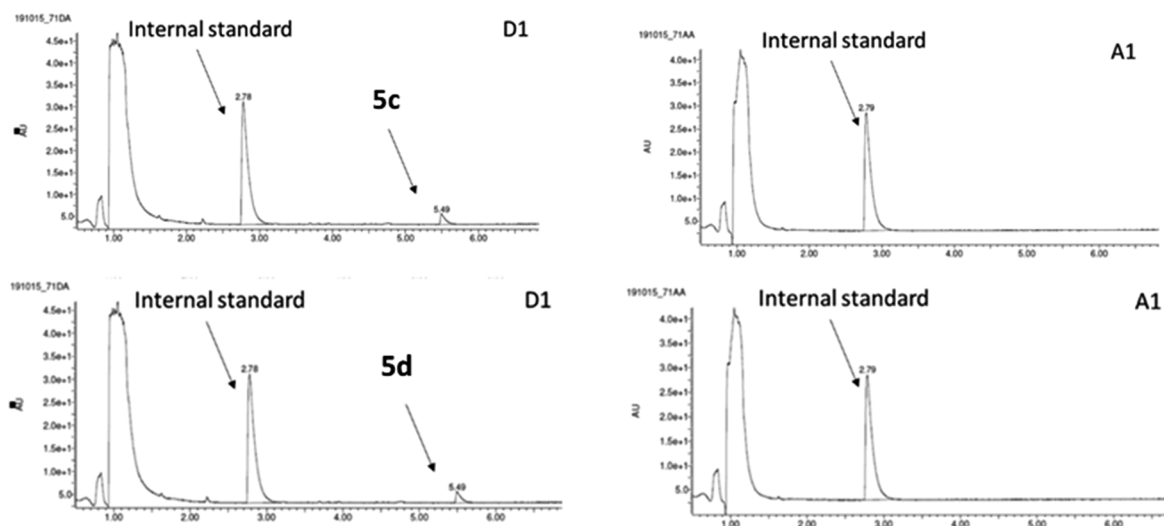


Fig. 9. The UPLC analyses of **5c** and **5d** and IS from donor (D) and acceptor (A) wells after 5 h incubation.

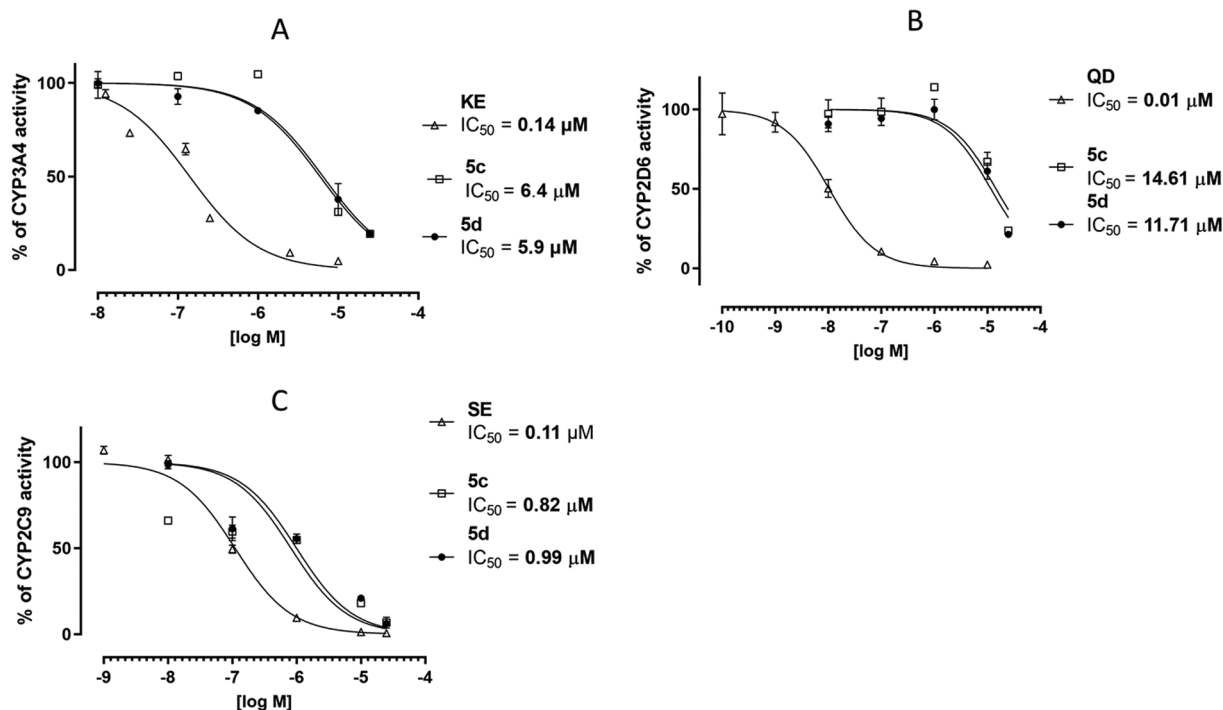


Fig. 10. A – The effect of reference drug ketoconazole (KE) and tested compounds on CYP3A4 activity; B – The effect of reference drug quinidine (QD) and tested compounds on CYP2D6 activity; C – The effect of reference drug sulfaphenazole (SE) and tested compounds on CYP2C9 activity.

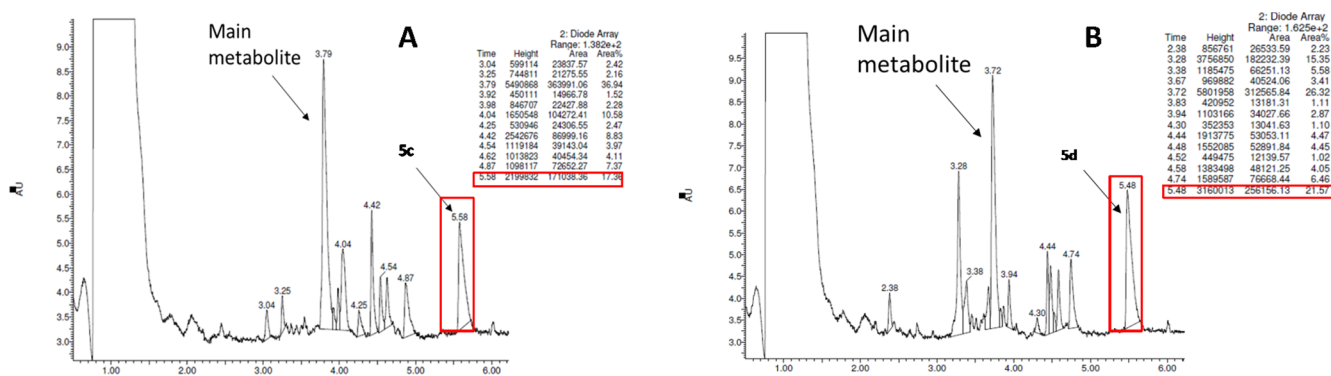


Fig. 11. The UPLC analyses of 5c (A) and 5d (B) after 120 min incubation with MLMs.

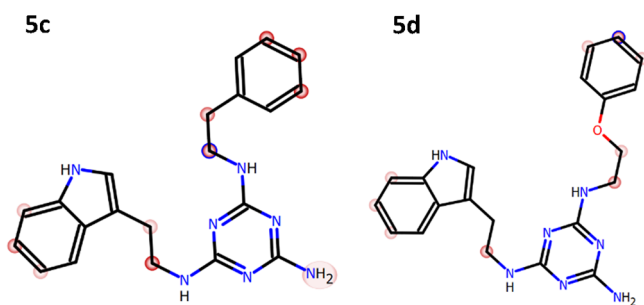


Fig. 12. *In silico* analysis for 5c and 5d using MetaSite. Sites susceptible to metabolic transformation are marked with red circles, while blue circles designate atoms most susceptible to such transformations. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

supported by microwave irradiation. During the research, we developed the best synthesis conditions which made it possible to obtain the final compounds with high yield. Using potassium carbonate and TBAB, we were able to conduct the synthesis under *solvent-free* conditions. The

microwave irradiation led to reaction time shortened by up to 3 min. In our preliminary studies, we demonstrated that indole-derived aminotriazine novologues can exhibit activity in interactions with a 5-HT₇R. We discovered that amino substituent attached to the triazine core, as well as an alkyl aryl substituent attached to the triazine core (ligands 5c and 5d), are of significant importance. Elongation of an alkylaryl chain decreased the activity to 5-HT₇R. However, high CNS drugability identification for new compounds (based on CNS-MPO), we did not see the correlation with PAMPA. CNS-MPO is the only *in silico* additional approach that helps to assess drugability but does not guarantee *in vitro* convergence. Although the chemical structures of the studied indoleaminotriazines are to some extent similar to those known in the literature (Fig. 2), we identified binding mode slightly different from the one proposed by Kołaczowski et al. [14]. This can be explained for example by the fact that calculation methods applied by Kołaczowski et al. [14], in 2006 were not as accurate as nowadays. Currently, we postulate that the hydrogen bond between amino substituent attached to the triazine ring and E7.34 residue is crucial for the binding. According to MD, the typical salt bridge (for most aminergic GPCRs) with D3.32 is highly unstable, while hydrogen bond with E7.34 seems to be stable. The importance of interaction with E7.34 for the 5-HT₇R

Table 5
MS spectra of **5c** and its metabolites.

Compound	Retention time [min]	<i>m/z</i> (Found)	Metabolic pathway
5c	5.58	374.36	
Metabolite 1-main	3.79	406.33	double hydroxylation or oxidation
Metabolite 2	4.04	404.33	dehydrogenation and double hydroxylation
Metabolite 3	4.87	390.31	hydroxylation
Metabolite 4	4.62	372.33	dehydrogenation
Metabolite 5	3.05	422.35	triple hydroxylation or oxidation

Table 6
MS spectra of **5d** and its metabolites.

Compound	Retention time [min]	<i>m/z</i> (Found)	Metabolic pathway
5d	5.48	390.31	
Metabolite 1 – main	3.72	422.35	double hydroxylation or oxidation
Metabolite 2	3.28	312.35	defragmentation
Metabolite 3	4.74	406.33	hydroxylation
Metabolite 4	3.38	404.27	dehydrogenation and hydroxylation
Metabolite 5	4.48	388.31	dehydrogenation
Metabolite 6	2.38	328.30	defragmentation or defragmentation and hydroxylation

corresponds with the results of Levy et al. [30]. Nevertheless, further experimental research will allow us to confirm the proposed hypothesis. Unfortunately, the compounds do not penetrate membrane in the PAMPA test and are characterized by poor metabolic stability. It may be a result of unsubstituted benzene ring where MetaSite indicated positions easy for biotransformation. This hypothesis may be confirmed by R. J Mattson et al.'s [13], research where installation halogen atom into phenethyl substituent increased metabolic stability. In the drug-drug interaction analysis, compounds may exhibit moderate potential interaction with other drugs metabolized by CYP3A4 or CYP2D6. K_i values for **5c** and **5d** to 5-HT₇R are much lower than IC₅₀ for cytochromes. In our research, we found that promising compounds **5c** and **5d** do not exhibit hepatotoxicity. Our research is just a preliminary study that encourages us to focus on the development of this group of compounds even further.

4. Experimental section

4.1. Chemistry

4.1.1. General

All the reactants were purchased from commercial sources. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded using the Bruker 300 MHz and 400 MHz apparatuses with TMS as an internal standard. Melting points were determined with the Bötius apparatus. Perkin HPLC with DAD detector (wave length at 254 nm) and C₁₈ 1.4 μm column was used.

HPLC chromatograms were recorded on Perkin HPLC and Waters UPLC. Details of analytical methods can be found in appendix A. All ligands were determined at wave length 254 nm. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using 0.2 mm silica gel pre-coated aluminum sheets (60 F254, Merck) and UV light at 254 nm was used for visualization. CEM Discover™ Focused Microwave System at 50 W of power was used for all microwave-assisted reactions.

4.1.2. General procedure for the synthesis of compounds **5a-b** (conventional synthesis)

The procedure was performed in accordance with [13]. In a round-bottom flask, 0.45 g (1.56 mmol) of intermediate **4** followed by 0.82 mL of DIPEA were dissolved in 15 mL of THF. The mixture was stirred over 10 min, then 0.7 mL methylamine solution 40% w/w (for **5a**) or 0.85 mL benzylamine (for **5b**) was added dropwise. The mixture was stirred over 48 h at reflux. After this time, TLC indicated full consumption of intermediate **4**. The mixture was cooled down and extracted with chloroform (3x). Organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated to yield amber-like, viscous, crude oil. The crude product was purified *via* column chromatography with elution using chloroform followed by chloroform:MeOH 97:3 v/v. The pure product obtained as a colorless viscous oil was then dissolved in acetone and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in dioxane. The resulting mixture was evaporated and cold acetone was added to the semi-solid residue. Precipitated white powder was then filtered, rinsed with acetone and dried.

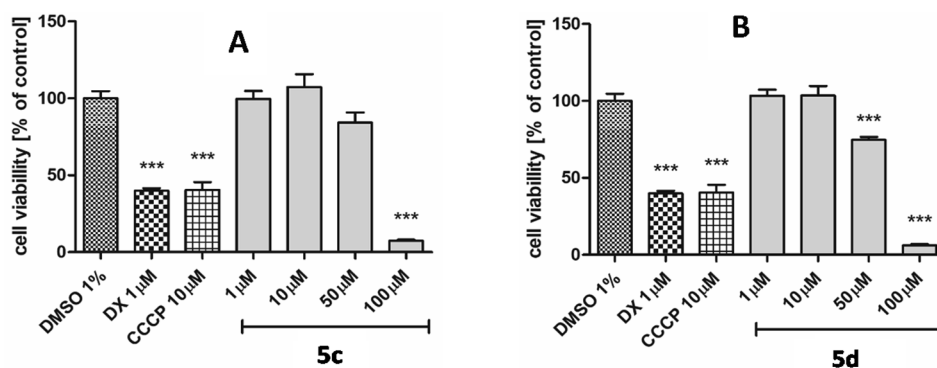


Fig. 13. The effects of doxorubicin (DX, 1 μM), mitochondrial toxin carbonyl cyanide 3-chlorophenyl-hydrazone (CCCP, 10 μM) and compound **5c** (A) **5d** (B) on hepatoma HepG2 cell line viability after 48 h of incubation.

4.1.2.1. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-methyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5a**). White solid (96% yield), melting point: 183–185 °C; UPLC: 91%; ES + MS: 284.3 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.58 (bs, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.02 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.79–3.68 (m, 2H), 3.06 (bs, 2H), 2.93 (bs, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 159.56, 157.07, 155.78, 136.80, 127.33, 122.35, 120.97, 118.22, 117.78, 111.35, 110.91, 41.43, 26.30, 24.82

4.1.2.2. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-benzyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5b**). White solid (84% yield), melting point: 181–182 °C; UPLC: 95%; ES + MS: 360.43 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.38–7.23 (m, 6H), 7.14–6.93 (m, 3H), 4.60 (s, 1H), 4.50 (s, 1H), 3.71 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.10–2.97 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 158.26, 156.34, 154.83, 144.80, 136.79, 128.25, 128.20, 127.33, 127.24, 127.10, 126.98, 122.21, 120.97, 118.24, 117.77, 111.38, 110.89, 44.09, 41.38, 24.80

4.1.3. General procedure for the synthesis of compounds **5a–5i** and **6a–b** (microwave assistant)

The procedure was performed in accordance with [20]. Intermediate **4** (0.45 g, 1.52 mmol), potassium carbonate (0.64 g, 4.7 mmol), and TBAB (0.05 g, 0.16 mmol) were ground in a mortar. Next, appropriate amine (4.7 mmol) was added, followed by addition of DMF in the amount of 1–5% wt. The mixture was reacted in a microwave reactor at 50 W for 2.5 min. The reaction progress was monitored via TLC/HPLC. The mixture was cooled down, and extracted with chloroform (3x). Organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated to yield amber-like, viscous, crude oil. The crude product was purified via column chromatography with elution using chloroform followed by chloroform: MeOH 97:3 v/v. The pure product obtained as a colorless viscous oil was then dissolved in acetone and pH was adjusted to 2–3 with 4 M HCl in dioxane. The resulting mixture was evaporated and cold acetone was added to the semi-solid residue. Precipitated white powder was then filtered, rinsed with acetone and dried.

4.1.3.1. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-phenethyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5c**). White solid (88% yield), melting point: 148–150 °C; UPLC: 99%; ES + MS: 374.0 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.32–7.16 (m, 5H), 7.13–7.06 (m, 2H), 7.05–6.91 (m, 1H), 3.77–3.68 (m, 2H), 3.62 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.07 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.92–2.81 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 159.48, 158.96, 155.91, 138.65, 136.80, 128.49, 128.13, 127.31, 126.13, 126.04, 122.26, 120.98, 118.30, 117.78, 111.40, 111.23, 110.93, 66.74, 42.09, 35.07, 24.94

4.1.3.2. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-(2-phenoxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5d**). White solid (90% yield), melting point: 177–180 °C; UPLC: 100%; ES + MS: 390.4 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.57 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.31–7.22 (m, 2H), 7.14–7.07 (m, 2H), 7.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.96–6.90 (m, 3H), 4.14 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.09 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.79 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.75–3.67 (m, 3H), 3.06 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 158.60, 156.33, 153.77, 136.81, 129.24, 129.11, 127.35, 122.32, 120.99, 120.71, 120.65, 118.26, 117.77, 114.23, 114.17, 111.41, 110.92, 65.67, 41.37, 40.00, 24.94

4.1.3.3. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-(3-phenoxypropyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5e**). White solid (78% yield), melting point: 183–185 °C; UPLC: 96%; ES + MS: 404.48 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.23 (dt, *J* = 15.5, 7.9 Hz, 2H), 7.09 (dd, *J* = 13.3, 5.8 Hz, 2H), 7.01 (m, 1H), 6.91 (dd, *J* = 7.5, 3.4 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.06 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.98 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.70 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.52 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.09–2.98 (m,

2H), 2.1–1.98 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 159.74, 158.88, 155.95, 136.80, 129.03, 127.31, 122.32, 120.99, 120.37, 120.29, 118.27, 117.79, 114.11, 114.04, 111.39, 111.22, 110.93, 64.93, 41.34, 37.89, 28.69, 24.90

4.1.3.4. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-(4-phenoxybutyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5f**). White solid (83% yield), melting point: 175–178 °C; UPLC: 95%; ES + MS: 418.54 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.56 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.23 (dt, *J* = 15.9, 8.0 Hz, 2H), 7.13–7.06 (m, 2H), 7.01 (dd, *J* = 15.4, 7.7 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.94 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.69 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.46 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.38 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.08–2.98 (m, 2H), 1.86–1.72 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 159.58, 158.97, 156.00, 136.80, 129.02, 127.33, 122.30, 121.00, 120.24, 120.21, 118.26, 117.78, 114.12, 114.04, 111.41, 111.18, 110.96, 66.93, 41.36, 40.21, 26.21, 25.61, 24.93

4.1.3.5. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-(2-(naphthalen-1-yl)ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5g**). White solid, melting point: 184–187 °C; UPLC: 98%; ES + MS: 424.5 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.94–7.81 (m, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.54–7.34 (m, 5H), 7.10 (dd, *J* = 15.5, 7.9 Hz, 2H), 6.99 (dd, *J* = 14.0, 6.4 Hz, 1H), 3.80–3.65 (m, 2H), 3.44–3.32 (m, 2H), 3.20–2.98 (m, 2H), 2.48–2.55 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 156.01, 154.32, 136.83, 134.60, 127.30, 127.08, 125.88, 125.65, 125.56, 124.58, 122.31, 122.25, 121.40, 120.98, 119.92, 119.69, 118.30, 118.24, 111.37, 111.18, 110.80, 104.52, 67.19, 41.28, 40.24, 26.21

4.1.3.6. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-(3-(naphthalen-1-yloxy)propyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5h**). Grey solid (77% yield), melting point: 179–180 °C; UPLC: 99%; ES + MS: 454.54 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 20.9, 7.8 Hz, 1H), 7.46–7.31 (m, 5H), 7.13–6.93 (m, 3H), 6.9–6.8 (m, 1H), 4.26 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.18 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.73–3.65 (m, 2H), 3.63 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.07–2.86 (m, 2H), 2.24–2.12 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 160.09, 155.93, 154.39, 136.79, 134.59, 127.28, 127.07, 125.91, 125.63, 125.48, 124.64, 122.29, 121.36, 120.97, 119.81, 119.75, 118.29, 118.23, 117.78, 111.31, 110.91, 65.36, 41.15, 38.11, 28.84, 24.76

4.1.3.7. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-*N*⁴-(4-(naphthalen-1-yloxy)butyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine*HCl (**5i**). White solid (84% yield), melting point: 185–18 °C; UPLC: 98%; ES + MS: 468.6 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 24.9, 7.8 Hz, 1H), 7.47–7.30 (m, 5H), 7.14–6.95 (m, 3H), 6.89–6.76 (m, 1H), 4.19 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.13 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.59 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.50 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.42 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.04 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.01–1.84 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 159.12, 156.01, 154.46, 136.79, 134.60, 127.30, 127.08, 125.88, 125.65, 125.56, 124.58, 122.25, 121.40, 120.98, 119.69, 118.30, 118.24, 117.79, 117.77, 111.37, 110.93, 67.21, 41.28, 40.24, 26.21, 25.77, 24.85

4.1.3.8. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-6-chloro-*N*⁴-methyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine*HCl (**6a**). White solid (75% yield), melting point: 193–195 °C; UPLC: 96%; ES + MS: 304.1 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.14–7.08 (m, 2H), 7.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.79 (bs, 2H), 3.09 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.87 (bs, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 167.63, 165.91, 165.51, 136.78, 130.97, 128.44, 127.40, 122.04, 120.87, 118.09, 117.87, 41.30, 26.40, 24.94

4.1.3.9. *N*²-(2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl)-6-chloro-*N*⁴-phenethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine - base (**6b**). White solid (78% yield); melting point: 123–125 °C; UPLC: 96%; ES + MS: 394,3 [M + H]; ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.31–7.14 (m, 5H), 7.12–7.05 (m, 2H), 7.04–6.90 (m, 1H), 3.71 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.66–3.60 (m, 1H), 3.56 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.10–2.99 (m, 2H), 2.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.02, 165.79, 165.42, 139.67, 136.70, 129.08, 128.73, 127.71, 127.64, 126.56, 126.51, 123.08, 121.35, 118.67, 118.59, 112.05, 111.80, 42.49, 41.59, 35.30, 25.33

4.2. In-vitro pharmacology

Cell culture, cell membranes, and radioligand binding assays were performed in accordance with standard protocols [10].

4.3. CNS MPO

The Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) was determined based on the work of Wager et al. [22], 6 base values including: clogP, clogD, pK_A (for the strongest basic), HBD (Hydrogen Bond Donor), MW and TPSA (Topological Polar Surface Area) were determined using the calculators available in the ChemAxon [43], package and the Swiss-ADME server [44]. ClogP, clogD, pK_A and HBD were then parameterized using the monotonic decreasing function and TPSA using the hump function [22]. For compounds with the best CNS drugability, the sum of parameterized function values was close to 6, while for compounds with the worst CNS drugability, this sum was 0–1 [22].

4.4. Molecular modeling

4.4.1. Docking

The procedure was performed in accordance with [45]. The 5-HT₇ receptor homology model was built based on the 5-HT_{1B} receptor crystal structure (PDB: 5v54) template, using the Swiss-Model server [31]. The optimized three-dimensional structures for the ligands were determined by LigPrep (OPLS3) and the protonation state at pH 7.4 ± 2.0 using Epik. The Protein Preparation Wizard was used to evaluate appropriate amino acid ionization states, to check the steric clashes and to assign the bonds orders. All ligands were docked by the Induced Fit Docking (IFD) with XP (extra precision) with OPLS3 force field. Grid box size of 15 Å was centered on the rest of D3.32. Selected poses, whose binding mode was closest to the literature data, were optimized in QM/MM approach using functional DFT-B3LYP and LACVP as basis set [36]. QM region was set up on conserved amino acids and ligands. The model was validated using Swiss-Model server [31], and QMEAN [31], by parameters determination (Sequence identity – 37.89%, coverage – 0.67 see Appendix A). The percent of residues in favored regions of the Ramachandran plot was also determined. LigPrep [37], Protein Preparation Wizard [38], IFD and QM/MM were used as a tools available in the Maestro, Schrodinger Release 2019–4.

4.4.2. Molecular dynamics

The procedure was performed in accordance with [46]. 100 ns Molecular Dynamics (MD) simulations with ensemble class NPAT (T = 300 K, p = 1.01325 bar) were performed using Schrödinger Desmond software (Schrodinger Release 2019–3, New York, NY; 2019). Each ligand–protein complex was immersed into a POPC (300 K) membrane bilayer, whose position was placed automatically. The system was solvated by water molecules described by the TIP4P potential and the OPLS3 force field parameters were used for all atoms. 0.15 M NaCl was added to mimic the ionic strength inside the cell. The output trajectories were hierarchically clustered into 10 clusters according to the ligand using trajectory analysis tools available in the Maestro Schrodinger Release 2019–4.

4.4.3. PAMPA test

Pre-coated PAMPA Plate System Gentest™ was obtained from Corning, (Tewksbury, MA, USA). The compounds' permeability was analyzed in triplicate according to described previously protocols [39–42]. The tested compound solutions (all at 200 μM) were prepared in PBS buffer (pH = 7.4) and added to the donor wells(D) (300 μL/well). Next, 200 μL/well of PBS was added to the acceptor (A) wells. The plate was incubated at room temperature for 5 h without stirring. Then, the 50 μL was aspirated from both A and D wells and diluted next with 50 μL solution of an internal standard (IS). The concentrations of tested compounds in A and D wells were estimated by LC/MS Waters ACQUITY™ TQD system with the TQ Detector (Waters, Milford, USA).

4.4.3.1. *Drug – drug interactions*. The luminescent CYP3A4 P450-Glo™, CYP2D6 P450-Glo™ and CYP2D6 P450-Glo™ Promega® (Madison, WI, USA) were used for the investigation of potential drug-drug interactions (DDI). All assays and protocols had been described before [39–42]. The compounds were tested in triplicate in a single experiment at the final concentrations in range from 0.01 to 25 μM. The luminescent signal was measured by the EnSpire PerkinElmer (Waltham, MA, USA) microplate reader. Compounds used as references: ketoconazole (KE), quinidine (QD) and sulfaphenazole (SE), were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.4.3.2. *Metabolic stability*. The metabolic stability was estimated by using mouse liver microsomes (MLMs) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), according to the previously described protocols [39–42]. The tested compounds (50 μM) were incubated in the presence of MLMs (1 mg/ml) for 120 min in 10 mM Tris–HCl buffer at 37 °C. Cold methanol was added to terminate the reaction. The precipitated MLMs were centrifuged and the supernatant was analyzed by LC/MS Waters ACQUITY™ TQD system with the TQ Detector (Waters, Milford, USA).

4.4.3.3. *Hepatotoxicity*. Hepatotoxicity was evaluated with hepatoma HepG2 (ATCC® HB-8065™) cell line. Cells were cultured in previously described conditions [39–42]. Cells were incubated for 48 h at 96-well plates with compounds in the final concentration range (1–100 μM), whereas the references CCCP and DX at 10 μM and 1 μM, respectively. The cells' viability was determined by CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS), which was purchased from Promega (Madison, WI, USA). Absorbance was measured using a microplate reader EnSpire (PerkinElmer, Waltham, MA USA) at 490 nm. All compounds were tested in a single experiment in quadruplicate. The compounds used as references: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), doxorubicin (DX), were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.4.4. Statistical analysis

Radioligand binding: The experimental data were analyzed using GraphPad Prism 8 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Competition binding (*K_i*) was fitted to a one-site sigmoidal model. Data were normalized to total (100%) and non-specific (0%) binding.

ADME-T: The IC₅₀ values in DDI analyses were calculated using GraphPad Prism 8.0.1 software (nonlinear regression, log(inhibitor) vs. normalized response).

Statistical significance in hepatotoxicity determination was evaluated by GraphPad Prism 5.0.1 software using one-way ANOVA, followed by Bonferroni's comparison test (**p < 0.001).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank: the National Centre for Research and Development (Grant No. LIDER/015/L-6/14/NCBR/2015) for providing financial support for this project; PLG infrastructure (Prometheus, ACC-CYFRONET, AGH, project ID: drugdesign3) for performing molecular modeling (docking, and QM/MM); Molecular Discovery Ltd., Ground Floor, Unit 501 Centennial Park, Centennial Avenue Elstree, Borehamwood, Hertfordshire WD6 3FG, U.K. for short term license of MetaSite tool, version 6. We would also like to thank Prof. Andrzej Bojarski (Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences) for providing us with the access to the calculation infrastructure in the Department of Medicinal Chemistry, which allowed us to perform the simulation of molecular dynamics.

Appendix A. Supplementary material

UPLC-MS, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR Spectras, metabolic stability – MS spectrograms, and 5-HT₇ receptor homology model validation and analytical methods can be found in an appendix A. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104254>.

References

- [1] L. Qingqing, H. Hairong, Y. Jin, F. Xiaojie, Z. Fanfan, L. Jun, *J. Psychiatr. Res.* 126 (2020) 134–140.
- [2] O. Edward, Y.X. Zhu, J.R. Etukala, P. Kwakye, K.R. Jordan, A.A. Adkins, B.A. Bricker, X.P. Huang, H.J. Kang, B.L. Roth, S.Y. Ablordeppey, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 3464–3471.
- [3] A. Etievant, C. Bétry, N. Haddjeri, *Open Neuropsychopharmacol. J.* 3 (2010) 1–12.
- [4] C.N. Yohn, M.M. Gergues, B.A. Samuels, *Mol. Brain.* 10 (2017) 28.
- [5] A. Nikiforuk, *CNS Drugs* 29 (2015) 265–275.
- [6] P.B. Hedlund, *Psychopharmacol (Berl)*. 206 (2009) 345–354.
- [7] M.N. Modica, E. Lacivita, S. Intagliata, L. Salerno, G. Romeo, V. Pittala, M. Leopoldo, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 8475–8503.
- [8] M. Leopoldo, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 629–661.
- [9] T. Linnanen, M. Brisander, L. Unelius, S. Rosqvist, G. Nordvall, U. Hacksell, A.M. Johansson, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 1337–1340.
- [10] A.S. Hogendorf, A. Hogendorf, R. Kurczab, G. Satała, T. Lenda, M. Walczak, G. Latacz, J. Handzlik, K. Kieć-Kononowicz, J.M. Wierońska, M. Woźniak, P. Cieślak, R. Bugno, J. Staroń, A.J. Bojarski, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1444.
- [11] Ch. Kikuchi, H. Nagaso, T. Hiranuma, M. Koyama, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 533–535.
- [12] M.A. Poss, A.V. Purandare, R.J. Mattson, L. Sun, WO 2001085701, 2001.
- [13] R.J. Mattson, D.J. Denhart, J.D. Catt, M.F. Dee, J.A. Deskus, J.L. Ditta, J. Epperson, H. King, A. Gao, M.A. Poss, A. Purandare, D. Tortolani, Y. Zhao, H. Yang, S. Yeola, J. Palmer, J. Torrente, A. Stark, G. Johnson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4245–4248.
- [14] M. Kołaczowski, M. Nowak, M.M. Pawłowski, A.J. Bojarski, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6732–6741.
- [15] M.G.N. Russell, R.J. Baker, L. Barden, M.S. Beer, L. Bristow, H.B. Broughton, M. Knowles, G. McAllister, S. Patel, J.L. Castro, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 3881–3895.
- [16] J. Staroń, R. Kurczab, D. Warszycki, G. Satała, M. Krawczyk, R. Bugno, T. Lenda, P. Popik, A.S. Hogendorf, A. Hogendorf, K. Dubiel, M. Matłoka, R. Moszczyński-Pętkowski, J. Pieczykolan, M. Wiecezorek, P. Zajdel, A.J. Bojarski, *Eur. J. Med. Chem.* 185 (2020) 111857.
- [17] D.H. King, D.J. Denhart, J.A. Deskus, J.L. Ditta, J.R. Epperson, M.A. Higgins, J.E. Kung, J.L. Marcin, Ch.P. Sloan, G.K. Mattson, T.F. Molski, R.G. Krause, R.L. Bertekap, N.J. Lodge, R.J. Mattson, J.E. Macor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 5647–5651.
- [18] D. Kułaga, J. Jaśkowska, R. Jasiński, *J. Heterocyclic Chem.* 56 (2019) 1498–1504.
- [19] J. Jaśkowska, P. Zareba, P. Śliwa, E. Pindelska, G. Satała, Z. Majka, *Molecules* 29 (2019) 1609.
- [20] P. Zareba, J. Jaśkowska, P. Śliwa, G. Satała, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29 (2019) 2236–2242.
- [21] S.C. Vigil-Cruz, A.M. Peck, J.V. Aldrich, Determination of an Optimal Solid Support for Use with Microwave-Assisted Solid-Phase Peptide Synthesis. *Understanding Biology Using Peptides*. American Peptide Symposia, vol. 9. Springer, New York, NY, 2006.
- [22] T.T. Wager, X. Hou, P.R. Verhoest, A. Villalobos, *ACS Chem. Neurosci.* 7 (2016) 767–775.
- [23] M. Vass, S. Podlewska, I.J.P. de Esch, A.J. Bojarski, R. Leurs, A.J. Kooistra, Ch. de Graaf, *J. Med. Chem.* 62 (2019) 3784–3839.
- [24] Schrödinger Release 2019-4: Induced Fit Docking protocol; Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- [25] M. Kołaczowski, M. Marcinkowska, A. Bucki, M. Pawłowski, K. Mitka, J. Jaśkowska, P. Kowalski, G. Kazek, A. Siwek, A. Wasik, A. Wesołowska, P. Mierzejewski, P. Bienkowski, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 4543–4557.
- [26] Schrödinger Release 2019-4: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2019. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2019.
- [27] P. Murray-Rust, J.P. Glusker, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 1018.
- [28] R.N. Harris, R.S. Stabler, D.B. Repke, J.M. Kress, K.A. Walker, R.S. Martin, J.M. Brothers, M. Ilnicka, S.W. Lee, T. Mirzadegan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 3436–3440.
- [29] C. Wang, Y. Jiang, H. Ma, D. Wu, V. Wacker, G.W. Katritch, W. Han, X.P. Liu, E. Huang, J.D. Vardy, X. McCorvy, X.E. Gao, K. Zhou, C. Melcher, F. Zhang, H. Bai, L. Yang, H. Yang, B.L. Jiang, V. Roth, R.C. Cherezov, H.E.Xu. Stevens, *Science* 340 (2013) 610–614.
- [30] A.A.R. Impellizzeri, M. Pappalardo, L. Basile, O. Manfra, K.W. Andressen, K.A. Krobot, A. Messina, F.O. Levy, S. Guccione, *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) 92.
- [31] <https://swissmodel.expasy.org/> Acces: 25.07.2019, Biozentrum, University of Basel, The Center for Molecular Life Science.
- [32] D.B. Kassel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8 (2004) 339–345.
- [33] Z. Rankovic, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 2584–2608.
- [34] T. Lynch, A. Price, *Am. Fam. Physician* 76 (2007) 391–396.
- [35] S.U. Vorrink, Y. Zhou, M. Ingelman-Sundberg, *Toxicol. Sci.* 163 (2018) 655–665.
- [36] P.J. Hay, W.R. Wadt, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 299–310.
- [37] Schrödinger Release 2019-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- [38] Schrödinger Release 2019-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- [39] G. Latacz, A. Lubelska, M. Jastrzębska-Więsek, A. Partyka, M.A. Marć, G. Satała, D. Wilczyńska, M. Kotańska, M. Więcek, K. Kamińska, A. Wesołowska, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 3420.
- [40] G. Latacz, G.A.S. Hogendorf, A. Hogendorf, A. Lubelska, J.M. Wierońska, M. Woźniak, P. Cieślak, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, A.J. Bojarski, *Med. Chem. Comm.* 9 (2018) 1882–1890.
- [41] G. Latacz, A. Lubelska, M. Jastrzębska-Więsek, A. Partyka, K. Kucwaj-Brysz, A. Wesołowska, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 28 (2018) 878–883.
- [42] G. Latacz, A. Lubelska, M. Jastrzębska-Więsek, A. Partyka, A. Sobiło, A. Olejrz, K. Kucwaj-Brysz, G. Satała, A.J. Bojarski, A. Wesołowska, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, *Chem. Biol. Drug Des.* 90 (2017) 1295–1306.
- [43] Calculator Plugins were used for structure property prediction and calculation, Marvin 19.4.0, 2019, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- [44] <http://www.swissadme.ch>; Swiss Institute of Bioinformatics, Access: 27.02.2020.
- [45] P. Zareba, A.K. Drabczyk, J. Jaśkowska, G. Satała, *Bioorg. Med. Chem.* 28 (2020) 115459.
- [46] K. Kucwaj-Brysz, R. Kurczab, M. Jastrzębska-Więsek, E. Żesławska, G. Satała, W. Nitek, A. Partyka, A. Siwek, A. Jankowska, A. Wesołowska, K. Kieć-Kononowicz, J. Handzlik, *Eur. J. Med. Chem.* 147 (2018) 102–114.
- [47] Y. Cheng, W. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3099–3108.

Deklaracje współautorów

Oświadczenie

o udziale autorów w powstaniu publikacji pt.:

„Microwave-Assisted Solvent-Free Synthesis of Ipsapirone”

J. Heterocyclic Chem. 2019, 56(5), 1498-1504, IF* = 1.399

* - pięcioletni Impact Factor

mgr inż. Damian Kułaga (udział procentowy: 85 %):

- opracowanie planu i zakresu badań
- odpowiedzialny za część syntetyczną, opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu oraz za proces publikacyjny

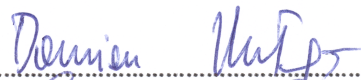
dr inż. Jolanta Jaśkowska (udział procentowy: 10 %)

- opracowaniu planu i zakresu badań
- korekta manuskryptu

dr. hab. inż. Radomir Jasiński, prof. PK (udział procentowy: 5 %)

- przeprowadzenie obliczeń DFT

mgr inż. Damian Kułaga.....



dr inż. Jolanta Jaśkowska.....



dr. hab. inż. Radomir Jasiński, prof. PK.....



Kraków 27.09.2022

Oświadczenie

o udziale autorów w powstaniu publikacji pt.:

„Radioligand and computational insight in structure - Activity relationship of saccharin derivatives being ipsapirone and revospirone analogues”

Bioorg. Med. Chem. Lett. 2019, 29(21),126667, IF* = 2.774

* - pięcioletni Impact Factor

mgr inż. Damian Kułaga (udział procentowy: 85 %):

- opracowanie planu i zakresu badań
- odpowiedzialny za zaprojektowanie związków, modelowanie molekularne, syntezę chemiczną, opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu oraz za proces publikacyjny

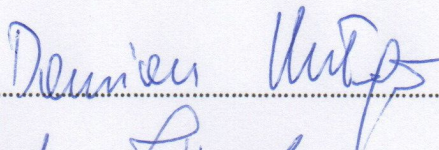
dr inż. Jolanta Jaśkowska (udział procentowy: 10 %)

- opracowanie planu i zakresu badań
- korekta manuskryptu

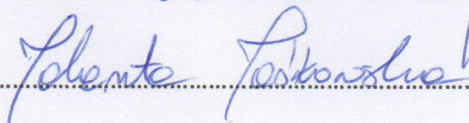
dr Grzegorz Satała (udział procentowy: 5 %)

- wykonanie badań powinowactwa *in vitro*

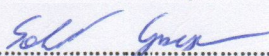
mgr inż. Damian Kułaga.....



dr Jolanta Jaśkowska.....



dr Grzegorz Satała.....



Kraków 27.09.2022

Oświadczenie

o udziale autorów w powstaniu publikacji pt.:

„ Design, synthesis and biological evaluation of novel serotonin and dopamine receptor ligands being 6-bromohexyl saccharine derivatives”

Bioorg. Med. Chem. Lett. 2019, 29(21),126667, IF* = 2.774

* - pięcioletni Impact Factor

mgr inż. Damian Kułaga (udział procentowy: 85 %):

- opracowanie planu i zakresu badań
- odpowiedzialny za zaprojektowanie związków, modelowanie molekularne, syntezę chemiczną, opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu oraz za proces publikacyjny

dr inż. Jolanta Jaśkowska (udział procentowy: 10 %)

- opracowanie planu i zakresu badań
- korekta manuskryptu

dr Grzegorz Satała (udział procentowy: 5 %)

- wykonanie badań powinowactwa *in vitro*

mgr inż. Damian Kułaga.....

dr Jolanta Jaśkowska.....

dr Grzegorz Satała.....

Oświadczenie

o udziale autorów w powstaniu publikacji pt.:

„ Design and synthesis of new potent 5-HT₇ receptor ligands as a candidate for the treatment of central nervous system diseases”

Eur. J. Med. Chem. 2022, 227, 113931, IF* = 6.427

* - pięcioletni Impact Factor

mgr inż. Damian Kułaga (udział procentowy: 70 %):

- opracowanie planu i zakresu badań
- odpowiedzialny za zaprojektowanie związków, modelowanie molekularne, syntezę chemiczną, opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu oraz za proces publikacyjny

mgr inż. Anna Karolina Drabczyk (udział procentowy: 5 %):

- synteza chemiczna

dr Grzegorz Satała (udział procentowy: 5 %)

- wykonanie badań powinowactwa i funkcji wewnętrznej *in vitro*

dr hab. Gniewomir Latacz (udział procentowy: 5 %)

- ocena bezpieczeństwa wybranych związków ADME-Tox *in vitro*

mgr Karolina Rózga (udział procentowy: 5 %)

- ocena czystości chemicznej związków LCMS-MS

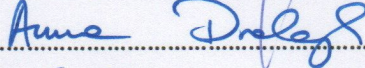
dr hab. Damian Plażuk, prof. Uł (udział procentowy: 5 %)

- korekta manuskryptu

dr inż. Jolanta Jaśkowska (udział procentowy: 5 %)

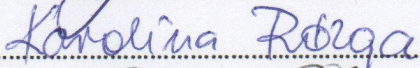
- korekta manuskryptu

mgr inż. Damian Kułaga..... 

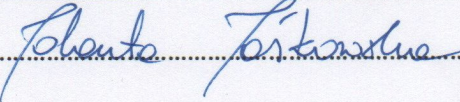
mgr inż. Anna Karolina Drabczyk..... 

dr Grzegorz Satała..... 

dr hab. Gniewomir Latacz..... 

mgr Karolina Rózga..... 

dr hab. Damian Plażuk, prof. Uł..... 

dr inż. Jolanta Jaśkowska..... 

Oświadczenie

o udziale autorów w powstaniu publikacji pt.:

„Design, synthesis and biological evaluation of novel 1,3,5-triazines: effect of aromatic ring decoration on affinity to 5-HT₇ receptor”

Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(21), 13308, IF* = 6.628

* - pięcioletni Impact Factor

mgr inż. Damian Kułaga (udział procentowy: 70 %):

- opracowanie planu i zakresu badań
- odpowiedzialny za zaprojektowanie związków, modelowanie molekularne, syntezę chemiczną; opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu oraz za proces publikacyjny

mgr inż. Anna Karolina Drabczyk (udział procentowy: 5 %):

- synteza chemiczna

dr Grzegorz Satała (udział procentowy: 5 %)

- wykonanie badań powinowactwa *in vitro*

dr hab. Gniewomir Latacz (udział procentowy: 5 %)

- ocena bezpieczeństwa wybranych związków ADME-Tox *in vitro*

dr hab. Anna Boguszewska Czubara (udział procentowy: 5 %)

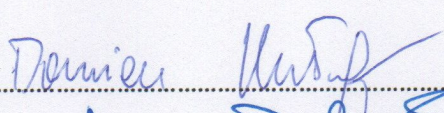
- ocena potencjału kardi toksycznego *in vivo*

dr hab. Damian Plażuk, prof. UŁ (udział procentowy: 5 %)

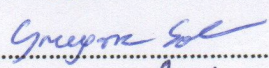
- ocena czystości związków LCMS-MS, korekta manuskryptu

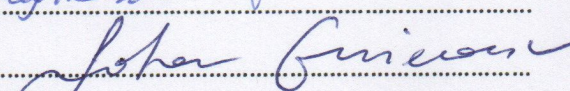
dr inż. Jolanta Jaśkowska (udział procentowy: 5 %)

- korekta manuskryptu

mgr inż. Damian Kułaga.....

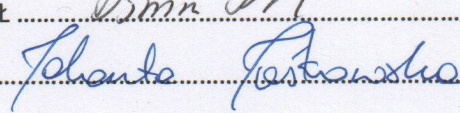
mgr inż. Anna Karolina Drabczyk.....

dr Grzegorz Satała.....

dr hab. Gniewomir Latacz.....

dr hab. Anna Boguszewska Czubara.....

dr hab. Damian Plażuk, prof. UŁ.....

dr inż. Jolanta Jaśkowska.....

Oświadczenie

o udziale autorów w powstaniu publikacji pt.:

„Aminotriazines with indole motif as novel, 5-HT₇ receptor ligands with atypical binding mode”

Bioorg. Chem. 2020, 104, 104254, IF* = 5.321

* - pięcioletni Impact Factor

mgr inż. Damian Kułaga (udział procentowy: 80 %):

- opracowanie planu i zakresu badań
- odpowiedzialny za zaprojektowanie związków, modelowanie molekularne, syntezę chemiczną, opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu oraz za proces publikacyjny

dr inż. Jolanta Jaśkowska (udział procentowy: 5 %)

- korekta manuskryptu

dr Grzegorz Satała (udział procentowy: 5 %)

- wykonanie badań powinowactwa *in vitro*

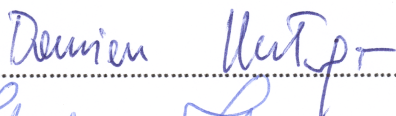
dr hab. Gniewomir Latacz (udział procentowy: 5 %)

- ocena bezpieczeństwa wybranych związków ADME-Tox *in vitro*

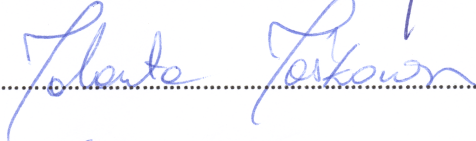
dr Paweł Śliwa (udział procentowy: 5 %)

- modelowanie molekularne

mgr inż. Damian Kułaga.....



dr Jolanta Jaśkowska.....



dr Grzegorz Satała.....



dr hab. Gniewomir Latacz.....



dr Paweł Śliwa.....

