

**AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**

Marek Konieczny

**SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA  
SIARKOWYCH ANALOGÓW FLAWONOIDÓW  
I ZWIĄZKÓW POKREWNYCH**

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Gdańsk 2007

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: Akademia Medyczna w Gdańsku  
Druk: Dział wydawnictw AMG  
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a  
Zlecenie KW/399/07

## SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	4
1. Wykaz publikacji będących podstawą pracy habilitacyjnej	5
2. Wykaz innych publikacji opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora	8
3. Wprowadzenie – geneza tematu	10
3.1. Wstęp	10
3.2. Budowa chemiczna flawonoidów	11
3.3. Aktywność biologiczna flawonoidów	11
3.4. Aktywność biologiczna tioflawonoidów	13
3.5. Flawonoidy jako związki wyjściowe w projektowaniu nowych leków – rozwój koncepcji pracy	16
4. Wyniki własne	21
4.1. Synteza pochodnych tioflawanonu, tioflawonu i ich ditlenków	21
4.2. Synteza pochodnych tioauronu	26
4.3. Synteza pochodnych chalkonu zawierających pierścień benzoksatiolonu	37
4.4. Synteza pochodnych fenylo winylo sulfonu	46
4.5. Nowa generacja pochodnych chalkonu	48
4.5.1. Badania aktywności biologicznej <i>in vitro</i>	49
4.5.1.1. Aktywność cytotoksyczna	49
4.5.1.2. Aktywności przeciwgruźlicza, przeciwbakteryjna i przeciwgrzybowa	51
4.5.1.3. Aktywność przeciwwirusowa	52
4.5.2. Badania mechanizmu działania	53
4.5.2.1. Analiza dystrybucji komórek w cyklu komórkowym oraz analiza mikroskopowa morfologii chromosomów	53
4.5.2.2. Hamowanie aktywności DNA topoizomerazy I oraz II	56
4.5.2.3. Wpływ pochodnych chalkonu na stabilność/strukturę mikrotubul w komórkach	58
5. Podsumowanie	61
6. Literatura	65

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1. mCPBA - kwas *m*-chloronadbenzoesowy
2. DDQ - 2,3-dichloro-5,6-dicyjanobenzochinon
3. DMSO - dimetylosulfotlenek
4. IC<sub>50</sub> - stężenie badanego preparatu powodujące śmierć 50 % komórek
5. LD<sub>50</sub> - jednorazowa dawka badanego preparatu powodująca śmierć 50 % zwierząt
6. MIC - minimalne stężenie hamujące rozwój mikroorganizmów

## 1. WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PODSTAWĄ PRACY HABILITACYJNEJ

Nr	Pozycja literaturowa, we wszystkich, poza patentami, M. Konieczny jest pierwszym autorem	IF	Punkty PI*
PUBLIKACJE			
1	<b>Konieczny, M.T.</b> ; Horowska, B.; Kunikowski, A.; Konopa, J.; Wierzba, K.; Yamada, Y.; Asao, T. <i>J. Org. Chem.</i> <b>1999</b> , <i>64</i> , 359-364; Synthesis and Reactivity of 5,8-Dihydroxythioflavanone Derivatives.	3.790	14 (K)
2	<b>Konieczny, M.T.</b> Horowska, B.; Kunikowski, A.; Konopa, J.; Wierzba, K.; Yamada, Y.; Asao, T. <i>Synthesis</i> <b>2001</b> , <i>9</i> , 1363 - 1367; Synthesis of Polyhydroxylated Derivatives of Phenyl Vinyl Sulfone as Structural Analogs of Chalcones.	2.203	11(K)
3	<b>Konieczny, M.T.</b> ; Konieczny, W. <i>Heterocycles</i> , <b>2005</b> , <i>65</i> , 451-464; "Synthesis and Reactivity of Thioaurones over the Past One Hundred Years."	1.064	15 (M)
4	<b>Konieczny, M.T.</b> ; Maciejewski, G.; Konieczny, W. <i>Synthesis</i> , <b>2005</b> , 1575-1577; "Selectivity Adjustment in the Cleavage of Allyl Phenyl and Methyl Phenyl Ethers with Boron Trifluoride - Methyl Sulfide Complex."	2.203	20 (M)
5	<b>Konieczny, M.T.</b> ; Konieczny, W.; Wolniewicz, S.; Wierzba, K.; Suda, Y.; Sowiński, P. <i>Tetrahedron</i> , <b>2005</b> , <i>61</i> , 8648-8655; "New Domino Reaction. One Pot Synthesis of 4,7-Dihydroxythioaurone Derivatives from Benzaldehydes and 4-Acetyl-2-oxo-benz[1,3]oxathiole."	2.643	20 (M)
6	<b>Konieczny, M.T.</b> ; Konieczny, W.; Okabe, S.; Tsujimoto, H.; Suda, Y.; Wierzba, K., <i>Chem. Pharm. Bull.</i> <b>2006</b> , <i>54</i> , 350-353; Synthesis and Cytostatic Activity of 4,7-Dihydroxythioaurone Derivatives. Effect of B Ring Substitution on the Activity.	1,246	20 (M)
7	<b>Konieczny, M.T.</b> ; Konieczny, W.; Sabisz, M.; Składanowski, A.; Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z. <i>Eur. J. Med. Chem.</i> <b>2007</b> , <i>42</i> , 729-733; Acid-catalyzed synthesis of oxathiolone fused chalcones. Comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line.	2,187	20 (M)

- 8 **Konieczny, M.T.**; Konieczny, W.; Sabisz, M.; Składanowski, A.; 1,246 20 (M)  
Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 55 (5), 817-820; Synthesis of isomeric, oxathiolone fused chalcones, and comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line.
- 9 **Konieczny, M.T.**; Konieczny, W.; Pirska, D.; Bułakowska, A.; 1,064 15 (M)  
Sabisz, M.; Składanowski, A.; Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z. *Heterocycles*, **2007**, w druku; Synthesis of oxathiolone fused chalcones bearing o-aminoalkyl side chain. Comparison of stability of isomeric benzoxathiolones under alkylation reaction conditions.

#### PATENTY

- 1 Konopa, J.K.; Konieczny, M.T.; Horowska, B.J.; Kunikowski, A.J.; - 24 (K)  
Asao, T.; Nishino, H.; Yamada, Y. **1997**, *Patent japoński nr 9025278*; 2-Thioflavone derivative and its production.
- 2 Konopa, J.K.; Konieczny, M.T.; Horowska, B.J.; Kunikowski, A.J.; - 24 (K)  
Asao, T.; Nishino, H.; Yamada, Y. **1997**, *Patent japoński nr 9003037*; Phenylsulfone derivative and its production.
- 3 Konieczny, M.T.; Andrzej Składanowski, A.; Zwolska, Z.; - -  
Konieczny, W.; Sabisz, M.; Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E., *Polskie zgłoszenie patentowe P381259*, **2006**, Nowe pochodne chalkonu, związki przejściowe oraz sposób otrzymywania tych pochodnych.

#### KOMUNIKATY ZJAZDOWE

- 1 Konieczny, M.T.; Horowska, B.; Kunikowski, A.; Konopa, J. II - 0.25 (K)  
Konferencja flawonoidy i ich zastosowanie, Rzeszów, 28-29 maja, **1998**, *Materiały konferencyjne*, str. 173; "Otrzymywanie sulfonowych pochodnych chalkonów."
- 2 Konieczny, M.T.; Maciejewski, G.; Konieczny, W. XXII Sesja - 0.25 (K)  
Naukowa Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku, Gdańsk, 16 grudnia **2003**, *Materiały konferencyjne*, str. 62;

---

"Deprotekcja eterów allilowo-fenylowych i metylowo-fenylowych za pomocą kompleksu trójfluorków boru - siarczek dimetylowy."

- 3 Konieczny, M.T.; Konieczny, W. XLIX Zjazd PTChem i SITPChem, - 0,25 (M)  
Gdańsk, 18-22 września 2006, *Materiały zjazdowe*, str. 60;  
"Mechanizm izomeryzacji 4,4'-dimetoksy-7,7' -  
di(piperydynokarbonyloksy)-3'-hydroksy-3'-metylo-3-keto-[3,3'-  
spirobi(2H, 3H, 3'H-benzo[b]tiofenu)]."

**Suma punktów: IF - 17,646**

**KBN - 73,75 (K)**

**MNiE - 130 (M)**

---

\* Dla prac opublikowanych do roku 2004 podano punktację KBN, oznaczoną w tabeli literą (K) a dla prac opublikowanych później podano punktację MNiE, oznaczoną literą (M).

## 2. WYKAZ INNYCH PRAC OPUBLIKOWANYCH PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Nr	Pozycja literaturowa (nazwisko pierwszego autora wytłuszczono)	IF	Punkty PI*
PUBLIKACJE			
1	<b>Abramovitch, R.A.</b> ; Kishore, D.; Konieczny, M.; Dauter, Z. <i>Heterocycles</i> <b>1987</b> , 25, 13, „Reaction of Pyridine-1-Oxide with Methyl Propiolate: A Pyrido-oxepine and other Novel Products.”	1,064	9 (K)
2	<b>Abramovitch, R.A.</b> ; Konieczny, M.; Pennington, W.; Kanamathareddy, S.; Vedachalam, M., <i>J. Chem. Soc., Chem. Commun.</i> <b>1990</b> , 269, „2-Azidoallylphosphonates: Synthesis and Application to Formation of 4-Amino-2-ethoxy-1,2-oxaphosphol-3-ene 2-Oxides.”	4,521	15 (K)
3	Konieczny, M.T.; <b>Cushman, M.</b> <i>Tetrahedron Lett.</i> <b>1992</b> , 33, 6939, „A Novel Synthesis of Compounds Containing a Fused Pyrrole Ring from Cyclic Ketones and N-BOC-L-Phenylalaninal.”	2,509	11 (K)
4	Konieczny, M.T.; Toma, P.H.; <b>Cushman, M.</b> <i>J. Org. Chem.</i> <b>1993</b> , 58, 4619; „Synthesis of Hydroxyethylene Isosters of the Transition State of the HIV Protease – Catalyzed Phe-Pro Hydrolysis: Reaction of 2-[(Boc)amino]-1-(2'-oxocyclopentyl)-3-phenylpropanols with Diethyl Phosphorocyanidate and Lithium Cyanide Followed by Samarium Iodide.”	3,790	14 (K)
5	<b>Konieczny, M.</b> <i>Biotechnologia</i> <b>1998</b> , 2(41), 186 – 189; „Ochrona patentowa wynalazków”.	-	2 (K)
6	<b>Konieczny, M.T.</b> <i>Acta Polon. Pharmaceut.</i> <b>2000</b> , 57 (supplement), 84 – 87; „Patent protection of pharmaceuticals.”	-	5 (K)
7	<b>Konieczny, M.T.</b> ; Zanka, A. <i>J. Chem. Educ.</i> <b>2003</b> , 80, 248 – 250; „Process Development as a Curriculum Component in Organic Chemistry Courses: Points of View from Academia and Industry”	0,500	8 (K)
8	<b>Antonini, I.</b> ; Polucci, P.; Magnano, A.; Cacciamani, D.; Konieczny, M.T.; Paradziej-Łukowicz, J.; Martelli, S. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> <b>2003</b> , 11, 399- 405; „Rational Design, Synthesis and Biological Evaluation of Thiadiazinoacridines: A New Class of Antitumor Agents.”	2.043	11 (K)
PATENTY I ZGŁOSZENIA PATENTOWE			
1	Konieczny, M.; Chołody, W. <i>Patent PL 149682</i> , <b>1990</b> ; „Sposób otrzymywania 4'-(9-akrydynyloamino)-3'-metoksymetanosulfonanilidu.”	-	12 (K)
2	Konieczny, M. <i>Patent PL 164184</i> , <b>1994</b> ; „Sposób otrzymywania 5,5-	-	12 (K)



dimetylo-3-[4'-nitro-3'-trifluorometylo/fenylo]-2,4-imidazolidynodionu.”

- |   |   |   |        |
|---|---|---|--------|
| 3 | Konieczny, M.; Potrykus, A. <i>Patent PL 167850, 1995</i> ; „Sposób otrzymywania 3'-(trifluorometylo)-4'-nitroanilidu kwasu izomasłowego.”  | - | 12 (K) |
| 4 | Konieczny, M.T.; Konopa, J.K. <i>Patent EP 0929552, 1999</i> i <i>Patent US 6,229,015, 2001</i> ; „Acridone derivatives and preparation of 8-hydroxy-imidazoacridinone derivatives;”. | - | 24 (K) |
| 5 | Konieczny M.T. <i>Zgłoszenie patentowe PL 363457, 2003</i> , „Nowe karboksamidynowe pochodne dibenz[b,f]azepiny i ich sole oraz sposób ich otrzymywania.”                             | - | -      |

#### KOMUNIKATY ZJAZDOWE

- |   |   |   |          |
|---|---|---|----------|
| 1 | Konieczny, M.; Abramovitch, R.A.; Kishore, D. 55 <sup>th</sup> Annual Meeting of the South Carolina Academy of Sciences, Clemson, March 18, 1982, <i>Bull. South Carolina Acad. Sci</i> , 1982, 44, 73.; "The reaction of pyridine 1-oxide with methyl propiolate." | - | 0,25 (K) |
| 2 | Konieczny M.T. Zjazd PTCh, Bydgoszcz, 2-5 września 1987, <i>Streszczenie V-86p</i> , „Nowa propozycja mechanizmu redukcji NADH.”  | - | 0.25 (K) |
| 4 | Konieczny, M. The Second Multidisciplinary Conference on Drug Research, Jelenia Góra - Cieplice, April 5-7, 2000, <i>Book of Abstracts, abstract K-7</i> ; "Use of patents in Medicinal Chemistry."   | - | 0.25 (K) |
| 5 | Konieczny, M.T. The Third Multidisciplinary Conference on Drug Research, Piła, May 13-16 2002, <i>Book of Abstracts, abstract W-29</i> ; "Formulation of Claims in Pharmaceutical Patents."   | - | 0.25 (K) |

**Suma punktów: IF – 14,427**

**KBN – 136**

### **3. WPROWADZENIE – GENEZA TEMATU**

#### **3.1. Wstęp**

Przedstawiana rozprawa prezentuje wyniki pracy, której celem było otrzymanie siarkowych analogów flawonoidów i ich ocena jako potencjalnego źródła nowych substancji biologicznie czynnych. Siarkowe pochodne flawonoidów są stosunkowo mało poznane (rozdział 3.4) a ich podobieństwo strukturalne do wyjątkowo aktywnych analogów tlenowych (rozdział 3.3) pozwalało przypuszczać, że i wśród nich znajdują się związki o dużej aktywności.

Inicjatorem projektu była japońska firma farmaceutyczna TAIHO Pharmaceuticals i zgodnie z zawartą z tą firmą umową, początkowo naszym celem było poszukiwanie siarkowych analogów flawonoidów wykazujących działanie antyoksydacyjne, chemoprewencyjne i/lub przeciwnowotworowe. Po zakończeniu współpracy z TAIHO, projekt był realizowany we współpracy z kilkoma, wymienionymi niżej, ośrodkami akademickimi w Polsce. Nadal głównym kierunkiem naszego zainteresowania było działanie przeciwnowotworowe otrzymywanych związków lecz badania rozszerzono o ocenę własności przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybowych, przeciwgruźliczych a ostatnio również przeciwwirusowych. Zmianie uległ nie tylko zakres testów biologicznych lecz również rodzaj badanych układów flawonoidowych. Początkowo były to głównie pochodne tioflawanonu i tioflawonu, następnie tioauronu a jeszcze później chalkonu. Wspólną cechą strukturalną otrzymywanych związków było to, że wszystkie zawierały podstawowy układ flawonoidowy i trzy potencjalne centra aktywne (dwa atomy tlenu i jeden atom siarki) związane z pierścieniem A tego układu.

Badania biologiczne przedstawione w rozprawie były prowadzone w następujących zespołach:

- TAIHO Pharmaceuticals
- Dr hab. inż. Andrzej Składanowski, Politechnika Gdańska: badania aktywności cytostatycznej oraz mechanizmu działania.
- Dr Joanna Wietrzyk, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, badania aktywności cytostatycznej.
- Prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski, Politechnika Gdańska, badania na grzybach i bakteriach.
- Prof. dr hab. Zofia Zwolska, Instytut Gruźlicy w Warszawie, badania aktywności przeciwgruźliczej.
- Prof. dr hab. inż. Bogusław Szewczyk, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG w Gdańsku; badania aktywności przeciwwirusowej.

Obecnie projekt jest nadal kontynuowany i jak podano w rozdziale 4.5., „najnowsza generacja” związków ma aktywność cytostatyczną *in vitro* o dwa rzędy większą od aktywności pochodnych wymienionych w tej rozprawie.

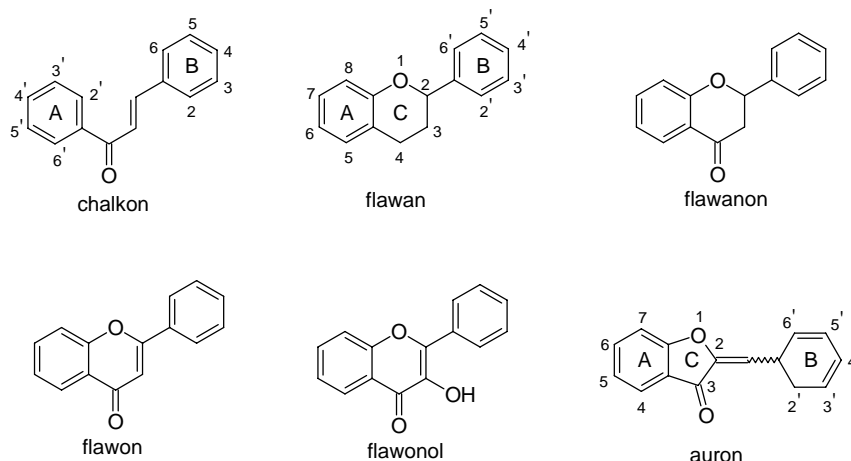
### 3.2. Budowa chemiczna flawonoidów

Nazwą flawonoidy jest określana grupa związków pochodzenia roślinnego oraz ich syntetycznych analogów zawierających dwa pierścienie fenyłowe połączone fragmentem strukturalnym zawierającym trzy atomy węgla, przy czym ten ostatni stanowi najczęściej część pierścienia heterocyklicznego. Na Rys. 1 podano wzory oraz nazwy najpopularniejszych układów flawonoidowych.

Związki pochodzenia naturalnego zawierające przedstawione układy strukturalne są zazwyczaj pochodnymi polihydroksylowymi i różnią się pomiędzy sobą ilością tych grup, miejscem podstawienia, oraz alkilacją podstawników hydroksylowych. Dotychczas wyizolowano z surowców roślinnych ponad 8 000 [7] flawonoidów a ich chemii oraz właściwościom poświęcono szereg książek i artykułów przeglądowych [1 – 30] .

Rysunek 1

Szkielety węglowe najpopularniejszych związków flawonoidowych



### 3.3. Aktywność biologiczna flawonoidów

W związku z ich wszechobecnością w świecie roślin, flawonoidy występują w znacznych ilościach w diecie człowieka, a ich obecności jest przypisywane lecznicze działanie wielu surowców zielarskich. Jednym z najpopularniejszych flawonoidów stosowanych w lecznictwie jest kwercetyna (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon), wchodząca w postaci

glikozydu z rutynozą w skład takich leków jak Rutinoscorbin i będąca prekursorem półsyntetycznych preparatów, np. Venoruton czy Detralexu, stosowanych w leczeniu chorób żył [31].

Rola flawonoidów w roślinach i ich wpływ na inne organizmy zostały omówione w szeregu doskonałych artykułów przeglądowych [1 – 30], w tym w wyczerpującej monografii opracowanej przez Theoharidesa i współpracowników, zatytułowanej „The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer” [5]. Aby pokazać różnorodność działania biologicznego flawonoidów, poniżej zacytowano spis treści tego artykułu, gdyż jest on dobrą listą kierunków działania omawianych związków.

#### *Effects on mammalian enzyme systems*

- Kinases
- Phospholipase
- ATPases
- Lipoxygenases and cyclooxygenases
- Phospholipase C
- Cyclic nucleotide phosphodiesterase
- Adenylate cyclase
- Reverse transcriptase
- HIV-1 proteinase
- HIV-1 integrase
- Ornithine decarboxylase
- Topoisomerase
- Glutathione S-transferase
- Epoxide hydrolase
- Glyoxalase
- Xanthine oxidase
- Aromatase
- 11- $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase
- Catechol-O-methyltransferase
- Aldose reductase
- Monoamine oxidase (FAD-containing)
- Aldo-keto-reductase family of
- Hyaluronidase
- Histidine decarboxylase and DOPA decarboxylase
- Malate dehydrogenase
- Lactic dehydrogenase and pyruvate kinase
- Aldehyde and alcohol dehydrogenases
- Amylase
- RNA and DNA polymerases
- Human DNA ligase I
- Ribonuclease
- Sialidase
- Cytochrome P450 systems
- Elastase
- Nitric-oxide synthase

#### *Modulation of the functions of inflammatory cells*

- T Lymphocytes
- B Lymphocytes
- Natural killer cells
- Macrophages and monocytes
- Mast cells and basophils
- Neutrophils
- Eosinophils
- Platelets
- Adhesion molecule expression

#### *Effects of flavonoids on other cells*

- Smooth muscle and cardiac muscle cells
- Effects on nerve cells
- Calcium homeostasis

#### *V. Endocrine and metabolic effects*

#### *VI. Antiviral effects*

#### *VII. Antitoxic, hepatoprotective, and cytoprotective effects*

#### *VIII. Antioxidant activity*

- Influence of flavonoids on reactive oxygen species production by phagocytic cells
- Effect of flavonoids on lipid peroxidation and oxyradical production

#### *IX. Actions in relation to coronary artery disease and vascular disorders*

#### *X. Flavonoid-vitamin C interactions*

#### *XI. Cancer-related properties*

- Microbial mutagenicity studies
- Genetic effects of flavonoids in mammalian cells
- Mutagenicity studies in vivo
- Carcinogenicity of flavonoids?
- Anticarcinogenic effects
- Apoptosis and cancer
- Antiproliferative activity
- Differentiating effects
- Adhesion/metastasis/angiogenesis
- Effect on heat shock proteins
- Effect on multidrug resistance

#### *XII. Effects on xenobiotic metabolism*

W ciągu sześciu lat, które upłynęły od ukazania się przeglądu Theoharidesa opublikowano dziesiątki nowych prac na ten temat. Na szczególną uwagę zasługują te, które omawiają nowe kierunki działania biologicznego flawonoidów, takie jak wpływ na P-glikoproteinę i/lub inne białka odpowiedzialne za oporność wielolekową [7, 9, 26, 28, 29] czy działanie przeciwpierwotniakowe [32].

### **3.4. Aktywność biologiczna tioflawonoidów**

Informacje na temat aktywności biologicznej tioflawonoidów opublikowane przed rokiem 1983 zostały podsumowane w rozdziale książki [33]. W tamtym okresie badano głównie aktywność

przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą oraz przeciwwirusową tych związków, i dla kilku pochodnych 1,1-ditlenku tioflawonu (**3**) wykazano istotne działanie w tym kierunku.

W 1984 roku Nakazumi opublikował wyniki porównawczego badania aktywności przeciwbakteryjnej pochodnych flawonu i tioflawonu **1 - 4** [34]. Praca ta jest interesująca z dwóch względów. Po pierwsze, wykazano w niej, że spośród badanych związków aktywność wykazują wyłącznie pochodne z atomem siarki utlenionym do sulfotlenku (**2**) lub sulfonu (**3**) (tabela 1) oraz, że aktywności pochodnych flawonu i tioflawonu są zbliżone. Po drugie, dla niektórych związków podano wartości toksyczności ostrej (tabela 2) i widać, że dla obu grup związków jest ona podobna i bardzo niska.

Rysunek 2

Struktury układów flawonoidowych badanych przez Nakazumi [34]

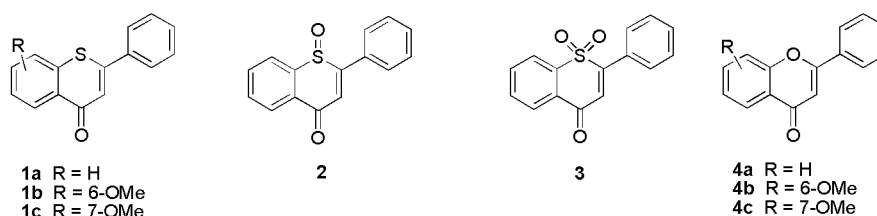


Tabela 1

Porównanie aktywność przeciwbakteryjnej pochodnych flawonu i tioflawonu [34]

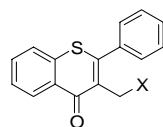
Związek	Aktywność przeciwbakteryjna (MIC, µg/ml)					
	<i>B. subtilis</i> K 49	<i>S. Aureus</i> NCTC 8530	<i>S. cerevisiae</i> IFO 0203	<i>C. utilis</i> OUT 6020	<i>P. crustosum</i> Thom	<i>R. Chinensis</i> IFO 4745
<b>1a – 1c</b>	> 800	> 800	> 800	> 800	> 800	> 800
<b>2</b>	100	400	12,5	25	100	100
<b>3</b>	800	800	3,13	1,56	12,5	> 800
<b>4a</b>	50	800	100	> 800	50	50
<b>4b, 4c</b>	> 800	> 800	> 800	> 800	> 800	> 800

Tabela 2.

Porównanie toksyczności ostrej pochodnych flawonu i tioflawonu [34]

Związek	Toksyczność ostra (LD <sub>50</sub> , g/kg)	
	doustnie	dootrzewnowo
<b>1a</b>	> 4,0	1,7
<b>4a</b>	2,5	0,61
<b>1b</b>	> 4,0	> 4,0
<b>4b</b>	> 4,0	> 4,0
<b>1c</b>	> 4,0	> 4,0
<b>4c</b>	> 4,0	1,2

W dalszych pracach Nakazumi wykazał, że znaczącą aktywność przeciwbakteryjną przeciw *Trichohtyton rubrum* IFO 5467 i *Trichophyton mentagrophytes* IFO 6202 wykazują pochodne tioflawonu o wzorze ogólnym **5**, gdzie X = np. Cl, Br, O-alkil [35, 36].



**5**

Niektóre pochodne **5** wykazują również słabą aktywność insektobójczą [37]. Związki o wzorze ogólnym **5** były również przedmiotem patentu amerykańskiego jako potencjalne leki do stosowania w chorobach układu oddechowego i wątroby [38].

Dhanak i współpracownicy badali wpływ związków **1** – **3** na proteazę cytomegalowirusa (HCMV) [39] i stwierdzili, że podobnie jak w przypadku aktywności przeciwbakteryjnej, najsilniejsze działanie wykazują pochodne sulfonowe **3** (tabela 3).

Tabela 3

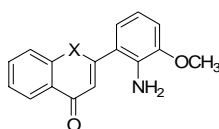
Porównanie hamowania proteazy HCMV przez pochodne tioflawonu **1** – **3** [39]

Związek	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>1a</b>	nieaktywny (IC <sub>50</sub> > 34 μM)
<b>2</b>	10
<b>3</b>	1,5

Aktywność związków **3** wzrasta po wprowadzeniu do pierścienia B grupy elektronobiorczej (-NO<sub>2</sub>) lub lipofilowej [39].

Lee i współpracownicy badali aktywność cytotoksyczną tioflawonów, jako izosterów aktywnych flawonów i 2-fenylo-4-chinolonów, i stwierdzili, że wprowadzenie atomu siarki w miejsce atomu tlenu (azotu) nie prowadzi do utraty aktywności [40]. Związki aktywne były podstawione w pierścieniu A grupami hydroksylowymi lub metoksyłowymi, jedynym niepodstawionym związkiem aktywnym był sulfotlenek **2**. Wykazali również, że niektóre z badanych związków działają jako inhibitory topoizomerazy [40].

Ostatnio, Kataoka i inni [41] badali działanie przeciwnowotworowe pochodnych tioflawonu podstawionych w pozycji 2'. Punktem wyjścia w ich pracy była pochodna flawonu **6** (związek PD98059), o której wiadomo, że wykazuje znaczące działanie przeciwnowotworowe, oraz że jej działanie polega na hamowaniu szlaku sygnalizacyjnego ERK-MAP kinazy.



**6**, X = O;      **7**, X = S

Stwierdzono, że pochodna tioflawonu **7** jest lepszym inhibitorem ERK-MAP kinazy niż pochodna flawonu **6** ( $IC_{50} = 1,88 \mu\text{M}$  w porównaniu z  $4,35 \mu\text{M}$  dla związku **6**), oraz że skuteczniej hamuje namnażanie komórek nowotworowych ( $IC_{50} = 8,6 \mu\text{M}$  w porównaniu z  $29,5 \mu\text{M}$  dla komórek HT1080, oraz  $IC_{50} = 10,0 \mu\text{M}$  w porównaniu z  $30,5 \mu\text{M}$  dla komórek WiDr). Zastąpienie grupy aminowej grupą nitrową lub usunięcie grupy metoksyowej prowadziło do całkowitego zaniku aktywności [41].

### 3.5. Flawonoidy jako związki wyjściowe w projektowaniu nowych leków – rozwój koncepcji pracy

Uważa się, że flawonoidy stanowią bardzo obiecujące źródło potencjalnych leków i rzeczywiście literatura przedstawiona w części 3.3. pokazuje jak powszechne jest wśród nich występowanie aktywności biologicznej. Tak jak podano we wstępie, naszym pierwotnym celem było otrzymanie związków o aktywności chemoprewencyjnej i antyoksydacyjnej i na te kierunki działania flawonoidów zwróciliśmy szczególną uwagę. W tabeli 4 przedstawiono, ważniejsze z opublikowanych dotychczas zależności struktura - aktywność dla działania antyoksydacyjnego.

Tabela 4

Zależności struktura-aktywność dla działania antyoksydacyjnego flawonoidów

Nr	Stosowany test	Korzystne cechy strukturalne	Lit.
1	Hamowanie indukowanej peroksydacji w mikrosomach z wątroby szczura.	Aktywność zapewnia układ katecholowy w pierścieniu B, zwiększa ją wprowadzenie dodatkowych grup OH. Obecność grupy 3-OH wystarcza do pojawienia się aktywności. O-glikozydacja w pozycji C-7 nieco zmniejsza aktywność.	42
2	Zdolność do wychwytywania wolnych rodników generowanych nadtlenkowych	Aktywność wzrasta ze wzrostem ilości grup hydroksylowych w pierścieniu B. Obecność grupy hydroksylowej w pozycji 3 oraz jej glikozydacja	43



	przez fotolizę UV wody nie wpływają na aktywność utlenionej.		
3	Hamowanie indukowanej peroksydacji jonami żelaza w układzie zawierającym kwas linolenowy	Aktywności sprzyja obecność wiązania podwójnego C2-C3, grupy ketonowej na C4, grupy hydroksylowej na C3, dwóch grup hydroksylowych <i>meta</i> w pierścieniu A i dwóch grup hydroksylowych <i>orto</i> w pierścieniu B. Glikozydacja grupy 3-OH lub 7-OH znosi aktywność.	43
4	Hamowanie indukowanej peroksydacji jonami metali mięsa ryby	Aktywności antyoksydacyjnej sprzyja polihydroksylacja pierścieni A i B, obecność wiązania podwójnego C2-C3, wolna grupa hydroksylowa w pozycji 3 oraz obecność grupy 4-keto.	44
5	Hamowanie indukowanej peroksydacji żelazem z mikrosomach z wątroby szczura	Za działanie antyoksydacyjne jest odpowiedzialna w obecność układu 1,4- lub 1,2-hydrochinonu w pierścieniu A i/lub B.	45
6	Zdolność do wychwytywania anionów nadtlennokowych generowanych enzymatycznie za pomocą oksydazy hipoksantyno - ksantynowej	Zdolność do wychwytywania wolnych rodników z ilością grup hydroksylowych w pierścieniu B, grupa 3-OH zwiększa aktywność a jej metylacja i/lub glikozydacja zmniejszają aktywność. Wiązanie podwójne C2-C3 i grupa karbonylowa w pozycji 4 zmniejszają aktywność.	46
7	Hamowanie nieenzymatycznie (Fe <sup>+2</sup> , askorbinian) lub enzymatycznie (doksorubicyna) peroksydacji w mikrosomach z wątroby szczura.	Dobra zdolność wyłapywania rodników wymaga ugrupowania katecholowego w pierścieniu B. Grupa 3-OH w połączeniu z wiązaniem podwójnym C2-C3 zwiększa aktywność.	47
8	Hamowanie utleniania kwasu linolenowego w micelach dodecylosulfonianu sodu (SDS)	Nieważna jest ilość grup OH oraz to czy są obecne w pierścieniu A lub B, istotne znaczenie ma jedynie obecność układu ortohydrochinonu.	48

		Obecność grupy karbonylowej w pozycji 4 zwiększa aktywność.	
9	Artykuł przeglądowy, przedstawione wnioski są oparte na wynikach wielu różnych badań.	Zdolność do wychwytywania wolnych rodników Aktywności sprzyjają zwłaszcza obecność ugrupowania katecholowego w pierścieniu B i wiązanie podwójne C2-C3 sprzężone z grupą karbonylową. Ponadto aktywności sprzyja grupa 3-OH, podczas gdy dodatkowe grupy hydroksylowe lub metoksyłowe w pozycjach 3, 5 lub 7 wydają się być mniej istotne. Glikozydacja grupy 3-OH znacząco zmniejsza aktywność.	6
10	Artykuł przeglądowy, przedstawione wnioski są oparte na wynikach wielu różnych badań.	Działanie antyoksydacyjne zależy przede wszystkim od obecności ugrupowania katecholowego w pierścieniu B. Poza tym od obecności wiązania podwójnego C2-C3 sprzężonego z grupą karbonylową na C4 i od obecności grup funkcyjnych zdolnych do wiązania jonów metali przejściowych, takich jak żelazo czy miedź.	49

Przytłaczająca większość przytoczonych powyżej wyników dotyczy związków pochodzenia naturalnego, czyli związków fenolowych. W związku z tym, nawet w oparciu o tak obszerne dane trudne wydaje się wykorzystanie tych zależności do projektowania nowych pochodnych flawonoidów z podstawnikami innymi niż hydroksylowe, a nawet z modyfikacjami polegającymi tylko na alkilowaniu lub acylowaniu związków naturalnych. Tymczasem wpływ modyfikacji grup fenolowych na aktywność *in vivo* to zagadnienie o podstawowym znaczeniu, gdyż jednym z głównych problemów w opracowywaniu farmakologicznie użytecznych form flawonoidów jest ich niska biodostępność, związana, między innymi, z bardzo szybkim metabolizmem, polegającym na tworzeniu glukuronianów, siarczanów i pochodnych metylowych, oraz na utlenianiu do kwasów fenolowych [10 – 14, 50 - 59]. Uwzględnienie tego czynnika w testach prowadzonych *in vitro* stanowi bardzo poważne wyzwanie dla farmakologów [60]. Pomimo rosnącej ilości prac na ten temat, absorpcja i metabolizm flawonoidów nadal są stosunkowo słabo poznane, a na dodatek przytłaczająca

większość prac dotyczy kwercetyny, jej glikozydów lub bliskich analogów. W związku z tym wszelkie rozważania na temat związków z podstawnikami innymi niż hydroksylowe, metoksyłowe lub glikozydowe muszą się obracać raczej w sferze hipotez niż faktów.

Dla kierunków działania innych niż antyoksydacyjne, zależności struktura - aktywność są poznane w mniejszym stopniu. Na dodatek, jak pokazano w cytowanej wyżej literaturze, wiele z tych pochodnych oddziałuje z bardzo różnymi receptorami. Przy projektowaniu nowych leków jest to poważna trudność, gdyż w związku z powyższym można oczekiwać wielu niepożądanych efektów ubocznych. Ten brak selektywności w oddziaływaniu z biocząsteczkami znajduje też swoje odbicie w trudnościach napotykanym przy testowaniu flawonoidów *in vitro* metodami biochemicznymi, gdyż flawonoidy, tak jak i inne polifenole należą do związków, które bardzo często dają w tych testach pozorne wyniki pozytywne, będące wynikiem nieselektywnych oddziaływań fizykochemicznych [61].

Wobec niejednoznaczności przedstawionych w tabeli 4 wyników przyjęliśmy, że podobieństwo projektowanych przez nas cząsteczek do związków pochodzenia naturalnego nie będzie miało zasadniczego znaczenia. Z punktu widzenia własności chemoprewencyjnych istotne będą natomiast dwie cechy:

- łatwość przechwytywania rodnika, a tę powinna zapewnić już sama obecność grup fenolowych [62, 63]
- oraz możliwość stabilizacji utworzonego anionorodnika i jego przejścia w cząsteczkę obojętną, co powinno zależeć w dużym stopniu od ilości i położenia grup fenolowych [62 - 67].

Po analizie odpowiedniej literatury [64 - 67] doszliśmy do wniosku, że wprowadzenie do cząsteczki układu p-hydrochinonu powinno dać cząsteczki o pożądanym własnościach.

Naturalne flawonoidy bardzo rzadko zawierają układ p-hydrochinonu [68]. Do takich wyjątków należą 5,8-dihydroksyflawon (primetina) [69 – 70] oraz wyizolowany niedawno ze szpinaku 4',5,8-trihydroksyflawanon [71]. Ostatnio ukazało się również kilka prac poświęconych aktywności biologicznej syntetycznych pochodnych 2',5'-dihydroksychalkonu [72 – 74].

Połączenie uzasadnionej wyżej decyzji o wyborze układu p-hydrochinonu z wymaganiem zleciodawcy, aby syntezowane związki były pochodnymi tioflawonoidów doprowadziło do sformułowania programu, wyniki którego przedstawiono w rozdziałach 4.1. i 4.4..

O zainteresowaniu pochodnymi tioauronu (rozdział 4.2.) zadecydowało przypadkowe otrzymanie tych związków. Mając już je w rękę, stwierdziliśmy, że interesujące może być porównanie ich aktywności biologicznej z aktywnością otrzymanych wcześniej

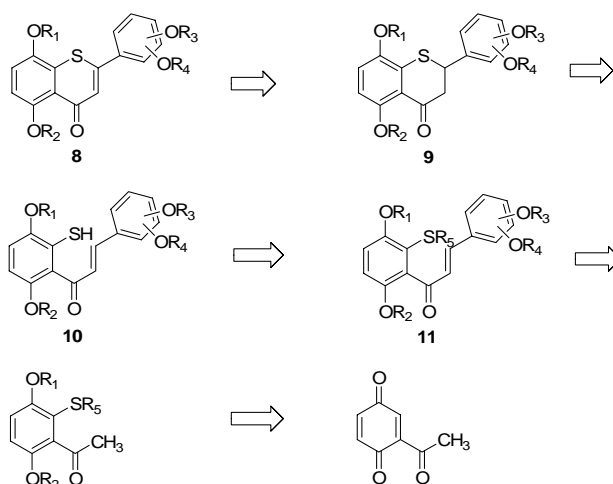
tioflawanonów i tioflawonów, a więc porównanie aktywności różnych układów flawonoidowych, zawierających wspólny układ Ph-C-C-C-Ph, w którym oba pierścienie fenyłowe są podstawione tymi samymi atomami w takich samych pozycjach. Założyliśmy, że w tak bliskich analogach strukturalnych może istnieć taka sama grupa farmakoforowa lecz wbudowana w cząsteczki różniące się nieznacznie wielkością, stopniem usztywnienia cząsteczki, lipofilowością, rozpuszczalnością i innymi cechami wpływającymi z jednej strony na powinowactwo do receptora a z drugiej na własności farmakokinetyczne otrzymywanych pochodnych, oraz że dla tak skonstruowanego zbioru cząsteczek uda się uzyskać użyteczne korelacje struktura – aktywność. Ta sama koncepcja doprowadziła do syntezy pochodnych chalkonu (rozdział 4.3.).

## 4. WYNIKI WŁASNE

### 4.1. Synteza pochodnych tioflawanonu, tioflawonu i ich ditlenków [75, 76]

Rozważania przedstawione w części 3.5., wsparte serią prób pilotowych, doprowadziły do opracowania koncepcji syntezy przedstawionej na schemacie 1.

Schemat 1

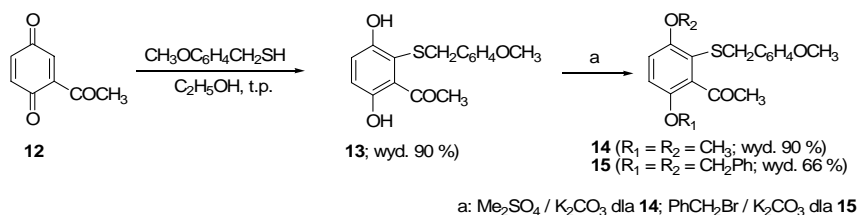


Potencjalnie, przedstawiona strategia dawała możliwość otrzymania do badań biologicznych serii pochodnych chalkonu (**10**, **11**), flawanonu (**9**) i flawonu (**8**), przy czym dla każdej z tych grup istniała duża możliwość modyfikacji grup R<sub>1</sub> - R<sub>4</sub> na atomach tlenu. Rolę głównego "stabilizatora" anionorodników miał pełnić układ p-chinoidowy umieszczony w pierścieniu A, przy czym jedna z jego grup hydroksylowych była w pozycji 5 pierścienia flawonowego (odpowiadającej pozycji 2' chalkonów **10** i **11**), co jest uznawane na podstawie wyników eksperymentalnych za istotne dla aktywności antyoksydacyjnej flawonoidów.

Sposób realizacji przedstawionej koncepcji jest pokazany na schematach 2 - 7 i w tabelach 5 - 7, poniżej.

Pierwszym etapem syntezy była reakcja acetylochironu (**12**) z p-metoksybenzylotiolem, w wyniku której otrzymano hydrochiron **13** (schemat 2). Dalsze etapy syntezy wymagały ochrony grup fenolowych i z tego powodu związek **13** przeprowadzono w eter metylowy **14** i benzyłowy **15**, uzyskując substraty dające odmienne możliwości deprotekcji grup fenolowych.

## Schemat 2



Pochodne acetofenonu **14** i **15** przeprowadzono w pochodne chalkonu **16** – **21**, kondensując je w warunkach katalizy międzyfazowej z pochodnymi benzaldehydu (schemat 3, tabela 5).

## Schemat 3

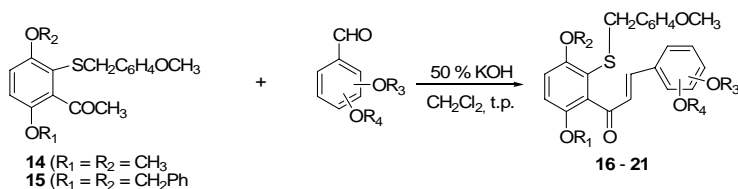


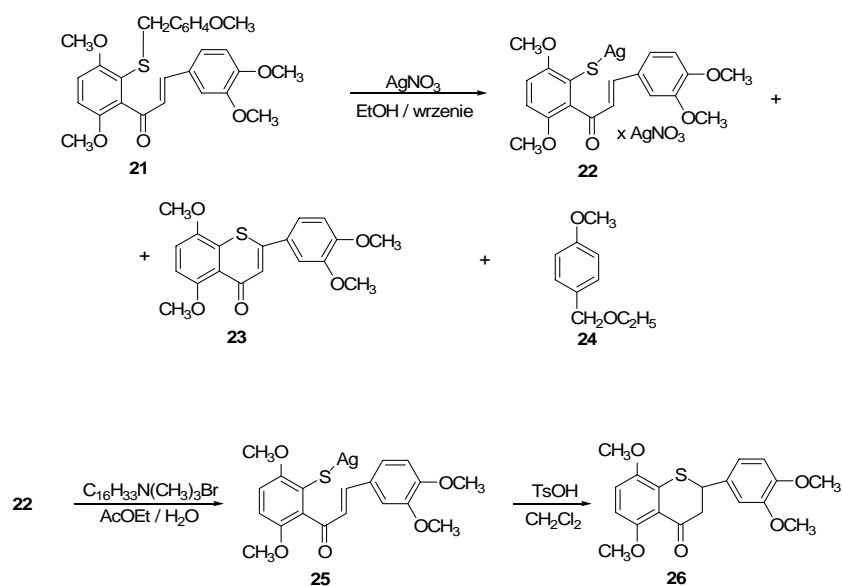
Tabela 5

Chalkony otrzymane w wyniku reakcji przedstawionej na schemacie 3

Związek nr	OR <sub>1</sub>	OR <sub>2</sub>	OR <sub>3</sub>	OR <sub>4</sub>	Wyd. %
<b>16</b>	2'-OBn	5'-OBn	3-OBn	4-OBn	90
<b>17</b>	2'-OBn	5'-OBn	2-OBn	4-OBn	51
<b>18</b>	2'-OBn	5'-OBn	2-OBn	3-OBn	86
<b>19</b>	2'-OBn	5'-OBn	3-OMe	4-OMe	73
<b>20</b>	2'-OMe	5'-OMe	3-OBn	4-OBn	45
<b>21</b>	2'-OMe	5'-OMe	3-OMe	4-OMe	66

Próby cyklizacji otrzymanych chalkonów w kwasie mrówkowym, wg procedury Taylora – Deana [77], prowadziły nieodmiennie do skomplikowanych mieszanin produktów, powstających na skutek częściowej deprotekcji grup fenolowych i niepożądanego cyklizacji do flawanonów poprzez atom tlenu w pozycji 2' chalkonu. W tej sytuacji zdecydowano się na opracowanie całkowicie nowej metody deprotekcji tioeterów p-metoksybenzylowych z wykorzystaniem dużego powinowactwa siarki do jonów srebrnych (schemat 4).

#### Schemat 4



Ogrzewanie tioeterów p-metoksybenzylowych (n.p. **21**) z etanolem z roztworem azotanu srebra prowadziło do powstania kompleksu **22** zawierającego dwa atomy srebra oraz jon azotanowy, oraz eteru **24**. Powstawanie eteru **24** dowodzi, że odszczepiający się karbokation ulegał neutralizacji reagując z etanolem. Z produktów ubocznych reakcji wyizolowano niewielkie ilości tioflawonu **23**. Próba usunięcia srebra z kompleksu **22** za pomocą bromku cetylotrimetyloamoniowego prowadziła do powstania związku **25**, który wciąż zawierał jeden atom srebra. Związek **25** ulegał rozbiciu pod wpływem kwasu p-toluenosulfonowego, a powstająca pochodna chalkonu ulegała w tych warunkach cyklizacji do tioflawanonu **26**. Otrzymane za pomocą opisanej reakcji pochodne tioflawanonu pokazano w tabeli 6.

O ile mi wiadomo, przedstawiona wyżej metoda jest jedyną pozwalającą na deprotekcję tioeterów p-metoksybenzylowych w warunkach niemal całkowicie obojętnych (wrzący roztwór azotanu srebra w etanolu). Próby jej zastosowania do tioeterów benzylowych zawiodły co dowodzi, że rozszczepienie wiązania eterowego jest możliwe tylko dzięki dodatkowej stabilizacji powstającego karbokationu benzylowego przez grupę p-metoksyłową. Deprotekcja grup fenolowych prowadzona za pomocą kompleksu trifluorok boru – siarczek dimetylowy lub chlorek glinu – dimetyloanilina dała związki docelowe z wolnymi grupami hydroksylowymi (tabela 6).

Tabela 6

Tioflawanony otrzymane w wyniku reakcji przedstawionej na schemacie 4 (związki **26 – 31**) oraz w wyniku deprotekcji grup hydroksylowych (związki **32 – 35**)

Związek nr	OR <sub>1</sub>	OR <sub>2</sub>	OR <sub>3</sub>	OR <sub>4</sub>	Wyd. %
<b>26</b>	5-OMe	8-OMe	3'-OMe	4'-OMe	50
<b>27</b>	5-OBn	8-OBn	3'-OBn	4'-OBn	61
<b>28</b>	5-OBn	8-OBn	2'-OBn	4'-OBn	41
<b>29</b>	5-OBn	8-OBn	2'-OBn	3'-OBn	26
<b>30</b>	5-OBn	8-OBn	3'-OMe	4'-OMe	30
<b>31</b>	5-OMe	8-OMe	3'-OBn	4'-OBn	33
<b>32</b>	5-OH	8-OH	3'-OH	4'-OH	30 <sup>a</sup> , 0 <sup>b</sup> , 59 <sup>c</sup>
<b>33</b>	5-OH	8-OH	2'-OH	4'-OH	28 <sup>d</sup>
<b>34</b>	5-OH	8-OH	2'-OH	3'-OH	23 <sup>d</sup>
<b>35</b>	5-OH	8-OMe	3'-OH	4'-OH	11 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> - otrzymany w wyniku deprotekcji związku **27** z użyciem AlCl<sub>3</sub> - dimetyloaniliny

<sup>b</sup> - otrzymany w wyniku deprotekcji związku **31** z użyciem AlCl<sub>3</sub> - dimetyloaniliny

<sup>c</sup> - otrzymany w wyniku deprotekcji związku **31** z użyciem BF<sub>3</sub> - Me<sub>2</sub>S

<sup>d</sup> - otrzymany, odpowiednio, w wyniku deprotekcji związków **29**, **30** i **31** z użyciem AlCl<sub>3</sub> – dimetyloaniliny.

Wychodząc z opisanych wyżej pochodnych tioflawanonu otrzymano, poprzez odwodornienie za pomocą DDQ, odpowiednie pochodne tioflawonu (schemat 5, tabela 7).

Schemat 5

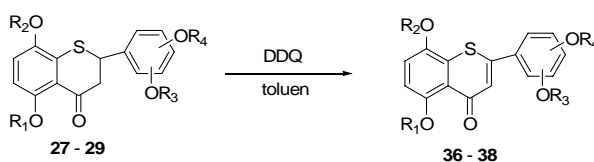


Tabela 7

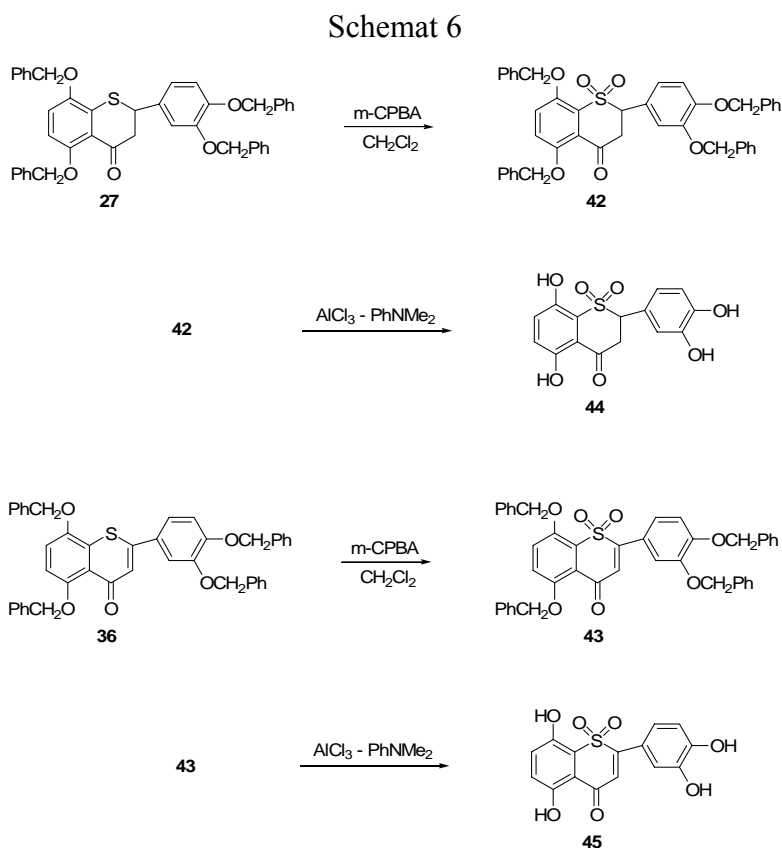
Tioflawony otrzymane w wyniku reakcji przedstawionej na schemacie 5 oraz produkty ich deprotekcji

Związek nr	OR <sub>1</sub>	OR <sub>2</sub>	OR <sub>3</sub>	OR <sub>4</sub>	Wyd. %
<b>36</b>	5-OBn	8-OBn	3'-OBn	4'-OBn	55
<b>37</b>	5-OBn	8-OBn	2'-OBn	4'-OBn	62
<b>38</b>	5-OBn	8-OBn	2'-OBn	3'-OBn	64
<b>23</b>	5-OMe	8-OMe	3'-OMe	4'-OMe	18
<b>39</b>	5-OH	8-OH	3'-OH	4'-OH	30
<b>40</b>	5-OH	8-OH	2'-OH	4'-OH	16
<b>41</b>	5-OH	8-OH	2'-OH	3'-OH	19

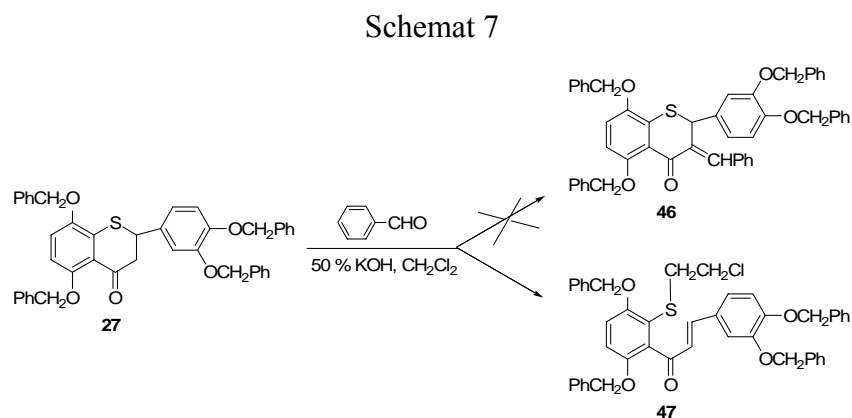
Ponadto, wybraną pochodną tioflawanonu (**27**) i pochodną tioflawonu (**36**) utleniono do odpowiednich 1,1-ditlenków **42** i **43**, gdyż w oparciu o informacje podane powyżej w części



3.4. można było oczekiwać, że związki te będą aktywniejsze niż pochodne nieutlenione (schemat 6).



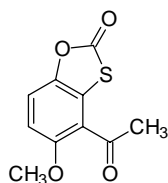
Interesujący produkt uzyskano niespodziewanie podczas próby kondensacji tioflawanonu **27** z benzaldehydem, gdyż zamiast spodziewanej pochodnej 3-benzylidenuj **46** powstał chalkon **47**, będący wynikiem otwarcia pierścienia i reakcji powstałego tiolu z chlorkiem metylenu użytym jako rozpuszczalnik (schemat 7).



Otrzymane związki były przekazane firmie TAIHO Pharmaceutical Co, która prowadziła badania ich aktywności biologicznej. Niestety, Zleceniodawca nigdy nie udostępnił nam uzyskanych wyników, wiadomo nam jedynie, że przynajmniej część z otrzymanych pochodnych wykazała aktywność chemoprewencyjną.

#### 4.2. Synteza pochodnych tioauronu [78, 79, 80, 81, 82]

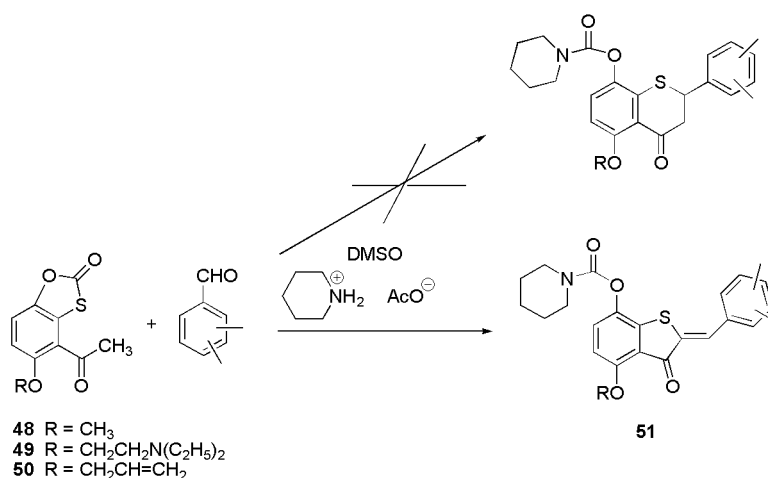
Opisana w punkcie 4.1. metoda syntezy z wykorzystaniem ochrony grupy tiolowej za pomocą eteru p-metoksybenzylowego zapewniała możliwość syntezy dużej grupy żądanych pochodnych, jednakże ze względu na cenę p-metoksybenzylotiolu była dość droga, a ze względu na jego zapach uciążliwa. Z powyższych względów postanowiliśmy opracować nową metodę syntezy pochodnych 5,8-dihydroksytioflawanonu, wychodząc z łatwo dostępnego 4-acetylo-5-metoksybenzoksatiol-2-onu (**48**).



**48**

Ku swemu zaskoczeniu stwierdziliśmy, że kondensacja związku **48** z aldehydami aromatycznymi w warunkach reakcji Knoevenagela, wobec octanu piperydyny daje nie spodziewane tioflawanony a pochodne tioauronu (schemat 8).

Schemat 8



Najlepsze wydajności tioauronów uzyskano prowadząc reakcje w DMSO wobec octanu piperydyny, otrzymane związki pokazano w tabeli 8.

Tabela 8

Tioaurony **51** otrzymane w wyniku reakcji przedstawionej na schemacie 8

Nr związku	Substrat	Wydajność (%)	Podstawniki w pierścieniu A	Podstawniki w pierścieniu B
52	48	62	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-OCH <sub>3</sub> ; 4'-OCH <sub>3</sub>
53	48	21	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-OH; 4'-OH
54	48	8	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OH	3'-OH; 4'-OH
55	48	29	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	4'-Br
56	48	51	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	-
57	48	19	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	pirydynyl-4
58	48	57	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	2'-OCH <sub>3</sub> ; 3'-OCH <sub>3</sub> e
59	48	19	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>
60	48	58	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	4'-OH
61	48	27	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-OH
62	48	48	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-OCH <sub>3</sub> ; 4'-OH
63	48	36	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	4'-Cl
64	48	42	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-Cl
65	48	30	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	2'-Cl
66	48	52	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-Br; 4'-OH; 5'-OCH <sub>3</sub>
67	48	55	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	4'-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
68	48	10	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	4'-NO <sub>2</sub>
69	48	29	4-OCH <sub>3</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-Br; 4'-OCH <sub>3</sub> ; 5'-OCH <sub>3</sub>
70	49	35	4-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-Cl
71	50	42	4-OCH <sub>2</sub> CH=CH <sub>2</sub> ; 7-OCONC <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	3'-Cl

Strukturę otrzymanych związków udowodniono na podstawie analiz elementarnych oraz widm IR, i NMR. Ze względu na nieoczekiwaną strukturę produktów, bardzo starannie przeprowadzono dowód budowy szkieletu węglowego, tak aby jednoznacznie wykluczyć alternatywny układ tioflawonu. I tak, widma NMR gHMBC wykonane dla wybranych pochodnych, wykazały sprzężenie długiego zasięgu pomiędzy węglami 2' i 6' a egzocyklicznym wodorem  $\alpha$ , co potwierdziło strukturę auronu. Dla alternatywnej struktury flawonu wystąpienie takiego sprzężenia wydaje się niemożliwe.



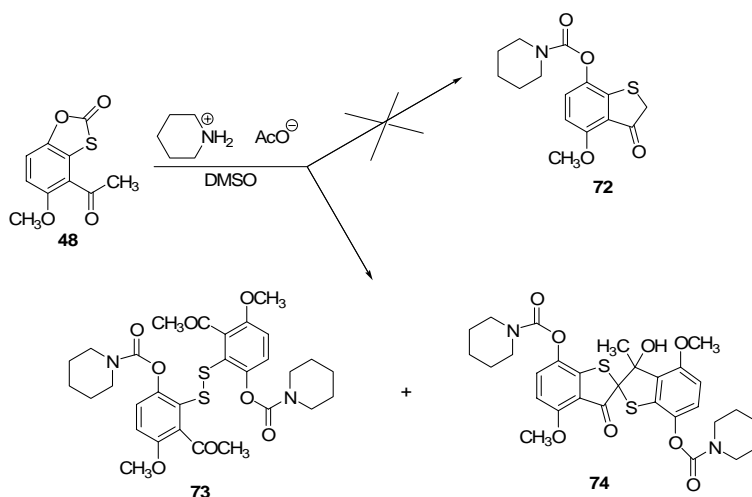
Pomiar stałej sprzężenia pomiędzy węglem karbonylowym (węgiel 3) a wodorem  $\alpha$  wykazał, że wynosi ona  $J = 5 - 6$  Hz. Dowodziło to, że grupa karbonylowa i wodór  $\alpha$  są w położeniu *cis*, gdyż dla alternatywnego izomeru *trans* stała sprzężenia powinna wynosić ok. 12 - 15 ppm

[83, 84]. Fakt, że otrzymane tiourony **51** są izomerami Z jest zgodny z wcześniejszymi pracami, w których wykazano, że izomer ten jest termodynamicznie trwalszy [78, 85 - 88]. Zastosowana przez nas metoda ustalenia izomerii otrzymanych pochodnych wydaje się być pewniejsza od opracowanej przez O'Sullivan [88] opartej na różnicy przesunięć chemicznych wodoru  $\alpha$  w izomerach Z i E, gdyż ta ostatnia wymaga, zasadniczo, porównania obydwu izomerów, czy też od metody opartej na różnicach w widmach UV obydwu izomerów [86, 87, 89].

Przedstawiona metoda syntezy tioauronów (schemat 8) wydaje się mieć charakter ogólny i nie jest w znaczącym stopniu zależna od podstawników obecnych w aldehydzie. Octan piperydiny zastosowany jako katalizator i reagent może być zastąpiony przez octany innych amin, łącznie z octanem amonu, jednakże zastosowanie soli piperydiny dawało dobrze krystalizujące produkty i z tego względu stosowano ją we wszystkich syntezach. W większości przypadków reakcję prowadzono w atmosferze argonu, jednakże nie miało to zasadniczego wpływu na ich przebieg i reakcje prowadzone w normalnej atmosferze dawały podobny wynik. Reakcje powinny być prowadzone w warunkach bezwodnych, aby uniknąć hydrolizy grupy karbamoilowej. Powstająca w wyniku takiej hydrolizy pochodna 7-hydroksy, zwłaszcza gdy obecna w większych ilościach, była trudna do usunięcia przez krystalizację i musiała być usuwana przez ekstrakcję zimnym, rozcieńczonym roztworem wodorotlenku sodowego, lub chromatograficznie.

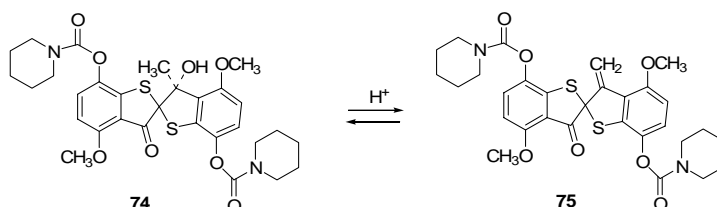
Mechanizm powstawania pochodnych tioauronu w reakcji przedstawionej na schemacie 8 był początkowo zupełnie niejasny. Wiadomo było, że powstawanie tioauronów z benzoksatiolonu **48** wymaga utlenienia na jednym z etapów przejściowych i jako możliwe utleniacze braliśmy pod uwagę DMSO i powietrze. W odpowiednim doświadczeniu, mieszaninę reakcyjną przemywano wolnym strumieniem argonu, który następnie przepuszczano przez acetonowy roztwór jodku metylu. Prowadziło to do powstawania bezbarwnego osadu, który na podstawie widma IR zidentyfikowano, poprzez porównanie z wzorcem, jako jodek trimetylosulfoniowy. Jego wydajność wynosiła 29 % w stosunku do substratu **48** i 48 % w stosunku do wyizolowanego tioauronu. Dowodziło to, że DMSO rzeczywiście gra rolę utleniacza. Jednakże, reakcja benzoksatiolonu **48** z 3,4-dimetoksybenzaldehydem w metanolu również dała odpowiedni auron (**52**), tyle że czas reakcji był dłuższy a wydajność produktu mniejsza (10 % w porównaniu z ok. 60 % w DMSO). Sugerowało to, że utlenianie za pomocą DMSO jest korzystne, lecz nie niezbędne.

Schemat 9



Przypuszczano, że w pierwszym etapie reakcji tworzy się pochodna benzotiofenu **72**, która następnie kondensuje z benzaldehydem dając auron, kondensacje takie są dobrze znane [78]. Aby to sprawdzić, wykonano reakcję benzoksatiolonu **48** z octanem piperydyny w DMSO bez aldehydu, w wyniku nie otrzymano oczekiwanego produktu lecz disiarczek **73** i spiro związek **74** (schemat 9). Przedłużenie czasu reakcji prowadziło wyłącznie do spiro związku **74**. Związek **74** jest niezmiernie interesujący tak ze względu na unikalną strukturę jak i niespodziewane własności chemiczne. W roztworach w DMSO i acetonie związek **74** istnieje jako mieszanina dwóch izomerów, pomiędzy którymi stopniowo ustala się równowaga, co doskonale widać na widmach  $^1\text{H}$  NMR. W roztworach chloroformowych związek **74** przechodził całkowicie w formę odwodnioną **75**, przemianę tę obserwowano wyłącznie na widmach NMR wykonywanych w roztworze  $\text{CDCl}_3$  a jej przyczyną były śladowe ilości chlorowodoru, praktycznie zawsze obecnego w chloroformie (schemat 10).

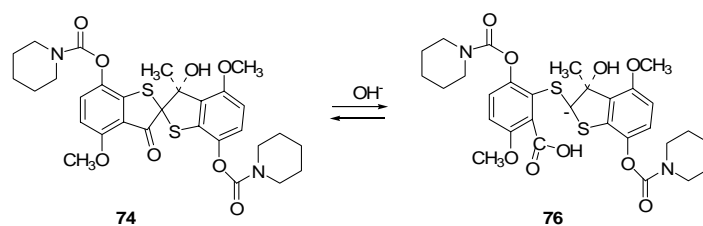
Schemat 10



Na tej podstawie początkowo zakładaliśmy, że równowaga pomiędzy izomerami ustala się poprzez tę odwodnioną formę z egzocyklicznym wiązaniem podwójnym **75**. Jednakże, inkubacja związku **74** w roztworze acetonowym z dodatkiem ciężkiej wody nie prowadziła do

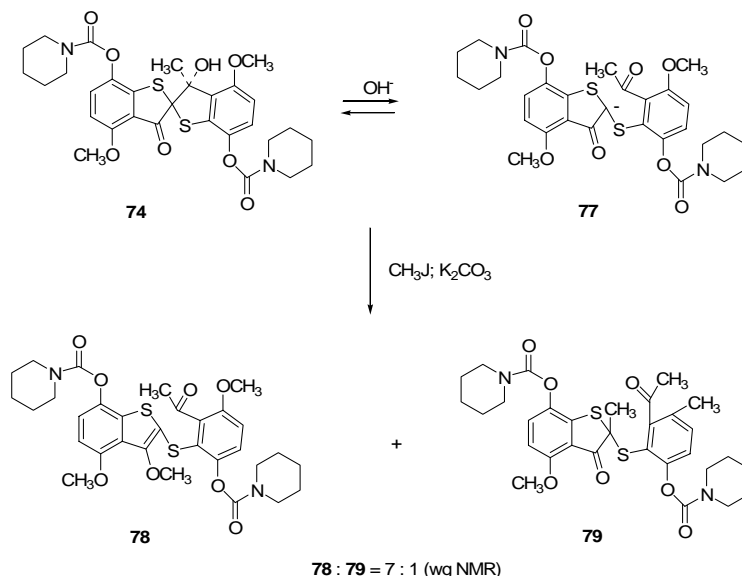
częściowej wymiany protonów grupy metylowej na deuter, mimo że następowała zmiana proporcji pomiędzy izomerami, co dowodziło, że izomeryzacja przebiega na innej drodze. Następnie rozpatrywaliśmy możliwość izomeryzacji poprzez karbanion **76** powstały w wyniku ataku nukleofilowego na grupę karbonylową i otworenie pierścienia (schemat 11). Hipotezę tę również odrzuciliśmy, gdyż inkubacja związku **74** z wodą znaczoną izotopem  $^{18}\text{O}$  nie doprowadziła do wzbogacenia związku **74** w ten izotop.

Schemat 11



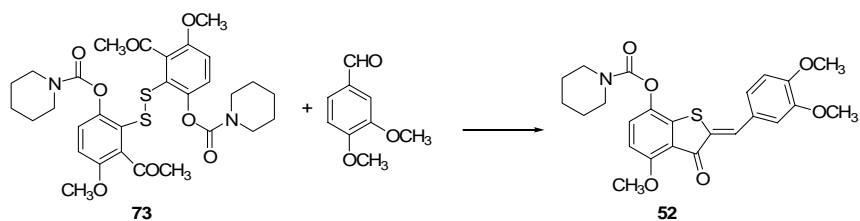
W tej sytuacji, najbardziej prawdopodobne jest, że izomeryzacja związku **74** następuje poprzez karbanion **77**, tworzący się poprzez deprotonowanie grupy hydroksylowej i otworenie pierścienia heterocyklicznego. Możliwość powstawania karbokationu **77** udowodniliśmy alkilując związek **74** jodkiem metylu wobec węgla potasowego, w wyniku czego otrzymaliśmy mieszaninę pochodnych metylowych **78** i **79** (schemat 12).

Schemat 12



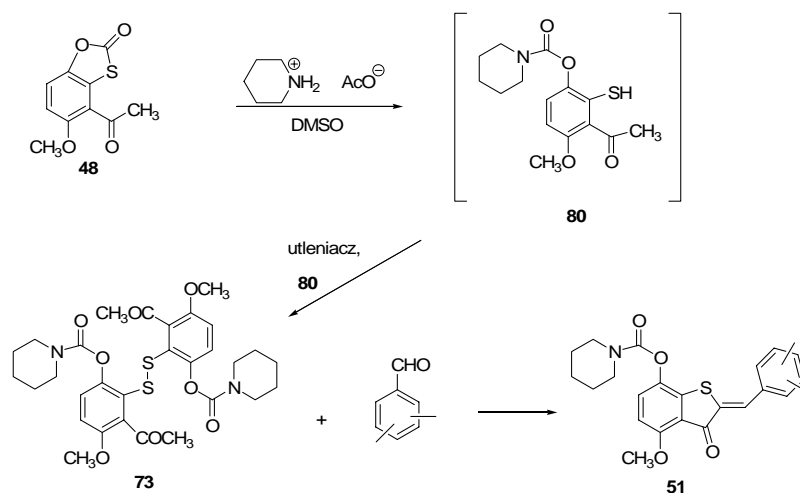
Tworzenie się disiarczku **73** (schemat 9) sugerowało, że to on może być poszukiwanym produktem przejściowym, jako że powstawanie tioauronów z disiarczkw było opisane wcześniej [90]. Rzeczywiście, ogrzewanie disiarczku **73** z 3,4-dimetoksybenzaldehydem w warunkach reakcji prowadziło do powstawania tioauronu **52** (schemat 13).

Schemat 13



W oparciu o przedstawione dane zaproponowaliśmy przebieg reakcji przedstawiony na schemacie 14.

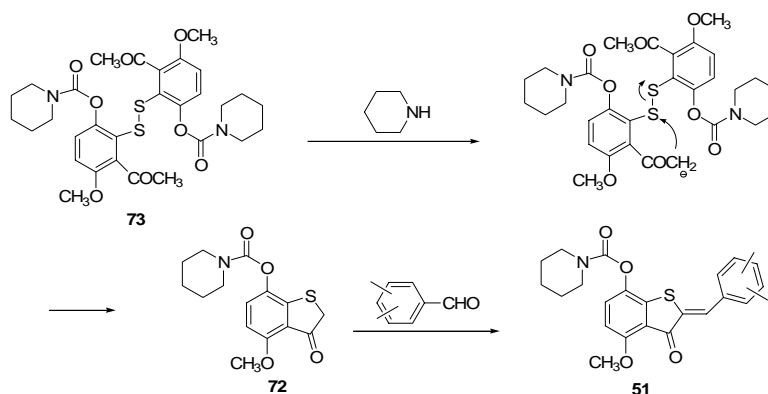
Schemat 14



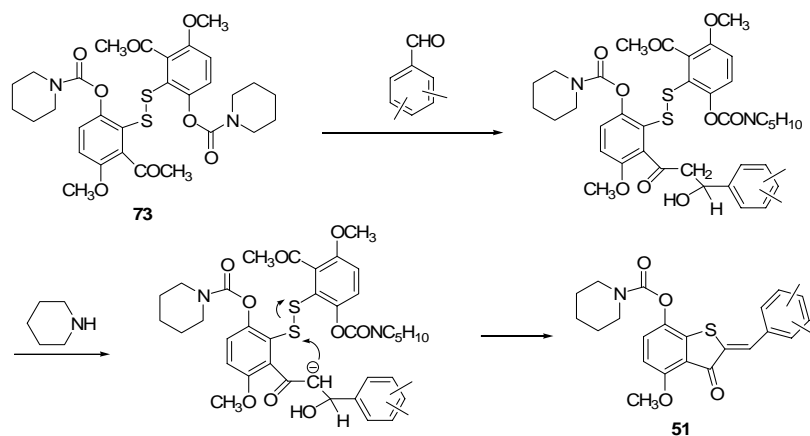
Brak jest dowodów eksperymentalnych aby zaproponować przebieg reakcji disiarczku **73** z benzaldehydem. Na schemacie 15 pokazano dwa hipotetyczne mechanizmy tej reakcji, różnią się one przede wszystkim „chronologią zdarzeń”. Mechanizm 1 postuluje tworzenie się karboanionu – cyklizację do benzotiofenonu **72** – powtórne tworzenie karboanionu – kondensację z benzaldehydem, a mechanizm 2 proponuje tworzenie się karboanionu – kondensację z benzaldehydem - powtórne tworzenie karboanionu – cyklizację do benzotiofenonu **51**.

Schemat 15

Mechanizm 1

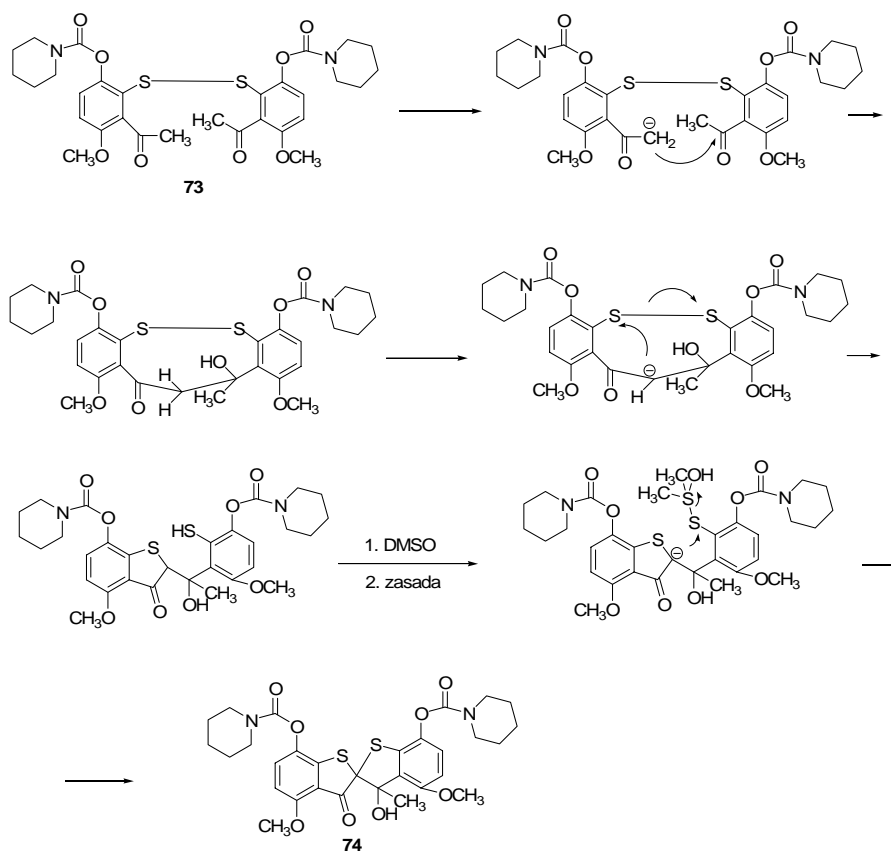


## Mechanizm 2



Podobnie, dla reakcji tworzenia się spiro związku **74** z disiarczku **73** można zaproponować jedynie hipotetyczny mechanizm. Jedną z jego możliwych wersji jest przedstawiona na schemacie 16.

Schemat 16

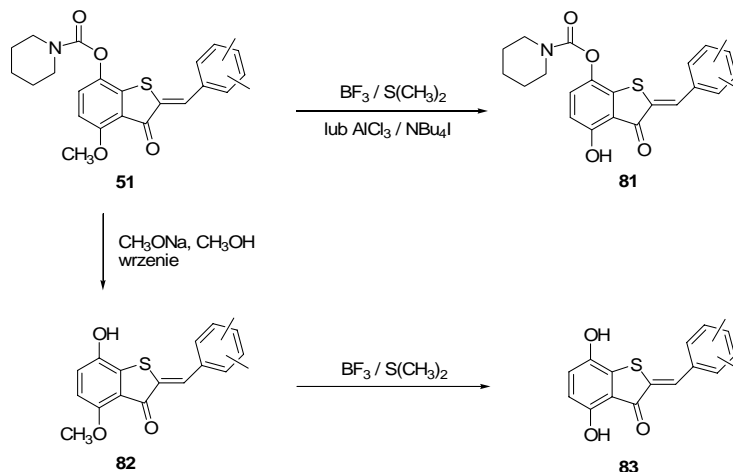


Celem nadrzędnym przedstawianej pracy było otrzymanie serii pochodnych tioauronu **51** do badań biologicznych. Zgodnie z założeniami, pochodne te miały różnić się rozbudowanymi podstawnikami alkilowymi na grupach hydroksylowych. Pierwszym etapem ich syntezy była



przedstawiona na schemacie 17 selektywna deprotekcja grup fenolowych w w związkach **52** - **69** (tabela 8) [80].

Schemat 17



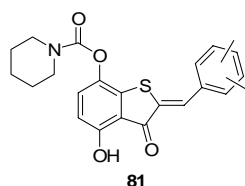
Selektywna deprotekcja grup hydroksylowych w pozycjach 4 i 7 tioauronów była stosunkowo łatwa z powodu dużej różnicy w reaktywności grup ochronnych. Grupa karbamoilowa w pozycji 7 ulegała hydrolizie pod wpływem wodnego roztworu wodorotlenku sodowego, jednakże zastosowanie metanolanu sodowego w metanolu dawało produkt o wyższej czystości i w praktyce stosowano ten właśnie odczynnik. Reakcja przebiegała ilościowo i jej wydajności zależały wyłącznie od wydajności krystalizacji. Rozszczepienie grupy metoksylowej w pozycji 4 również przebiegało ilościowo i było przeprowadzane za pomocą kompleksu trifluorku boru z siarczkiem dimetylowym, bądź też z użyciem chlorku glinowego wobec jonów jodkowych. Deprotekcję grupy hydroksylowej w pozycji 4 można było przeprowadzić selektywnie wobec innych grup metoksylowych obecnych w cząsteczce. Typowo, reakcja z kompleksem  $\text{BF}_3 - \text{Me}_2\text{S}$  w chlorku metylenu w  $0^\circ\text{C}$  prowadziła w ciągu 1 godziny do całkowitej deprotekcji w pozycji 4, bez naruszenia innych grup metoksylowych, podczas gdy kilkunastogodzinne mieszanie w temperaturze pokojowej prowadziło do rozszczepienia wszystkich grup hydroksylowych. Obserwowana selektywność nie była charakterystyczna wyłącznie dla badanych tioauronów. Testy przeprowadzone na pochodnych benzenu pozwoliły nam na przedstawienie ogólnej metody selektywnej deprotekcji eterów fenylo-metylowych i fenylo-allilowych za pomocą kompleksu  $\text{BF}_3 - \text{Me}_2\text{S}$  [81]. Deprotekcja za pomocą mieszaniny chlorek glinu - jodek tetrabutylamoniumowy we wrzącym benzenie nie była tak specyficzna, chociaż można było w niej osiągnąć pewną selektywność. Relatywna łatwość rozszczepienia grupy metoksylowej w pozycji 4 jest najprawdopodobniej

następstwem udziału w reakcji sąsiedniej grupy karbonylowej. Otrzymane produkty deprotekcji tioauronów podano w tabelach 9 - 11.

Dla pochodnych tioauronu firma TAIHO udostępniła nam wyniki badań cytotoksyczności, przedstawiono je również w tabelach 9 - 12. W poszczególnych tabelach, związki są uszeregowane według malejącej cytotoksyczności w stosunku do komórek HeLa.

Tabela 9

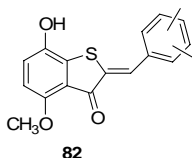
Cytotoksyczność pochodnych 4-hydroksy-7-piperydynokarbonyloksytioauronu (**81**)



Nr związ.	Podstawniki w pierścieniu B	IC <sub>50</sub> ( μM)				
		HeLa	AZ-521	P815	TF-1	WI-38
<b>84</b>	3'-Br; 4',5'-diOH;	1,1	2,0	0,8	3,8	2,9
<b>85</b>	3'-Br; 4',5'-diOCH <sub>3</sub> ;	2,4	6,0	1,1	4,7	>50
<b>86</b>	3',4'-diOH	2,7	3,9	2,2	6,1	7,8
<b>87</b>	3',4'-diOCH <sub>3</sub>	22,1	60,8	>89,7	>89,7	>89,7

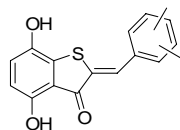
Tabela 10

Cytotoksyczność pochodnych 7-hydroksy-4-metoksytioauronu (**82**)



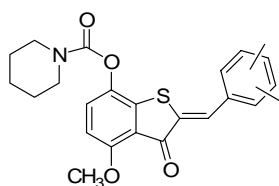
Nr związ.	Podstawniki w pierścieniu B	IC <sub>50</sub> ( μM)				
		HeLa	AZ-521	P815	TF-1	WI-38
<b>88</b>	3'-Br; 4',5'-diOCH <sub>3</sub> ;	3,9	8,5	3,5	6,0	20,4
<b>54</b>	3',4'-diOH	12,9	13,8	18,8	36,7	26,1
<b>89</b>	3'-Cl	13,6	28,4	31,7	5,7	>100
<b>90</b>	-	93,0	18,5	21,6	7,1	>100
<b>91</b>	3',4'-diOCH <sub>3</sub>	>100	30,9	>100	>100	>100
<b>92</b>	4'-Cl	>100	>100	>100	>100	>100
<b>93</b>	3'-Br; 4'-OH; 5'-OCH <sub>3</sub>	>100	21,5	>100	>100	29,6

Tabela 11

Cytotoksyczność pochodnych 4,7-dihydroksytioauronu (**83**)**83**

Nr związ.	Podstawniki w pierścieniu B	IC <sub>50</sub> (μM)				
		HeLa	AZ-521	P815	TF-1	WI-38
<b>94</b>	-	2,5	7,8	3,8	3,2	14,6
<b>95</b>	4'-Cl	2,8	12,4	4,4	5,9	7,2
<b>96</b>	3'-Cl	2,9	6,1	3,0	2,8	12,8
<b>97</b>	3',4'-diOCH <sub>3</sub> ; 5'-Br	6,6	11,5	7,7	6,6	27,8
<b>98</b>	3',4'-diOH	12,0	3,1	46,0	>100	41,7
<b>99</b>	3',4'-diOCH <sub>3</sub>	>100	4,6	>100	>100	>100

Tabela 12

Cytotoksyczność pochodnych 4-metoksy-7-piperydynokarbonyloksytioauronu (**51**), wymienionych w tabeli 8**51**

Nr związ.	Podstawniki w pierścieniu B	IC <sub>50</sub> (μM)				
		HeLa	AZ-521	P815	TF-1	WI-38
<b>61</b>	3'-OH	8,9	8,5	6,7	14,0	10,9
<b>53</b>	3',4'-diOH	10,6	4,8	8,9	11,2	11,5
<b>65</b>	2'-Cl	12,0	17,0	23,8	18,8	>100
<b>55</b>	4'-Br	14,0	12,5	4,5	9,1	12,8
<b>69</b>	3'-Br; 4',5'-diOCH <sub>3</sub> ;	15,0	32,1	6,0	16,9	>50
<b>63</b>	4'-Cl	15,1	21,3	27,3	17,4	>100
<b>58</b>	2',3'-diOCH <sub>3</sub>	18,3	6,7	3,3	7,1	10,1
<b>64</b>	3'-Cl	20,3	30,4	>100	>30	>100
<b>60</b>	4'-OH	31,2	31,2	77,7	>100	57,2
<b>56</b>	-	44,3	77,4	>100	>100	>100
<b>57</b>	pyridinyl-4 ring	44,8	33,0	60,2	69,6	>100
<b>59</b>	4'-OCH <sub>3</sub>	81,4	51,2	>100	>100	99,5
<b>52</b>	3',4'-diOCH <sub>3</sub>	>100	>100	>100	>100	>100
<b>62</b>	3'-OCH <sub>3</sub> ; 4'-OH	>100	44,4	>100	>100	>100
<b>66</b>	3'-Br; 4'-OH; 5'-OCH <sub>3</sub>	>100	12,6	14,7	51,5	18,2
<b>67</b>	4'-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	>100	36,3	>100	>100	>100
<b>68</b>	4'-NO <sub>2</sub>	>100	>100	>100	>100	>100

Jak widać, część otrzymanych związków wykazuje znaczące działanie cytotoksyczne, przy czym niektóre z nich, np. **65**, **85**, **89** są cytotoksyczne w stosunku do linii nowotworowych, a nie działają na linię WI-38, odpowiadającą normalnym fibroblastom płuc.

Dla związków o wzorze ogólnym **51**, granica pomiędzy pochodnymi aktywnymi i nieaktywnymi przebiega w pobliżu niepodstawionego związku **56** (tabela 12). Wprowadzenie do pierścienia B atomu chlorowca zwiększa aktywność, przy czym największy efekt wystąpił dla pochodnej podstawionej w pozycji *orto* (związek **65**). Dwa najbardziej aktywne związki, **53** i **61**, są podstawione grupami hydroksylowymi. Metylowanie tych grup (związek **61** *versus* **52** i **14** *versus* **59**) prowadzi do związków nieaktywnych, jednakże wprowadzenie do związku **52** atomu bromu daje znowu aktywny związek **69**. Mono demetylacja związku **69** (związek **66**) prowadzi do pochodnej o podobnym poziomie aktywności lecz o odmiennej selektywności w stosunku do różnych linii komórkowych.

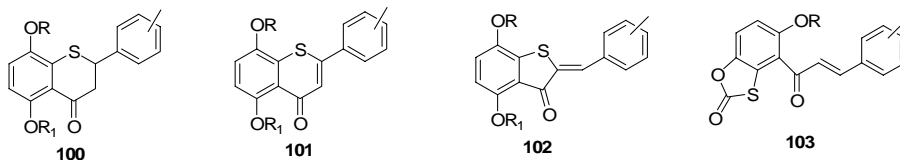
Powyższe zależności struktura – aktywność nie mają zastosowania dla pochodnych dihydroksylowych **83** (tabela 11). Dla tych pochodnych najaktywniejszy był związek **94**, niepodstawiony w pierścieniu B, pochodne chlorowe **95** i **96** nadal zachowywały aktywność lecz pochodna dihydroksylowa **98** była nieaktywna w większości testów.

Wspomniany wyżej wpływ metylowania grup fenolowych w związkach o wzorze ogólnym **51** na aktywność jest interesujący i widoczny również dla pochodnych 4-hydroksy **81**. Pochodna dihydroksy **84** (tabela 9) wykazuje silne działanie cytotoksyczne zarówno w stosunku do komórek nowotworowych jak i normalnych. Odpowiednia pochodna dimetoksy **85** wykazuje nieznacznie zmniejszoną aktywność w stosunku do linii nowotworowych lecz jest nieaktywna w stosunku do komórek normalnych. Debrominacja związku **84** (związek **86**) jedynie nieznacznie zmniejsza aktywność, podczas gdy debrominacja związku **85** (związek **87**) prowadzi do całkowitej utraty aktywności, co wskazuje na istotną rolę atomu bromu. Co ciekawe, większość związków selektywnie nieaktywnych w stosunku do normalnych komórek WI-38 była podstawiona chlorem lub bromem.

Podsumowując, wydaje się, że pochodne 4,7-dihydroksytioauronu stanowią grupę związków o obiecującym działaniu cytotoksycznym, jednakże znalezienie optymalnych pochodnych wymaga jeszcze znacznego nakładu pracy. W ramach kontraktu z firmą TAIHO otrzymaliśmy szereg innych pochodnych 4,7-dihydroksytioauronu, w tym pochodne 3,3-ditlenkowe, jednakże ta część pracy jest nadal objęta klauzulą poufności i nie może być przedmiotem tego opracowania.

### 4.3. Synteza pochodnych chalkonu zawierających pierścień benzoksatiolonu [91, 92, 93]

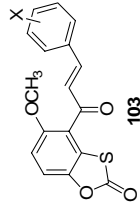
Powyżej opisałem syntezy pochodnych tioflawanonu (związki 26- 35), tioflawonu (związki 36 - 41) i tioauronu (związki 52 – 71; 84 - 99), o wzorach ogólnych odpowiednio 100, 101 i 102.



Te trzy typy związków wykazują daleko posunięte podobieństwo strukturalne, gdyż wszystkie zawierają w swojej strukturze dwa, podobnie podstawione pierścienie fenyłowe połączone trzema atomami węgla. Interesujące wydawało się otrzymanie jeszcze ich analogu **103**, opartego na strukturze chalkonu i porównanie aktywności biologicznej otrzymanych pochodnych. Wydawało się, że mając opanowane metody syntezy związków **100 – 103** można będzie planować syntezy serii związków o bardzo podobnej budowie farmakoforu a więc zdolnych do oddziaływania z tym samym receptorem, lecz różniących się nieznacznie wielkością, stopniem usztywnienia cząsteczki, lipofilowością, rozpuszczalnością i innymi cechami wpływającymi z jednej strony na powinowactwo do receptora a z drugiej na własności farmakokinetyczne otrzymywanych pochodnych. Innymi słowy, opracowanie wspomnianych metod syntezy stwarzało możliwość racjonalnego wykorzystania wszystkich sugestii wynikających z zależności struktura – aktywność.

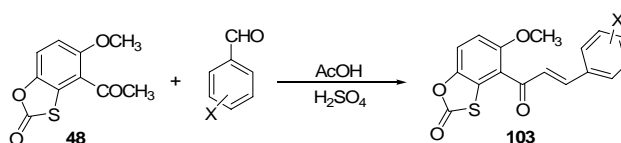
Opisane w punkcie 4.2. reakcje benzoksatiolonu **48** z aldehydami przebiegały z otwarciem pierścienia heterocyklicznego. Synteza pochodnych chalkonu **103** wymagała znalezienia takich warunków kondensacji związku **48** z aldehydami aby pierścień heterocykliczny pozostawał nienaruszony. Najpopularniejszą metodą syntezy chalkonów jest katalizowana zasadami kondensacja Claisena-Schmidta odpowiednich pochodnych acetofenonu z benzaldehydami [94, 95]. Jednakże wrażliwość pierścienia benzoksatiolonu na czynniki nukleofilowe sugerowała, że do otrzymania związków **103** właściwsze będzie zastosowanie katalizy kwasowej. Reakcje takie, aczkolwiek dużo rzadziej stosowane, są znane [94 - 98]. Zadawalające wyniki otrzymaliśmy prowadząc reakcje w kwasie octowym z katalitycznymi ilościami kwasu siarkowego (schemat 18).

Tabela 13

Otrzymane związki o wzorze ogólnym **103** oraz ich aktywność biologiczna

Zw.	Podstawnik X (wydajność, %)	Aktywność bakteriostatyczna					Aktywność przeciwgrzybowa		Aktywność cytostaticzna			Aktywność przeciwwgruzlicza MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		<i>C.albicans</i>	<i>M.luteus</i>	<i>St.aureus</i>	<i>Sal.typh.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pr. vulgaris</i>	<i>HeLa</i>	<i>H<sub>37</sub>Rv</i>	<i>M. kansasii</i>			
<b>104</b>	H (88)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	8.4 [2.62]	>100	>100
<b>105</b>	4'-NO <sub>2</sub> (95)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	- *	>100	>100
<b>106</b>	4'-OCH <sub>3</sub> (61)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	- *	>100	>100
<b>107</b>	3',4'-diOCH <sub>3</sub> (50)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	14.1 [5.2]	>100	>100
<b>108</b>	4'-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (60)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>100 [3.5]	>100	>100
<b>109</b>	4'-Br (87)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	- *	>100	>100
<b>110</b>	4'-Cl (52)	62.5	15.6	7.8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	5.2 [1.8]	100	>100
<b>111</b>	3'-Cl (37)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	- *	25	100
<b>112</b>	2'-Cl (86)	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	- *	50	>100
<b>113</b>	4'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (29)	125	15.6	15.6	250	125	125	125	125	125	8.3 [3.3]	100	100
<b>114</b>	4'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> morfolina (30)	250	31.2	31.2	250	125	125	125	125	125	- *	50	>100

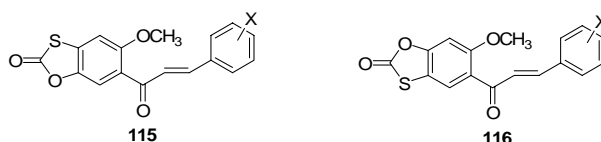
Schemat 18



Otrzymane związki (**104 – 114**) oraz ich aktywność biologiczną pokazano w tabeli 13. Związki były testowane na ich aktywność cytostatyczną w stosunku do linii komórkowej *HeLa*, aktywność bakteriostatyczną w stosunku do *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia.coli*, *Proteus vulgaris*, przeciwgrzybową w stosunku do *Candida albicans* oraz przeciwgruźliczą w stosunku do szczepów *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv and *Mycobacterium kansasii*.

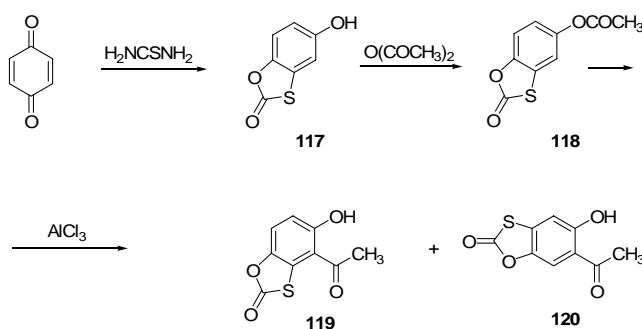
Związki **104**, **110** i **113** wykazały słabą aktywność w stosunku do komórek HeLa, przy czym związek **104** cechowała największa selektywność, gdyż był nieaktywny w pozostałych testach. Większość otrzymanych związków była nieaktywna w stosunku do bakterii i grzybów, jedynie związki **110** i **113** wykazały słabą aktywność w stosunku do *Micrococcus luteus* i *Staphylococcus aureus*. Jeden związek, chloropochodna **111**, wykazał słabą aktywność w stosunku do szczepu *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

Niezależnie od przedstawionego wyżej uzasadnienia syntezy związków **103**, interesujące było w jakim stopniu położenie pierścienia oksatiolonu wpływa na aktywność tych związków. Aby odpowiedzieć na to pytanie otrzymaliśmy serię ich izomerów o wzorach ogólnych **115** i **116** [92].

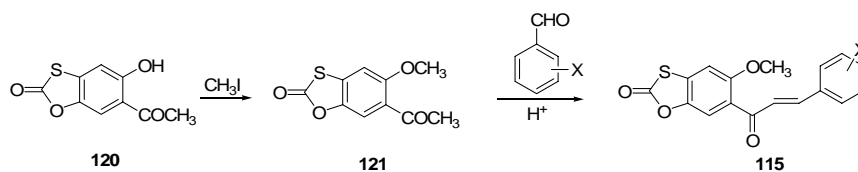


Ich syntezę pokazano na schematach 19 – 22.

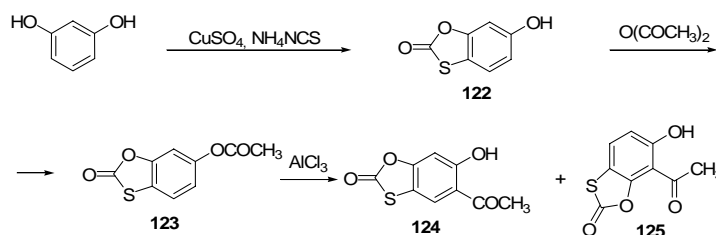
Schemat 19



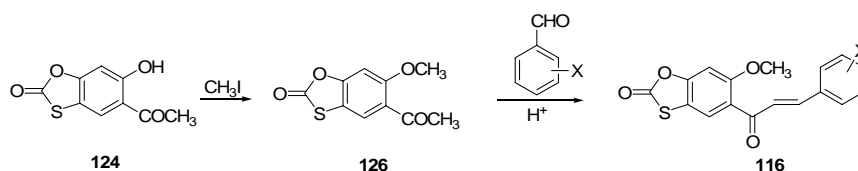
Schemat 20



Schemat 21



Schemat 22



Przegrupowanie Friesa [99] acetoksy pochodnej **118** (schemat 19) dało izomeryczne pochodne acetofenonu **119** i **120** w stosunku około 1 : 3, dzięki czemu obydwie związki można było otrzymać w tej reakcji w ilościach syntetycznie użytecznych. Pochodną **119** wykorzystano jako alternatywny substrat do otrzymywania metoksy pochodnej **48**, a związek **120** w syntezie pokazanej na schemacie 20. Analogiczne przegrupowanie acetoksy pochodnej **123** również dało dwa produkty (**124** i **125**) (schemat 21) ale w stosunku około 10 :1, i z tego względu w dalszych syntezach wykorzystano wyłącznie główny produkt **124**.

Pochodne chalkonu otrzymane w wyniku reakcji pokazanych na schematach 20 i 22 oraz ich aktywność biologiczną przedstawia tabela 14.

Wszystkie związki przedstawione w tabeli 14, dla których aktywność cytotoksyczna mogła być określona, wykazały słabą (5 – 12  $\mu\text{M}$ ) aktywność w stosunku do komórek *HeLa*. Żaden ze związków o wzorze **115** nie wykazywał aktywności w stosunku do badanych mikroorganizmów i pod tym względem przypominały one związki **103**. Aktywność izomerów o wzorze **116** silnie zależała od podstawnika i tak niepodstawiona pochodna (**133**) była aktywna we wszystkich testach, podczas gdy chloropochodne **135** i **136** wykazały aktywność tylko w stosunku do szczepów *Micrococcus luteus* i *Staphylococcus aureus*, oraz aktywność



przeciwgrzybową. Dimetyloamino pochodna **138** była aktywna tylko w stosunku do *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

Tabela 14

Otrzymane związki o wzorach ogólnych **115** i **116**, oraz ich aktywność biologiczna

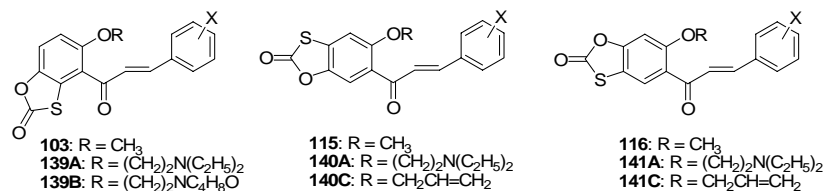
Nr	Wzór ogólny / Podstawnik	Akt. przeci w grzybo wa IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Aktywność bakteriostatyczna IC <sub>50</sub> (µg/ml)					Akt. cytosta tyczna IC <sub>50</sub> (µM), [(µg/m l]	Aktywność przeciwgruźlicza MIC (µg/ml)	
			<i>C.albic ans</i>	<i>M.lute us</i>	<i>St.aure us</i>	<i>Sal.typ h.</i>	<i>E.coli</i>		<i>Pr. vulgari s</i>	<i>HeLa</i>
<b>127</b>	<b>115</b> / H	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	7.4 [2.3]	100	>100
<b>128</b>	<b>115</b> / 4'-Br	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	11.2 [4.4]	>100	>100
<b>129</b>	<b>115</b> / 3'-Cl	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	4.9 [1.7]	>100	>100
<b>130</b>	<b>115</b> / 2'-Cl	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	8.8 [3.0]	>100	>100
<b>131</b>	<b>115</b> / 4'-OCH <sub>3</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	10.2 [3.5]	>100	>100
<b>132</b>	<b>115</b> / 3',4'- diOCH <sub>3</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-*	>100	>100
<b>133</b>	<b>116</b> / H	250	62,5	31,3	125,0	125,0	125,0	8.6 [2.7]	50	100
<b>134</b>	<b>116</b> / 4'-Br	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	11,4 [4.5]	>100	>100
<b>135</b>	<b>116</b> / 3'-Cl	125	15,6	15,6	>1000	>1000	>1000	9.8 [3.4]	100	>100
<b>136</b>	<b>116</b> / 2'-Cl	125	31,25	15,62	>1000	>1000	>1000	-*	50	100
<b>137</b>	<b>116</b> / 4'-OCH <sub>3</sub>	>1000	62,5	62,5	>1000	>1000	>1000	-*	50	>100
<b>138</b>	<b>116</b> / 4'-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-*	<25	100

\* wartość nie mogła być określona, gdyż związek wytrącał się w trakcie inkubacji.

Jak widać z danych w tabeli 13, zastąpienie grupy 4'-OCH<sub>3</sub> grupą 4'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (związek **113**) lub grupą 4'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NC<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O (morfolinoetoksy) (związek **114**), znacznie zwiększyło aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową. Obserwacja ta skłoniła nas do otrzymania serii związków, w których grupa metoksylova w pierścieniu A (związki o wzorach ogólnych **103**, **115** i **116**) była zastąpiona grupą dietyloaminoetoksylova (związki **139A**, **140A** i **141A**), grupą morfolinoetoksylova (związki **139B**) lub grupą allilową (związki **140C** i **141C**) (rysunek 3). Równie ważkim argumentem za wprowadzeniem podstawnika z

grupą aminową było to, że związki te można było przeprowadzać w rozpuszczalne w wodzie sole.

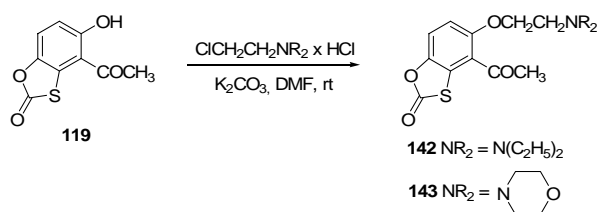
Rysunek 3



Największą trudność przy realizacji tego zamierzenia stanowiło otrzymanie pochodnych benzoksatiolonu zawierających odpowiedni łańcuch aminokoksyłowy, gdyż okazało się, że w warunkach syntezy pierścien oksatiolonu jest wyjątkowo nietrwały.

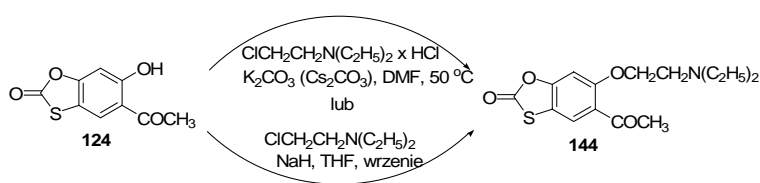
Aminopochodne **142** i **143** otrzymano poprzez kondensację związku **119** z odpowiednimi chlorowodorkami chloroalkiloaminy w DMF, wobec węglanu potasowego, w temperaturze pokojowej (schemat 23).

Schemat 23

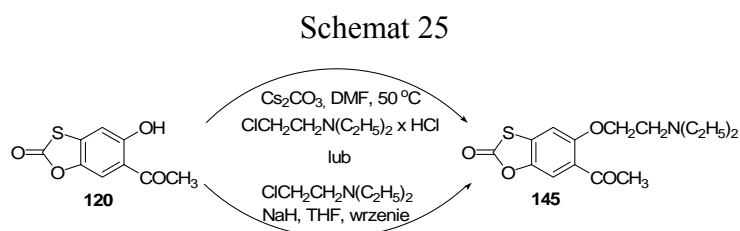


Dla izomerycznego acetofenonu **124**, analogicznie prowadzona reakcja z chlorowodorkiem chlorku 2-(dietyloamino)etylu (stosunek **124** : chlorowodorek aminy : węglan potasowy = 1 : 1.5 : 6) dała złożoną mieszaninę produktów, z której nie udało się wyizolowaćżądanego produktu **144**. Jednakże zmniejszenie ilości węglanu potasowego (stosunek **124** : chlorowodorek aminy : węglan potasowy = 1 : 1.5 : 1.5) i podniesienie temperatury do 50 °C pozwoliło na otrzymanie oczekiwanego produktu **144** z wydajnością 40 % (schemat 24).

Schemat 24

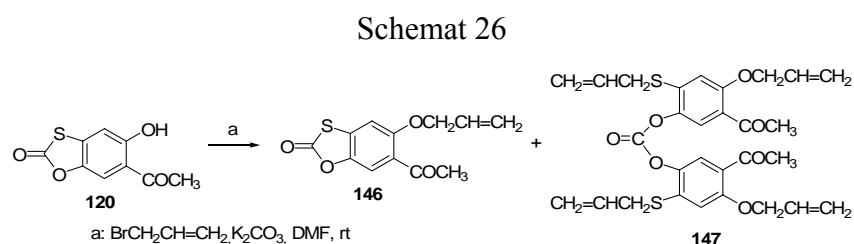


Wydaje się, że w tym drugim przypadku, po zakończeniu reakcji mieszanina zawierała zasadniczo tylko kwaśny węglan potasowy, który buforował roztwór tak, że nie był on wystarczająco nukleofilowy aby otworzyć pierścień oksatiolonu. Zastąpienie węgla potasowego węglanem cezowym (stosunek **124** : chlorowodorek aminy : węglan potasowy = 1 : 1.5 : 2) dało podobny wynik (wydajność 30 %). Najlepszą wydajność (67 %) związku **144** otrzymano w reakcji hydroksypochodnej **124** z wolną aminą w THF wobec wodoru sodowego (schemat 24).

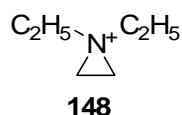


Reakcja hydroksyacetonu **120** z chlorowodorkiem chlorku 2-(dietyloamino)etylu była bardzo brudna niezależnie od ilości węgla potasowego, jednakże użycie węgla cezowego dało żądany produkt **145** (schemat 25). Podobnie jak dla wcześniej opisanego izomeru **124**, najlepszą wydajność (70%) związku **145** otrzymano w reakcji wobec wodoru sodowego (schemat 25).

Reakcja hydroksyacetonu **120** z bromkiem allilu w DMF wobec węgla potasowego, w temperaturze pokojowej dała mieszaninę dwóch produktów w stosunku około 1 : 1, zostały one zidentyfikowane jako spodziewany produkt allilowania **146** i dimer **147** (schemat 26).

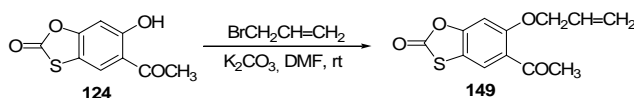


Wynik ten potwierdził nietrwałość pierścienia oksatiolonu w warunkach reakcji alkilowania. Obniżenie temperatury tej reakcji do 0 °C pozwoliło na całkowite wyeliminowanie tworzenia związku **147**. Reakcja związku **120** z bromkiem allilu we wrzącym THF wobec wodoru sodowego była bardzo wolna. W porównaniu ze stosunkowo szybką reakcją z chlorkiem dimetyloaminoetylowym (schemat 25) było to zaskakujące. Tę nieoczekiwaną różnicę szybkości reakcji można wyjaśnić zakładając, że ta ostatnia biegnie poprzez jon azyrdyniowy **148**.



Reakcja acetofenonu **124** z bromkiem allilu w DMF, wobec węglanu potasowego, w temperaturze pokojowej dała spodziewany produkt **149** (schemat 27).

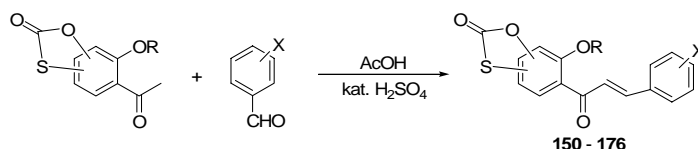
Schemat 27



Porównanie powyższych wyników sugeruje, że podatność układów benzoksatiolonu na otwarcie pierścienia pod wpływem czynników nukleofilowych maleje w szeregu: **120** > **124** > **119**.

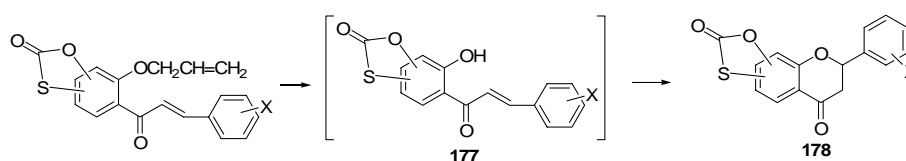
Otrzymane pochodne acetofenonu kondensowano z odpowiednimi benzaldehydami w kwasie octowym wobec kwasu siarkowego jako katalizatora (schemat 28).

Schemat 28



Ilość kwasu siarkowego miała zasadnicze znaczenie. W reakcjach pochodnych allilowych należało używać jedynie śladów tego katalizatora, gdyż w przeciwnym przypadku pojawiały się produkty rozerwania eteru allilowego i cyklizacji powstających 2'-hydroksychalkonów, n.p. **177**, do pochodnych flawanonów **178** (schemat 29).

Schemat 29



Dla pochodnych z grupą aminową w łańcuchu bocznym, ilość kwasu siarkowego musiała być znacząco większa, gdyż w przeciwnym przypadku był on niemal całkowicie związany w postaci siarczanu i reakcje były bardzo wolne. Otrzymane związki **150** – **176** pokazano w tabeli 15.

Opisana wyżej wrażliwość pierścienia oksatiolonu na czynniki nukleofilowe została potwierdzona obserwowanym rozkładem chalkonów zawierających podstawnik aminowy, w rozpuszczalnikach protonowych. Dla przykładu, krystalizacja związku **162** z metanolu prowadziła do jego częściowego rozkładu do disiarczku **179** (schemat 30).

Tabela 15

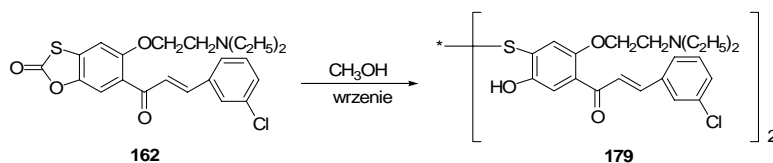
Otrzymane związki o wzorach ogólnych **139 - 141** oraz ich aktywność biologiczna

Nr	Wzór ogólny <sup>a</sup> / Podstawnik X	Aktywność przeciwigrzybowa		Aktywność bakteriostatyczna IC <sub>50</sub> (µg/mL)		E. coli	Pr. vulgaris	HeLa	Aktywność cytotatyczn a IC <sub>50</sub> (µM)	Aktywność tuberkulostatyczna (µg/mL)	MIC
		C. albicans	M. luteus	St. aureus	Sal. typh.						
150	139 A / H	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	10.1	>100	>100	>100
151	139 A / 4'-Br	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	b	>100	>100	>100
152	139 A / 4'-Cl	250	31,25	31,25	250	125	125	b	50	50	100
153	139 A / 3'-Cl	125	31,25	31,25	>1000	>1000	>1000	b	<25	<25	50
154	139 A / 2'-Cl	125	62,5	62,5	>1000	>1000	>1000	b	100	100	100
155	139 A / 4'-OCH <sub>3</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	7.8	50	50	100
156	139 A / 4'-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	31,25	31,25	31,25	125	62,5	62,5	b	50	50	100
157	139 A / 4'-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	31,25	15,62	15,62	>1000	>1000	>1000	b	50	50	>100
158	139 A / 3'-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	31,25	15,62	15,62	>1000	>1000	>1000	10.8	50	50	>100
159	139 B / H	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	b	>100	>100	>100
160	140 A / H	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	6.3	100	100	100
161	140 A / 4'-Br	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	b	100	100	>100
162	140 A / 3'-Cl	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	b	100	100	>100
163	140 A / 4'-OCH <sub>3</sub>	125	7,8	15,6	125,0	62,5	62,5	9.4	100	100	100
164	140 C / H	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	11.3	>100	>100	>100
165	140 C / 4'-Br	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	9.8	>100	>100	>100
166	140 C / 3'-Cl	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	10.3	>100	>100	>100
167	140 C / 4'-NO <sub>2</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	12.3	>100	>100	>100
168	140 C / 4'-OCH <sub>3</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	b	100	100	>100
169	140 C / 3',4'-diOCH <sub>3</sub>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	13.0	100	100	>100
170	141 A / H	125	31,25	15,62	>1000	>1000	>1000	b	100	100	100
171	141 A / 4'-Br	125	7,81	7,81	>1000	>1000	>1000	2.1	100	100	>100
172	141 A / 3'-Cl	62,5	15,62	7,81	>1000	>1000	>1000	15.8	<25	<25	100
173	141 A / 4'-OCH <sub>3</sub>	62,5	15,62	7,81	>1000	>1000	>1000	5.8	<25	<25	100
174	141 C / H	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	b	50	50	>100
175	141 C / 4'-Br	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	b	50	50	>100
176	141 C / 2'-Cl	125	15,62	7,81	>1000	>1000	>1000	b	50	50	>100

<sup>a</sup> Wzory ogólne podano na rysunku 3; <sup>b</sup> Wartość nie mogła być określona, gdyż związek wytrącał się podczas inkubacji

Wydaje się, że związek **179** tworzył się w wyniku katalizowanego grupą aminową otwarcia pierścienia oksatiolonu i utlenienia tiolu do disiarczku.

Schemat 30

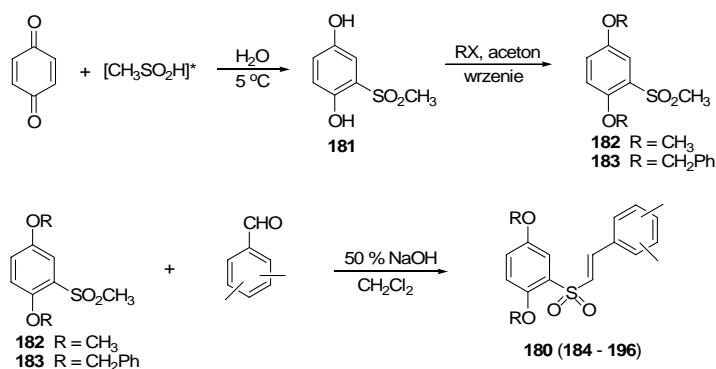


Wyniki badania aktywności biologicznej pokazane w tabeli 15 pokazują, że wprowadzenie w miejsce grupy metoksylovej podstawnika aminoalkoksylovego czy też alliloksylovego nie wpływa w zasadniczy sposób na aktywność otrzymanych związków. Wszystkie pochodne, dla których udało się oznaczyć aktywność cytotoksyczną wykazywały słabe działanie w granicach 2 – 12  $\mu\text{M}$ , podobnie jak ich odpowiedniki metoksylove (tabele 13 i 14). Podobnie, żaden (poza **163**) związek o wzorze ogólnym **140** nie wykazywał działania w stosunku do badanych mikroorganizmów.

#### 4.4. Synteza pochodnych sulfonu fenylove-winylovego [100, 101]

W części 3.5. przedstawiono ogólne założenia przyjęte przy projektowaniu pierwszej części kontraktu z firmą TAIHO. Realizując je, przeprowadzono zaprezentowane w części 4.1. syntezy pochodnych tioflawanonu i tioflawonu, oraz prezentowane poniżej syntezy pochodnych sulfonu fenylove-winylovego **180**. Tak jak w przypadku tioflawonów, naszym celem była synteza związków posiadających układ p-chinoidowy w pierścieniu A. Kluczowy substrat **181** otrzymano w reakcji p-chinonu z kwasem sulfinowym (schemat 31).

Schemat 31



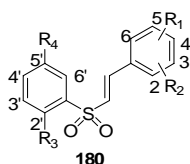
\* kwas sulfinowy generowano *in situ* poprzez redukcję chlorku kwasu metanosulfonowego cynkiem

Dihydroksysulfon **181** alkilowano do pochodnej metylowej **182** i benzylovej **183**, które z kolei kondensowano w układzie difazowym z pochodnymi benzaldehydu do pochodnych fenylo winylo sulfonu **180** (tabela 16).

Cztery z otrzymanych związków poddano deprotekcji do odpowiednich pochodnych hydroksylowych (tabela 16).

Tabela 16

Otrzymane pochodne sulfonu fenylo-winylovego **180**



Nr związku	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Wyd. %
<b>184</b>	2-OBn	3-OBn	2'-OBn	5'-OBn	64
<b>185</b>	3-OBn	4-OBn	2'-OBn	5'-OBn	45
<b>186</b>	2-OBn	4-OBn	2'-OBn	5'-OBn	23
<b>187</b>	2-OBn	3-OMe	2'-OBn	5'-OBn	40
<b>188</b>	3-OMe	4-OBn	2'-OBn	5'-OBn	32
<b>189</b>	2-OMe	3-OMe	2'-OBn	5'-OBn	77
<b>190</b>	2-OMe	4-OMe	2'-OBn	5'-OBn	22
<b>191</b>	3-OMe	4-OMe	2'-OBn	5'-OBn	51
<b>192</b>	2-OMe	3-OMe	2'-OMe	5'-OMe	49
<b>193</b>	3-OMe	4-OMe	2'-OMe	5'-OMe	15
<b>194</b>	4-OBn	-	2'-OBn	5'-OBn	30
<b>195</b>	3-OBn	4-OBn	2'-OMe	5'-OMe	18
<b>196</b>	2-OBn	3-OBn	2'-OMe	5'-OMe	22
<b>197</b>	2-OH	3-OH	2'-OH	5'-OH	51 <sup>a</sup> , 60 <sup>b</sup>
<b>198</b>	3-OH	4-OH	2'-OH	5'-OH	41 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> otrzymane z **184** działaniem AlCl<sub>3</sub> - dimetyloanilina

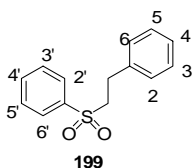
<sup>b</sup> otrzymane z **189** lub **196** działaniem BF<sub>3</sub> - Me<sub>2</sub>S

<sup>c</sup> otrzymane z **185** działaniem AlCl<sub>3</sub> – dimetyloanilina

Uwodornienie otrzymanych związków (Pd/C, octan etylu, temp. pok.) prowadziło do redukcji wiązania podwójnego oraz usunięcia grup benzylowych, powstałe w jego wyniku związki podano w tabeli 17.

Tabela 17

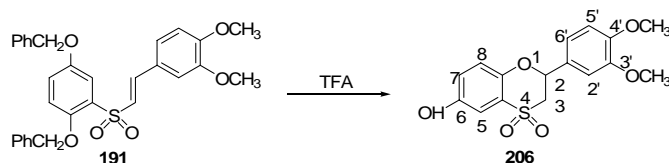
Związki o wzorze **199** otrzymane w wyniku uwodornienia pochodnych sulfonu fenylo-  
fenylovinylowego (**180**)



Nr związku	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Wyd. %
<b>200</b>	2-OH	3-OH	2'-OH	5'-OH	48
<b>201</b>	3-OH	4-OH	2'-OH	5'-OH	94
<b>202</b>	2-OH	4-OH	2'-OH	5'-OH	83
<b>203</b>	2-OH	3-OMe	2'-OH	5'-OH	63
<b>204</b>	2-OMe	3-OMe	2'-OH	5'-OH	77
<b>205</b>	3-OMe	4-OMe	2'-OH	5'-OH	90

Ogrzewanie pochodnej dibenzylowej **191** z kwasem trifluorooctowym w chloroformie dało w wyniku pochodną 2-fenylo-1,4-benzoksatianu **206** (schemat 32).

Schemat 32



Pochodne tego typu mogą być uważane za sulfonowe bioizostery flawanonów i z tego punktu widzenia, reakcja przedstawiona na schemacie 32 jest ważna, gdyż w literaturze opisano stosunkowo niewiele syntez układu 4,4-ditlenku 1,4-benzoksatianu [102 - 107].

#### 4.5. Nowa generacja pochodnych chalkonu [108]

W części 4.3. przedstawiono opublikowane wyniki badań nad pochodnymi chalkonu. Praca ta była kontynuowana w ramach grantu ministerialnego [108] i uzyskane tam rezultaty stanowią cenne uzupełnienie materiału zaprezentowanego w części 4.3. Jednakże, ze względów patentowych, wyniki te ciągle stanowią materiał poufny i nie powinny być ujawniane. Szukając sposobu umożliwiającego pokazanie tej części pracy, zdecydowałem się na pominięcie wzorów związków i opisanie w tej rozprawie wyłącznie wyników biologicznych, gdyż to głównie one stanowią o wartości tej części projektu. Przedstawione wyniki zostały uzyskane dla związków otrzymanych przeze mnie lub pod moim kierownictwem a badania biologiczne przeprowadzono w następujących zespołach:



- Prof. dr hab. inż. Andrzej Składanowski, Politechnika Gdańska: badania aktywności cytostatycznej oraz mechanizmu działania.
- Dr Joanna Wietrzyk, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, badania aktywności cytostatycznej
- Prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski, Politechnika Gdańska, badania na grzybach i bakteriach.
- Prof. dr hab. Zofia Zwolska, Instytut Gruźlicy w Warszawie, badania aktywności przeciwegruźliczej.
- Prof. dr hab. inż. Bogusław Szewczyk, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG w Gdańsku; badania aktywności przeciwwirusowej.

#### **4.5.1. Badania aktywności biologicznej *in vitro***

Głównym przedmiotem naszego zainteresowania, tak jak to deklarowano w tytule omawianego grantu, była aktywność przeciwnowotworowa otrzymywanych związków oraz ich wpływ na komórki/organizmy wielolekooporne. Dodatkowo sprawdzano ich aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwegruźliczą i przeciwwirusową. Uważam, że możliwie szerokie sprawdzanie aktywności biologicznej jest celowe z dwóch względów. Po pierwsze, może doprowadzić do wykrycia nieoczekiwanego typu aktywności, a więc poszerzyć potencjalny obszar zastosowań badanych związków. Po drugie, wielokierunkowe badanie aktywności już na bardzo wczesnym etapie dostarcza podstawowych informacji o selektywności działania badanych preparatów i ich biodostępności. Dla przykładu, dla związku wykazującego dużą, nieodróżnicowaną toksyczność w stosunku do wszystkich linii komórkowych i mikroorganizmów możemy się spodziewać nieakceptowalnie wysokiej toksyczności ostrej, ale z drugiej strony mamy informację o jego niezłej biodostępności.

##### **4.5.1.1. Aktywności cytotoksyczna**

Większość badanych związków wykazywała aktywność cytotoksyczną (tabela 18). Uwagę zwraca wyjątkowo duża ( $IC_{50} = 0.04 \mu M$ ) i selektywna aktywność cytotoksyczna związku **AMG-175** w stosunku do komórek *HeLa*. Znaczną selektywność działania cytotoksycznego wykazują również inne pochodne (tabela 18). Równie interesująca była aktywność badanych pochodnych w stosunku do komórek wielolekoopornych (tabela 18). I tak dla kilku bardzo aktywnych związków, np. **AMG-164** ( $IC_{50} = 0.5 \mu M$ ), **AMG-168** ( $IC_{50} = 0.4 \mu M$ ), **AMG-**

**169** ( $IC_{50} = 0.6 \mu M$ ) czy też dla **AMG-180** ( $IC_{50} = 0.4 \mu M$ ) aktywności w stosunku do linii odpornej i wrażliwej były podobne.

Tabela 18  
Aktywność cytotoksyczna i przeciwgruźlicza badanych związków

Symbol związku	Aktywność cytotoksyczna $IC_{50}$ ( $\mu M$ )						RI**	Aktywność przeciwgruźlicza MIC ( $\mu g/mL$ )	
	<i>HeLa</i>	<i>A549</i>	<i>MCF-7</i>	<i>HL60</i>	<i>MESSA</i>	<i>MESSA/DX5</i>		<i>MESSA / MESSA/DX5</i>	<i>H37Rv</i>
<b>AMG-158</b>	2,7	41,9	4,5	4,3	4,6	2,9	0,64	12,5	50
<b>AMG-159</b>	5,5	10,9	21,3	36,4	5,4	5,8	1,07	25	50
<b>AMG-160</b>	0,5	1,9	n.a*	1,9	3,5	0,2	0,07	12,5	50
<b>AMG-161</b>	1,2	21,8	4,2	2,2	3,4	3,1	0,93	25	50
<b>AMG-164</b>	1,6	2,7	1,5	3,0	0,5	0,5	1,04	12,5	25
<b>AMG-165</b>	1,6	6,1	2,9	1,5	2,4	2,7	1,1	12,5	25
<b>AMG-166</b>	1,8	5,7	6,2	2,0	7,9	2,9	0,36	25	50
<b>AMG-167</b>	5,1	5,6	4,2	2,1	2,7	2,8	1,04	12,5	50
<b>AMG-168</b>	1,8	38,3	0,8	0,6	0,4	0,3	0,87	25	50
<b>AMG-169</b>	2,4	4,1	2,3	2,5	0,6	3,1	4,8	25	25
<b>AMG-170</b>	2,9	2,9	2,1	1,9	1,4	1,9	1,3	25	50
<b>AMG-171</b>	0,4	6,5	3,6	1,2	0,5	0,4	0,69	12,5	50
<b>AMG-172</b>	1,8	2,8	0,7	2,3	0,4	0,4	0,95	25	50
<b>AMG-173</b>	1,6	4,6	1,9	1,8	2,5	3,2	1,26	12,5	25
<b>AMG-174</b>	4,9	4,7	2,7	2,1	0,6	2,9	4,62	12,5	50
<b>AMG-175</b>	0,04	0,3	n.a*	2,1	n.a*	n.a*	n.a	25	50
<b>AMG-176</b>	3,7	42,7	13,5	n.a*	25	31,0	1,24	12,5	50
<b>AMG-177</b>	3,4	3,9	1,9	0,7	2,5	2,9	1,15	25	50
<b>AMG-178</b>	10,3	n.a*	n.a*	18,9	28,6	31,9	1,1	25	100
<b>AMG-179</b>	6,6	62,25	6,64	39,1	20,2	26,4	1,3	25	50
<b>AMG-180</b>	1,8	2,3	0,6	0,5	0,4	0,4	0,84	25	50
<b>AMG-181</b>	>10	n.a*	21,3	15,7	n.a*	26,5	n.a	12,5	50
<b>AMG-182</b>	4,5	46,6	6,8	1,9	4,8	2,9	0,61	12,5	50
<b>AMG-185</b>	2,3	n.a*	n.a*	36,4	n.a*	n.a*	n.a	25	50
<b>doksorubicyna</b>							<b>16,6</b>		

\* n.a. – związek nieaktywny do stężenia 100  $\mu g/mL$

\*\* indeks oporności (RI) – iloraz wartości  $ID_{50}$  wyznaczonej wobec komórek linii odpornej i linii wrażliwej. Wartości RI od 0 do 2 świadczą o wrażliwości badanych komórek na stosowany związek. Wartości RI od 2 do 10 wskazują na umiarkowaną lekooporność danych komórek na badany związek. Wartości RI >10 wskazują na silną lekooporność.

#### 4.5.1.2. Aktywności przeciwgrzyźlicza, przeciwbakteryjna i przeciwgrzybowa

Jedenaście z badanych związków wykazywało aktywność przeciwgrzyźliczą w stosunku do szczepu *H37Rv*, ich wartości MIC były  $\leq 12.5 \mu\text{g/mL}$  (tabela 18), natomiast żaden z testowanych związków nie wykazywał znaczącej aktywności przeciwbakteryjnej lub przeciwgrzybowej (tabela 19).

Tabela 19

Aktywność przeciwgrzybową i przeciwbakteryjną badanych związków

Związek	Aktywność przeciwgrzybową MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Aktywność przeciwbakteryjna, MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ]				
	<i>C. albicans</i> <i>ATCC 10261</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aerq.</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>
AMG-158	-*	>100**	>100**	>100**	>100**	>100**
AMG-159	-*	>100**	>100**	>100**	>100**	>100**
AMG-160	-*	>100**	>100**	>100**	>100**	>100**
AMG-161	>1000	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-164	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-165	>1000	62,5	62,5	>250	>250	62,5
AMG-166	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-167	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-168	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-169	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-170	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-171	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-172	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-173	>1000	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-174	>1000	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-175	-*	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-176	-*	n.b.***	n.b.***	n.b.***	n.b.***	n.b.***
AMG-177	>1000	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-178	>1000	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-179	>1000	>50**	>50**	>50**	>50**	>50**
AMG-180	>1000	n.b.***	n.b.***	n.b.***	n.b.***	n.b.***
AMG-181	-*	n.b.***	n.b.***	n.b.***	n.b.***	n.b.***
AMG-182	>1000	>100**	>100**	>100**	>100**	>100**
AMG-185	-*	>100**	>100**	>100**	>100**	>100**

\* nie badano

\*\* wartość MIC przedstawiona jest jako >50 lub >100 w przypadkach, kiedy nie udało się uzyskać roztworu rzeczywistego w pożywce w stężeniu wyższym od pokazanego

\*\*\* nie badano z powodu niskiej rozpuszczalności w wodzie bądź DMSO

Badając wpływ na mikroorganizmy wielolekooporne wykazano, że niektóre z otrzymanych związków, w kombinacji z chemoterapeutykami przeciwgrzybowymi z grupy pochodnych imidazolu i triazolu, zwiększają wrażliwość komórek grzybów patogennych dla człowieka wykazujących fenotyp oporności wielolekowej, na działanie tych związków (tabela 20). Sugeruje to, że związki te mogą być inhibitorami pomp błonowych odpowiedzialnych za oporność wielolekową.

Tabela 20

Wartości MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ] dla ketonazolu w obecności badanych związków dla szczepów *Candida albicans*.

Związek	Szczep <i>Candida albicans</i> .					
	B 3	B 4	F 2	F 5	Gu 4	Gu 5
Ketokonazol	0,078	0,15625	0,078	0,3125	0,156	1,25
Ketokonazol + <b>AMG-81</b>	0,156	<b>0,039</b>	0,078	0,625	0,156	2,5
Ketokonazol + <b>AMG-116</b>	0,156	<b>0,039</b>	0,078	<b>0,039</b>	0,156	1,25
Ketokonazol + <b>AMG-118</b>	0,156	<b>0,039</b>	0,078	<b>0,039</b>	0,156	1,25
Ketokonazol + <b>AMG-165</b>	0,078	0,156	0,078	0,3125	0,156	<b>0,625</b>
Ketokonazol + Verapamil	0,078	<b>0,039</b>	0,078	<b>0,156</b>	0,156	<b>0,625</b>
Ketokonazol + Trifluoroperazyna	0,078	<b>0,078</b>	0,078	<b>0,156</b>	0,156	<b>0,625</b>

#### 4.5.1.3. Aktywności przeciwwirusowa

Wykazano, że niektóre związki wykazują działanie przeciwwirusowe, hamując namnażanie się szczepu szczepionkowego wirusa CSFV (tabela 21). Wirus CSFV jest modelem dla wirusa zapalenia wątroby typu C, którego nie można namnażać w hodowlach tkankowych, ani w żadnym innym gatunku zwierząt, za wyjątkiem małych człekokształtnych.

Tabela 21

Wpływ otrzymanych związków na namnażanie się szczepu szczepionkowego wirusa CSFV

Nazwa inhibitora	Dawka	Przeżywalność komórek gospodarza*	Inhibitor + wirus**	Wirus + inhibitor***
<b>AMG-161</b>	4 $\mu\text{g/ml}$	8%		
	2 $\mu\text{g/ml}$	45%		
	1,5 $\mu\text{g/ml}$	98%	---	---
	1 $\mu\text{g/ml}$	99%	---	---
	500 ng/ml	100%	+	+
<b>AMG-164</b>	4 $\mu\text{g/ml}$	9%		
	2 $\mu\text{g/ml}$	19%		
	1,5 $\mu\text{g/ml}$	88%	---	---
	1 $\mu\text{g/ml}$	99%	---	---
	500 ng/ml	100%	---	---
<b>AMG-168</b>	2 $\mu\text{g/ml}$	53%	---	---
	1,5 $\mu\text{g/ml}$	97%	+	+
	1 $\mu\text{g/ml}$	99%	+	+
	500 ng/ml	100%	++	++
<b>AMG-169</b>	3 $\mu\text{g/ml}$	70%	---	---
	2 $\mu\text{g/ml}$	96%	+	+
	1 $\mu\text{g/ml}$	98%	++	++
	500 ng/ml	100%	+++	+++
<b>AMG-170</b>	3 $\mu\text{g/ml}$	70%	---	---
	2 $\mu\text{g/ml}$	99%	++	++
	1 $\mu\text{g/ml}$	100%	++	++
	500 ng/ml	100%	+++	+++

- \* komórki SK6
- \*\* test sprawdzający, czy związek blokuje wnikanie wirusa do komórki
- \*\*\* test sprawdzający, czy związek hamuje namnażanie się wirusa w komórce
- brak pozytywnych komórek (całkowite zahamowanie namnażania się wirusa CSFV lub brak ekspresji glikoprotein otoczkowych)
- + mała ilość pozytywnych komórek [%] (dobre zahamowanie namnażania się wirusa CSFV)
- ++ średnia ilość pozytywnych komórek [%] (średnie zahamowanie namnażania się wirusa CSFV)
- +++ duża ilość pozytywnych komórek (podobnie jak dla kontroli) [%] (brak zahamowania namnażania się wirusa CSFV)

#### **4.5.2. Badania mechanizmu działania**

Wykazanie dużej cytotoksyczności otrzymywanych preparatów (tabela 18) zrodziło pytanie o źródło tego efektu i dlatego dużo uwagi poświęcono wyjaśnieniu ich mechanizmu działania. Większość badań prowadzono na związku **AMG-175**, którego aktywność cytotoksyczna na liniach komórkowych raka szyjki macicy *HeLa S3* i niedrobnokomórkowego raka płuc *A549* była znacząco większa od aktywności innych pochodnych. Badania prowadzono przy stężeniu związku, przy którym obserwowano efekt jego działania a równocześnie jego stężenie nie było zbyt toksyczne dla komórek, ustalono je na 1  $\mu$ M **AMG-175**. Badania komórkowe prowadzono na linii *A549*.

##### *4.5.2.1. Analiza dystrybucji komórek w cyklu komórkowym oraz analiza mikroskopowa morfologii chromosomów*

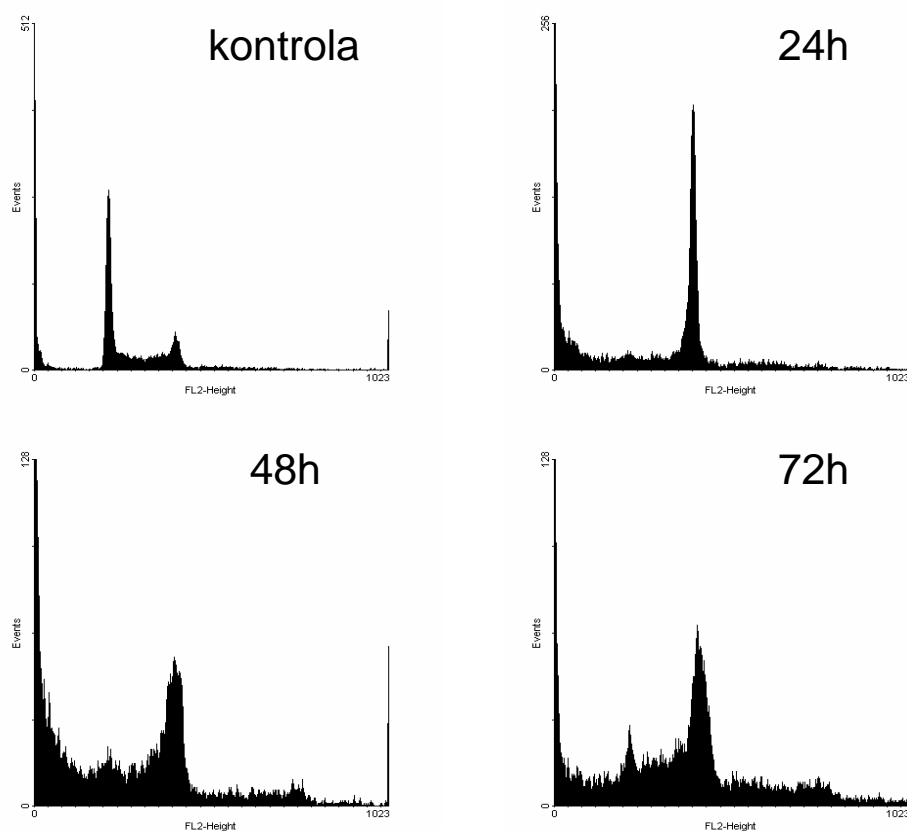
Analiza dystrybucji komórek w cyklu komórkowym pozwala określić w jakiej fazie cyklu komórkowego znajdują się komórki. W odpowiedzi na traktowanie dawką 1  $\mu$ M **AMG-175** komórki zatrzymywały swoją proliferację w fazie G2/M cyklu komórkowego (po czasie 24 h frakcja G2/M wynosiła ponad 81%) a następnie w miarę trwania inkubacji ze związkiem, po czasie dłuższym niż 48 h, część z nich umierała (Rysunek 4).

Aby wyjaśnić czy komórki po traktowaniu związkiem **AMG-175** zatrzymują się w fazie G2 czy wchodzi do mitozy, określono poziom komórek mitotycznych (pro- i meta-fazalnych) w populacji w czasie inkubacji ze związkiem. W wyniku traktowania komórek związkiem dochodziło do wzrostu ilości komórek mitotycznych a maksymalna ich ilość (około 22%) obserwowana była po 6 h od rozpoczęcia inkubacji (Rysunek 5). Ilość komórek mitotycznych była jeszcze stosunkowo wysoka po 24 h traktowania związkiem, ale w kolejnych godzinach powoli spadała aby po 48 h wrócić do poziomu obserwowanego dla komórek kontrolnych (około 4%).

Dodatkowo analiza mikroskopowa komórek mitotycznych wykazała obecność licznych aberracji chromosomalnych w komórkach traktowanych **AMG-175**. Chromosomy wydają się

krótsze, a przy dłuższych czasach obserwowano liczne mikronukleacje jądra komórkowego. Co istotne, jądra te często połączone były „nitkami” chromatyny czego nigdy nie obserwowano w komórkach kontrolnych (Rysunek 6). Powyższe wyniki wskazują, że komórki po traktowaniu **AMG-175** zatrzymują proliferację w fazie mitozy a w konsekwencji działania związku dochodzi do niezwykłych zaburzeń w rozdziale chromosomów, mikronukleacji i śmierci komórek.

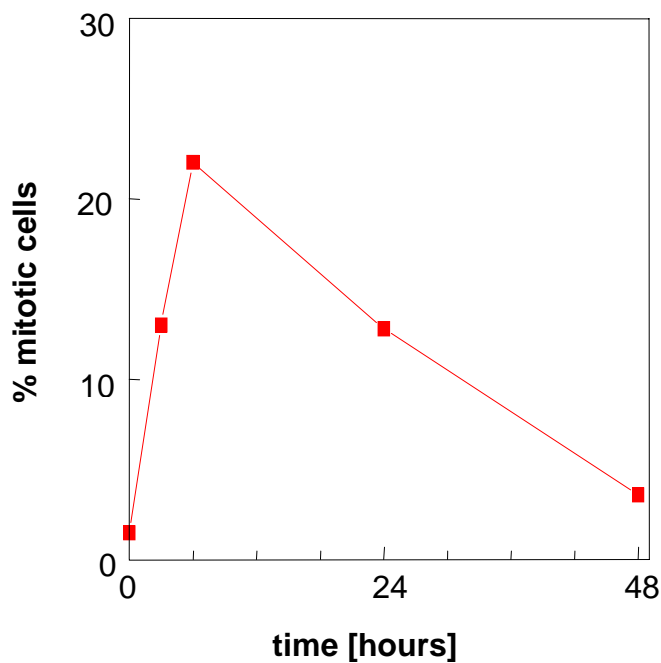
Rysunek 4  
Analiza dystrybucji w cyklu komórkowym komórek A549 traktowanych związkiem **AMG-175** przy stężeniu 1  $\mu$ M przez podany czas (godziny).



Powyższe obserwacje pozwalają przypuszczać, że mechanizm działania związku **AMG-175** związany jest z blokowaniem tworzenia wrzeciona mitotycznego lub z inhibicją białek kontrolujących przejście przez mitozę. Oczywiście na tym etapie nie można wykluczyć, że obserwowany efekt działania związku związany jest z nakładaniem się kilku mechanizmów jednocześnie.

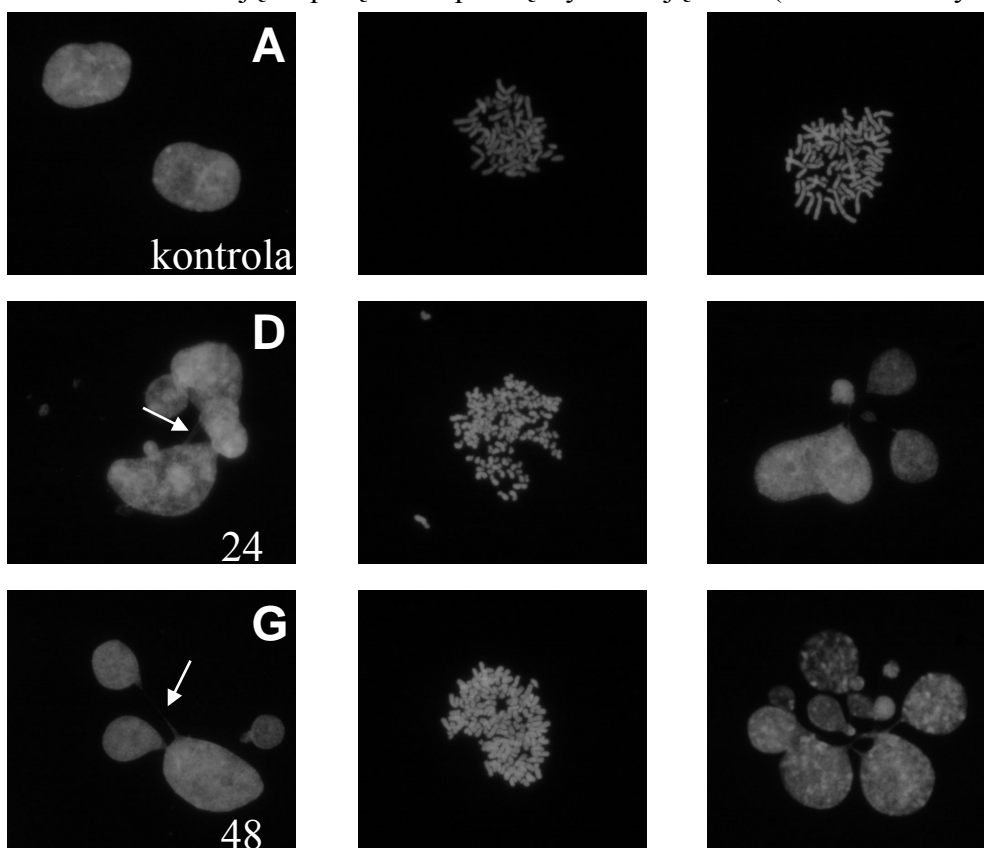
Rysunek 5

Zmiany wielkości frakcji komórek mitotycznych w populacji komórek *A549* traktowanych związkiem **AMG-175** przy stężeniu 1  $\mu\text{M}$ .



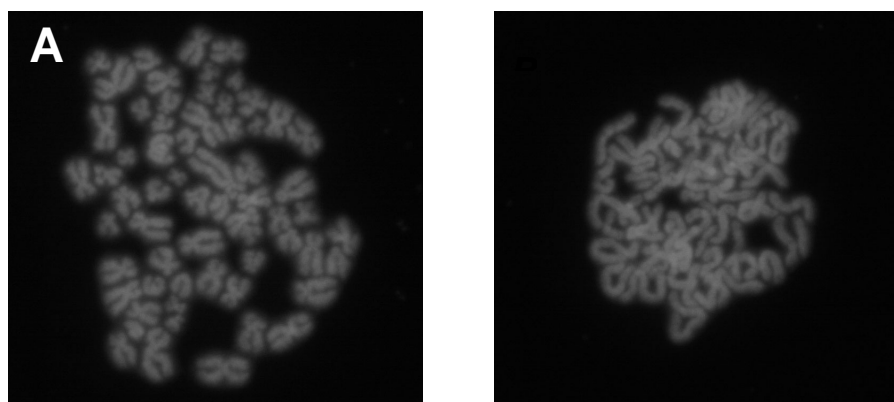
Rysunek 6

Morfologia jądra komórek *A549* nie traktowanych (kontrola, zdjęcia A-C) i traktowanych **AMG-175** przez podany czas przy dawce 1  $\mu\text{M}$  (zdjęcia D-F i G-I). Powiększenie x400. Strzałki wskazują na połączenia pomiędzy mikrojądrami (nitki chromatyny)



### Rysunek 7

Morfologia chromosomów mitotycznych (zdjęcie A - chromosomy metafazalne, zdjęcie B – chromosomy profazalne) izolowanych z komórek *A549* traktowanych **AMG-175** przy dawce 1  $\mu\text{M}$  przez 6 godzin. Powiększenie x600.



#### 4.5.2.2. Hamowanie aktywności DNA topoizomerazy I oraz II

Obserwowane na zdjęciach mikroskopowych mikrojądra połączone „nitkami” chromatyny sugerowały, że w wyniku działania związku dochodzi do nieprawidłowego rozdziału chromatyd siostrzanych, co mogło być wynikiem np. hamowania ich separacji lub dekatencji. Za prawidłowy proces dekatencji DNA podczas mitozy odpowiedzialny jest enzym topoizomeraza typu II. Ponadto, zatrzymanie proliferacji w fazie G2/M stwierdza się m.in. dla związków uszkadzających DNA w tym także dla inhibitorów enzymu topoizomerazy II. Z tego powodu postanowiono sprawdzić czy mechanizm działania **AMG-175** i jego pochodnych może być związany z hamowaniem aktywności katalitycznej ludzkiego enzymu DNA topoizomerazy II.

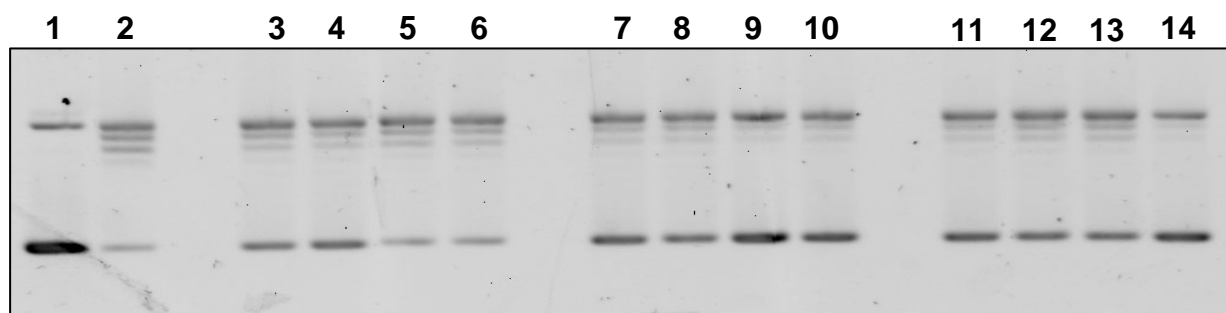
Badania wykazały, że żaden ze związków nie wykazuje zdolności do blokowania aktywności topoizomerazy II. Jedynie **AMG-165** przy najwyższym stężeniu 100  $\mu\text{M}$  wykazywał zdolność do częściowego blokowania aktywności tego enzymu (Rysunek 8, B ścieżka 10).

Ponieważ hamowanie enzymu topoizomerazy II jest często związane z wiązaniem się ligandów do DNA, określono powinowactwo badanych związków do DNA za pomocą pomiaru stabilizacji struktury drugorzędowej i wyznaczenie tzw. temperatur topnienia  $T_m$  dla standardowego substratu DNA z grasicy cielęcej. Wyniki wskazują, że badane związki nie stabilizują struktury DNA.



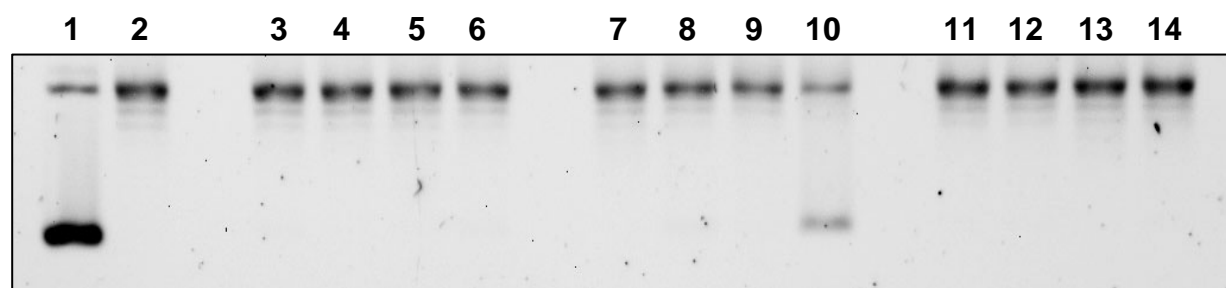
### Rysunek 8

Hamowanie aktywności DNA topoizomerazy II przez pochodne chalkonu mierzone testem relaksacji DNA.



1. plazmid pBR322  
2. plazmid + topoizomeraza II  
3-6. AMG-175 (100, 10, 5, 1  $\mu\text{M}$ )

7-10. AMG-186 (100, 10, 5, 1  $\mu\text{M}$ )  
11-14. AMG-187 (100, 10, 5, 1  $\mu\text{M}$ )



1. plazmid pBR322  
2. plazmid + topoizomeraza II  
3-6. AMG-160 (1, 5, 10 i 100  $\mu\text{M}$ )

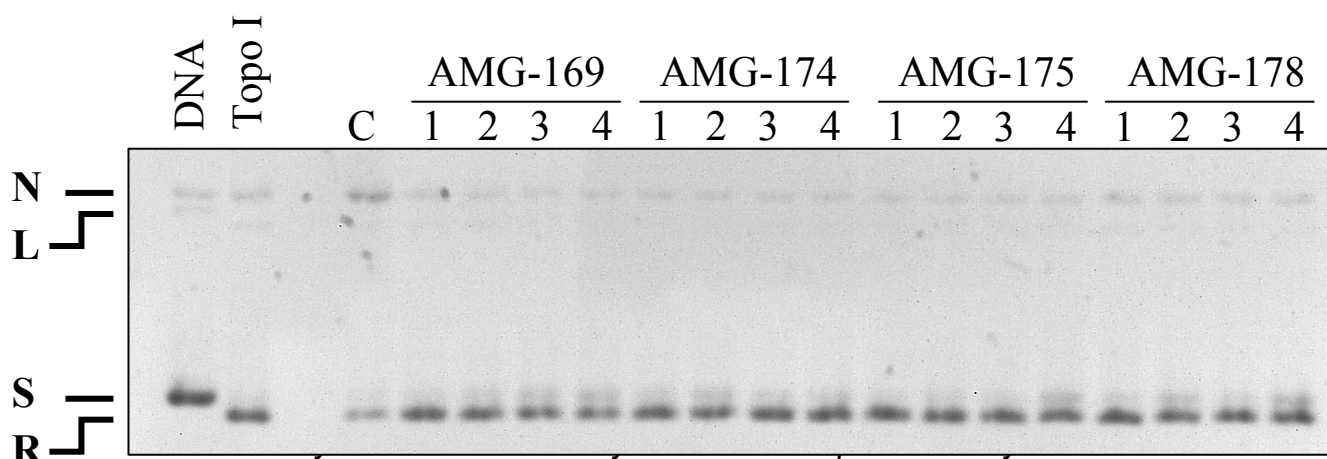
7-10. AMG-165 (1, 5, 10 i 100  $\mu\text{M}$ )  
11-14. AMG-182 (1, 5, 10 i 100  $\mu\text{M}$ )

Postanowiono określić także wpływ pochodnych chalkonu na relaksację DNA katalizowaną przez ludzką DNA topoizomerazę I. Do badań porównawczych wybrano związki **AMG-169**, **AMG-174** oraz **AMG-178**. Związki te zostały wybrane jako przykładowe związki reprezentujące różne grupy strukturalne znajdujące się w obrębie badanej serii związków. W celu sprawdzenia czy pochodne te są zdolne do stabilizowania kompleksów rozszczepialnych między DNA i topoizomerazą przeprowadzono eksperyment, w którym dodano etap trawienia białek za pomocą proteiny K po zakończeniu reakcji. Pozwala to na ujawnienie pęknięć nici DNA wynikających ze stabilizacji kompleksu DNA-enzym, w którym jedna z nici DNA zostaje kowalencyjnie związana z topoizomerazą I. W przypadku stabilizacji kompleksów prowadzi to do wzrostu ilości formy przeciętej (N) w żelu, tak jak to ma miejsce w przypadku klasycznego inhibitora topoizomerazy I, kamptotecyny (Rysunek 9, ścieżka C). Dodatkowo, ponieważ związki zakłócały migrację substratu DNA rozdział produktów reakcji wykonano w obecności bromku etydyny w żelu. Jak pokazują wyniki przedstawione na rysunku 9, żaden z

badanych związków nie stabilizował kompleksów rozszczepialnych ani nie hamował relaksacji substratu DNA katalizowanej przez topoiizomerazę I.

Rysunek 9

Hamowanie aktywności DNA topoiizomerazy I przez pochodne chalkonu, mierzone testem relaksacji DNA (migracja w żelu w obecności bromku etydyny).



stężenia pochodnych chalkonu: ścieżki 1 – 4 1, 10, 50, 100  $\mu$ M

C – kamptotecyna w stężeniu 50  $\mu$ M.

N – nadskrecony plazmid, L – liniowy plazmid, S – „zrelaksowane” DNA plazmidowe

#### 4.5.2.3. Wpływ pochodnych chalkonu na stabilność/strukturę mikrotubul w komórkach

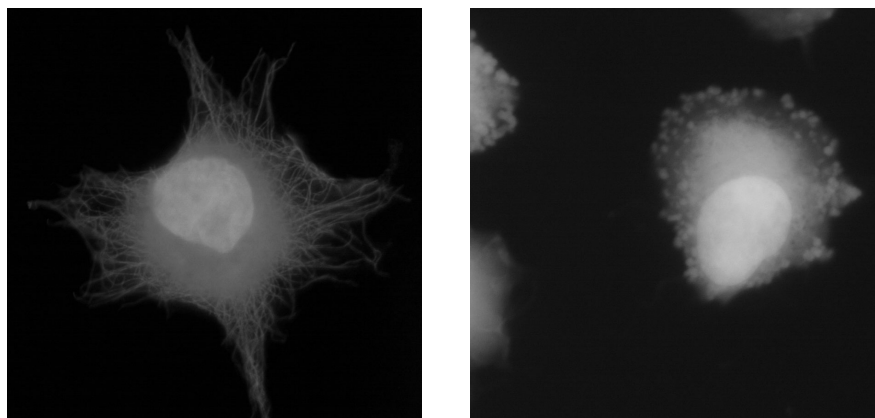
Zdolność do blokowania progresji cyklu komórkowego pod wpływem pochodnej chalkonu **AMG-175** w mitozie sugerowała, że związki te mogą mieć bezpośredni wpływ na strukturę/polimeryzację tubuliny, zaangażowanej w tworzenie wrzeciona podziałowego i umożliwiającego podział jądra i zawartości komórki podczas mitozy, aberratywny rozdział chromosomów i śmierć komórki.

W celu wyjaśnienia możliwego wpływu badanych związków na mikrotubule, komórki po inkubacji w obecności związku **AMG-175** przy dawce cytotoksycznej poddano analizie metodą immunofluorescencji z użyciem przeciwciał anty-tubuliny  $\beta$  połączonej z obserwacją mikroskopową. Na Rys. 10 pokazano przykładowe zdjęcia komórek *A549* nietraktowanych (prawe zdjęcie) i traktowanych pochodną **AMG-175** (lewe zdjęcie). Jak widać struktura mikrotubul jest zaburzona w komórkach traktowanych badanym związkiem i w cytoplazmie powstają zgrupowania białka tubuliny, szczególnie widoczne jako zielone plamy na obrzeżach

komórki. Może to sugerować, że związek **AMG-175** ma zdolność do zaburzenia polimeryzacji tubuliny co powoduje zablokowanie przejścia przez mitozę.

Rysunek 10

Morfologia jądra (barwionego DAPI – fluorescencja niebieska) i mikrotubul (przeciwciała znakowane FITC - fluorescencja zielona) komórek A549 nietraktowanych (prawe zdjęcie) i traktowanych związkiem **AMG-175** (1  $\mu\text{M}$  przez 6 h) (lewe zdjęcie). Powiększenie x600.



Podsumowując wyniki uzyskane dla nowej generacji pochodnych chalkonu można stwierdzić ,że:

- Wszystkie badane preparaty były nieaktywne lub wykazywały jedynie słabą aktywność w stosunku do testowanych szczepów bakterii i grzybów. Wykazano jednak, że część związków zwiększa wrażliwość grzybów patogennych, wykazujących fenotyp oporności wielolekowej na działanie ketokonazolu, co sugeruje ich wpływ na pompy błonowe grzybów. Dla kilkunastu związków wykazano znaczącą aktywność przeciwgruźliczą.
- Badania cytotoksyczności w stosunku do komórek nowotworowych wykazało bardzo silną i selektywną w stosunku do poszczególnych linii komórkowych aktywność części preparatów, najsilniejszy efekt cytotoksyczny ( $\text{IC}_{50} = 0.04 \mu\text{M}$ ) wykazał związek **AMG-175** w stosunku do komórek *HeLa*. Porównanie cytotoksyczności badanych związków w stosunku do komórek raka szyjki macicy *MES-SA*, oraz ich wariantu opornego na doxorubicynę *MES-SA/DX* wykazało dużą aktywność względem komórek lekoopornych.
- Stwierdzono silne i interesujące działanie części badanych związków w stosunku do wirusa CSFV, np. związek **AMG-164** w stężeniu 500 ng/mL powodował całkowite zahamowanie namnażania się wirusa, przy 100 % przeżywalności komórek gospodarza.

- Badania mechanizmu działania najaktywniejszej pochodnej (**AMG-175**) wykazały, że komórki po traktowaniu **AMG-175** zatrzymują proliferację w fazie mitozy a w konsekwencji działania związku dochodzi do niezwykle zaburzeń w rozdziale chromosomów, mikronukleacji i śmierci komórek. Wykazano również, że związek **AMG-175** ma zdolność do zaburzenia polimeryzacji tubuliny co może być przyczyną zablokowanie przejścia przez mitozę.

## 5. PODSUMOWANIE

Celem programu badawczego, którego wyniki przedstawiono w tej rozprawie było otrzymanie siarkowych analogów flawonoidów i ich ocena jako potencjalnego źródła nowych substancji biologicznie czynnych.

Tabela 22

Struktury otrzymanych siarkowych analogów flawonoidów i związków pokrewnych

Pozycja	Struktura	Lit.	Pozycja	Struktura	Lit.
1		75, 76	2		75, 76
3		76	4		76
5		100, 101	6		100
7		100	8		79, 80
9		91 - 93	10		92, 93
11		92, 93			

Związki otrzymane w wyniku realizacji tego programu przedstawiono w tabeli 22, ich cechą wspólną jest to, że wszystkie zawierają podstawowy układ flawonoidowy i trzy potencjalne centra aktywne (dwa atomy tlenu i jeden atom siarki) związane z pierścieniem A tego układu. Pochodne te można podzielić na kilka grup strukturalnych, a mianowicie:

- grupę pochodnych tioflawanonu, tioflawonu oraz ich ditlenków, zawierających ugrupowanie p-hydrochinonu (tabela 22, pozycje 1 - 4);
- grupę pochodnych sulfonu fenyloowo winylowego zawierającego w pierścieniu aromatycznym układ p-hydrochinonu (tabela 22, pozycja 5). Wykazano również możliwość cyklizacji tych związków do sulfonowych analogów flawanonów (tabela 22, pozycja 7);
- grupę pochodnych tioauronu zawierających układ p-hydrochinonu (tabela 22, pozycja 8);
- trzy grupy pochodnych chalkonu sprzężonych z pierścieniem oksatiolonu (tabela 22, pozycje 9 - 11).

Synteza powyższych związków pozwoliła na ocenę aktywności biologicznej pochodnych tioflawonoidów o wymienionych cechach strukturalnych. Niestety, wyniki testów biologicznych dla związków 1 – 7 nadal są utajnione przez firmę TAIHO i nie mogły być zaprezentowane ani w publikacjach ani w tej rozprawie.

Dla następnej grupy pochodnych, dla tioauronów (związki 8), przetestowano aktywność cytotoksyczną *in vitro* i stwierdzono, że znacząca część związków jest aktywna. Z tego względu pochodne te wydają się stanowić ciekawą klasę związków wiodących w poszukiwaniu substancji o działaniu przeciwnowotworowym. Ich istotną zaletą jest selektywność działania w stosunku do różnych linii komórkowych oraz bardzo duże możliwości modyfikacji strukturalnych, co stwarza potencjalnie szansę na znaczące zwiększenie aktywności i na optymalizację własności farmakokinetycznych.

Dla pochodnych chalkonu (związki 9 - 11) przeprowadzono wielokierunkową ocenę aktywności biologicznej, obejmującą działanie cytostatyczne, przeciwgrzybowe, przeciwbakteryjne i przeciwgruźlicze. Żadna z tych grup nie wykazuje znaczącego działania bakteriostatycznego czy też przeciwgrzybowego. Jednakże, niektóre pochodne, np. związki **170 – 173** (tabela 15) mogą posłużyć jako związki wiodące do dalszych modyfikacji strukturalnych mających doprowadzić do otrzymania pochodnych o takiej właśnie aktywności. Dużo lepsze wyniki uzyskano w testach cytotoksyczności, gdyż praktycznie we wszystkich badanych grupach chalkonów można znaleźć związki o znaczącej aktywności w tym kierunku.

Modyfikacje strukturalne chalkonów opisanych w tej rozprawie doprowadziły do otrzymania pochodnych o bardzo dobrej aktywności cytotoksycznej *in vitro* (rozdział 4.5.). Dla najbardziej aktywnego związku z tej grupy ustalono, że jego celem molekularnym jest

polimeryzacja tubuliny. Badania te są kontynuowane i obecnie koncentrują się na uściśleniu mechanizmu działania i wyselekcjonowaniu pochodnych aktywnych *in vivo*.

Niezależnie od realizacji głównego celu realizowanego programu, doprowadził on do otrzymania kilku znaczących wyników chemicznych, są one wymienione w tabeli 23.

Tabela 23

Ważniejsze osiągnięcia opisane w prezentowanej rozprawie

Pozycja	Osiągnięcie
1	Opracowanie syntezy pochodnych tioflawanonu zawierających ugrupowanie p-hydrochinonu [76].
2	Opracowanie syntezy i wykazanie aktywności cytotoksycznej pochodnych tioauronu. Związki te mogą stanowić nową strukturę wiodącą w poszukiwaniu leków przeciwnowotworowych [79, 80].
3	Opracowanie syntezy i wykazanie aktywności cytotoksycznej nowej klasy pochodnych chalkonu. Związki te mogą stanowić nową strukturę wiodącą w poszukiwaniu leków przeciwnowotworowych [91 – 93].
4	Opracowanie nowej, łagodnej metody deprotekcji tioeterów p-metoksybenzylowych, polegającej na ogrzewaniu tioeteru w etanolowym roztworze azotanu srebra [76].
5	Opracowanie metody deprotekcji eterów fenylowo-metylowych i allilowo-fenylowych z użyciem kompleksu $\text{BF}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ , umożliwiającej selektywną deprotekcję jednej grupy metoksylowej (lub alliloksylowej) z kilku obecnych w cząsteczce [80, 81].
6	Wyjaśnienie mechanizmu powstawania pochodnych tioauronu w reakcji pochodnych benzaldehydu z 4-acetylo-2-okso-benz[1,3]oksatiolem [79].
7	Wyjaśnienie mechanizmu izomeryzacji 4,4'-dimetoksy-7,7'-di(piperydynokarbonyloksy)-3'-hydroksy-3'-metyl-3-keto-[3,3'-spirobi(2H, 2'H, 3H, 3'H-benzo[b]tiopenu)] ( <b>74</b> ) [82]
8	Wykorzystanie sprzężeń dalekiego zasięgu NMR do odróżnienia struktury

tioauronu od tioflawonu oraz do ustalenie geometrii wiązania podwójnego w tioauronach [79].

- 9** Opracowanie artykułu przeglądowego omawiającego chemię i reaktywność pochodnych tioauronu [78].

Na zakończenie chciałbym zaznaczyć, że poza wynikami uzyskanymi w ramach pierwszej umowy z firmą TAIHO, w latach 1993 – 1994, która była kierowana przez Prof. Jerzego Konopę, wszystkie pozostałe rezultaty otrzymano w ramach sformułowanych i kierowanych przeze mnie projektów, i że prace te były finansowane wyłącznie z uzyskanych przeze mnie grantów.



## 6. LITERATURA

1. Geissman, T.A. *Chemistry of the Flavonoid Compounds*, Pergamon Press, Oxford, **1962**.
2. Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H.; *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, **1975**.
3. Cody, V.; Middleton Jr, E.; Harborne, J.B. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*, Alan R. Liss Inc., New York, **1986**.
4. Das, A. Wang, J.H.; Lien, E.J. in *Progress Drug Res.*, **1994**, *42*, Jucker, E. Ed., p. 133-166; Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis.
5. Middleton Jr., E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 673-751; The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer.
6. Pietta, P-G. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042; Flavonoids as Antioxidants.
7. Boumendjel, A.; Di Pietro, A.; Dumontet, c.; Barron, D. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 512-529; Recent Advances in the Discovery of Flavonoids and analogs with High-Affinity Binding to P-Glycoprotein Responsible for Cancer Cell Multidrug Resistance.
8. Hodek, P.; Trefil, P.; Stiborova, M. *Chem-Biol. Interact.* **2002**, *139*, 1-21; Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450.
9. Boumendjel, A. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2621-2630; Aurones: A Subclass of Flavones with Promising Biological Potential.
10. Rice-Evans, C.; Packer, L. Ed., *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, **2003**.
11. RiceEvans, C. *Free Rad. Biol. Med.*, **2004**, *36*, 827-828; Flavonoids and isoflavones: Absorption, metabolism, and bioactivity.
12. Walle, T. *Free Rad. Biol. Med.*, **2004**, *36*, 829-837; Absorption and metabolism of flavonoids.
13. Manach, C.; Donovan, J.L. *Free Rad. Res.*, **2004**, *38*, 771-785; Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans.
14. Youdim, K.A.; ShukittHale, B.; Joseph, J.A. *Free Rad. Biol. Med.*, **2004**, *37*, 1683-1693; Flavonoids and the brain: Interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system

15. Kim, H.P.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S. *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *96*, 229-245; Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms.
16. Williamson, G.; Barron, D.; Shimoi, K.; Terao, J. *Free Rad. Res.* **2005**, *39*, 457-469; In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo.
17. Lawrence, N.J.; McGown, A.T. *Curr. Pharmaceut. Design.* **2005**, *11*, 1679-1693; The chemistry and biology of antimitotic chalcones and related enone systems.
18. Botta, B.; Vitali, A.; Menendez, P.; Misiti, D.; DelleMonache, G. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 713-739; Prenylated flavonoids: Pharmacology and biotechnology.
19. Ni, L.M.; Meng, C.Q.; Sikorski, J.A. *Exp. Opin. Therap. Pat.* **2004**, *14*, 1669-1691; Recent advances in therapeutic chalcones.
20. Kim, H.P.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S. *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *96*, 229-245; Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms.
21. Thomasset, S.C; Berry, D.P; Garcea, G.; Marczyklo, T.; Steward, W.P.; Gescher, A.J. *Int. J. Cancer*, **2007**, *120*, 451-458; Dietary polyphenolic phytochemicals - Promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties.
22. Agarwal, R.; Agarwal, C.; Ichikawa, H.; Singh, R.P.; Aggarwal, B.B. *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 4457-4498; Anticancer potential of silymarin: From bench to bed side.
23. Gazak, R.; Walterova, D.; Kren, V. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 315-338; Silybin and silymarin - New and emerging applications in medicine.
24. Erdman, J.W.; Balentine, D.; Arab, L.; Beecher, G.; Dwyer, J.T.; Folts, J.; Harnly, J.; Hollman, P.; Keen, C.L.; Mazza, G.; Messina, M.; Scalbert, A.; Vita, J.; Williamson, G.; Burrowes, J. *J. Nutrition*, **2007**, *137*, 718S-737S; Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC.
25. Hendrich, A.B. *Acta Pharmacol. Sinica*, **2006**, *27*, 27-40; Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds.
26. Kitagawa, S. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1-6; Inhibitory effects of polyphenols on P-glycoprotein-mediated transport.
27. Tian, W.X. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 967-977; Inhibition of fatty acid synthase by polyphenols
28. Morris, M.E.; Zhang, S.Z. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2116-2130; Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters.

29. Brand, W.; Schutte, M.E.; Williamson, G.; vanZanden, J.J.; Cnubben, N.H.P.; Groten, J.P.; vanBladeren, P.J.; Rietjens, I.M.C.M. *Biomed. Pharmacother.* **2006**, *60*, 508-519; Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, food-borne toxic compounds and bioactive ingredients.
30. Kumazawa, Y.; Kawaguchi, K.; Takimoto, H. *Curr. Pharmaceut. Design*, **2006**, *12*, 4271-4279; Immunomodulating effects of flavonoids on acute and chronic inflammatory responses caused by tumor necrosis factor alpha.
31. Byrtus, H. w *Chemia leków*, Zejca, A; Gorczyca, M. red., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, **1999**, str. 569.
32. Liu, M.; Wilairat, P.; Croft, S.L.; Tan, L-C. A.; Go, M-L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2729-2738; Structure-Activity Relationships of Antileishmanial and Antimalarial Chalcones.
33. Balint, J.; Bogнар, R.; Rakosi, M. w *Organic Sulfur Chemistry*, Bernardi, F.; Csizmadia, I.G.; Mangini, A. Eds, Elsevier, Amsterdam **1985**, str. 660-706; Chemistry of Sulfur Containing Flavonoids.
34. Nakazumi, H.; Ueyama, T.; Kitao, T. *J. Heterocyclic Chem.* **1984**, *21*, 193-196; Synthesis and Antibacterial Activity of 2-Phenyl-4*H*-benzo[b]thiopyran-4-ones (Thioflavones) and Related Compounds.
35. Nakazumi, H.; Ueyama, T.; Kitao, T. *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, *22*, 1593-1598; Antimicrobial Activity of 3-(Substituted Methyl)-2-phenyl-4*H*-1-benzothiopyran-4-ones.
36. Nakazumi, H.; Ueyama, T.; Sonoda, H.; Kitao, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1984**, *57*, 2323-2324; Synthesis of 3-(Substituted Methyl)-2-phenyl-4*H*-benzothiopyran-4-ones .
37. Nakazumi, H.; Kobara, Y.; Kitao, T. *J. Heterocyclic Chem.* **1992**, *29*, 135-139; Synthesis and Insecticidal Activity of 4-(Aminomethyl)-2*H*-1-benzothiopyran-2-ones (Thiocumarins) and Related Compounds.
38. Rimbault, C.G. **1989**, *patent USA nr 4,885,298*; Pharmaceutical Preparations Containing Flavanone or Thioflavanone Derivatives the Use Thereof, Novel Flavanones and Thioflavanones, and Processes for Their Manufacture.
39. Dhanak, D.; Keenan, R.M.; Burton, G.; Kaura, A.; Darcy, M.G.; Shah, D.H.; Ridgers, L.H.; Breen, A.; Lavery, P.; Tew, D.G.; West, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3677-3682; Benzothiopyran-4-one Based Reversible Inhibitors of the Human Cytomegalovirus (HCMV) Protease.

40. Wang, H-K.; Bastow, K.F.; Cosentino, L.M.; Lee, K.H. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1975-1980; Antitumor Agents. 166. Synthesis and Biological Evaluation of 5,6,7,8-Substituted-2-phenylthiochromen-4-ones.
41. Kataoka, T.; Watanabe, S.; Mori, E.; Kadomoto, R.; Tanimura, S.; Kohno, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2397-2407; Synthesis and structure-activity relationships of thioflavone derivatives as specific inhibitors of the ERK-MAP kinase signaling pathway.
42. Mora, A.; Paya, M.; Rios, J.L.; Alcaraz, M.J. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 793-797; Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation.
43. Pathak, D; Pathak, K.; Singla, A.K. *Fitoterapia*, **1991**, *62*, 371-389; Flavonoids as medicinal agents- Recent advances.
44. Das, N.P.; Ramanathan, L. in *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications*, Ong, A.S.H. & Packer, L. Eds., Birkhauser Verlag, Basel, **1992**; p. 295-306; Studies on Flavonoids and Related Compounds as Antioxidants in Food.
45. Miyahara, M.; Ohtaka, H.; Katayama, H.; Tatsumi, Y.; Miyaichi, Y. *Yakugaku Zasshi*, **1993**, *113*, 133-154; Structure-Activity Relationship of Flavonoids In Suppressing Rat Liver Lipid Peroxidation.
46. Hu, J.P.; Calomme, M.; Lasure, A.; De Bruyne, T.; Pieters, L.; Vlietinck, A.; Vanden Berghe, D.A. *Biol. Trace Elem. Res.* **1995**, *47*, 327-331; Structure Activity Relationship of Flavonoids with Superoxide Scavenging Activity.
47. Van Hacker, S.A.B.E.; van den Berg, D-J.; Tromp, M.N.J.L.; Griffioen, D.H.; van Bennekom, W.P.; van der Vijgh, W.J.F.; Bast, A. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, *20*, 331-342. Structural Aspects of Antioxidant activity of Flavonoids.
48. Foti, M.; Piattelli, M.; Baratta, M.T.; Ruberto, G. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 497-501; Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship.
49. Williams, R.J.; Spencer, J.P.E.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 838-849; Flavonoids: Antioxidants or Signaling Molecules?
50. Manach, C.; Regarat, F.; Texier, O.; Agullo, G.; Demigne, C.; Remesy, C. *Nutrition Res.* **1996**, *16*, 517-544; Bioavailability, Metabolism and Physiological Impact of 4-Oxo-flavonoids.
51. Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. *Arch. Toxicol. Suppl.* **1998**, *20*, 237-248; Bioavailability and Health Effects of Dietary Flavonols in Man.

52. Hollman, P.C.H.; Bijlsman, M.N.C.P.; van Gameren, Y.; Cnossen, E.P.J. de Vries, J.H.M.; Katan, M.B. *Free Rad. Res.* **1999**, *31*, 569-573; The Sugar Moiety is a Major Determinant of the Absorption of Dietary Flavonoid Glycosides in Man.
53. Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094-1117; Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health.
54. Scalbert, A.; Williamson, G. *J. Nutr. Suppl.* **2000**, 2073S-2085S (Materials from the Symposium “Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine”); Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols.
55. Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Démigné, C.; Rémésy, C. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2109-2114; Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats.
56. Ollila, F.; Halling, K.; Vuorela, P.; Vuorela, H.; Slotte, J.P. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *399*, 103-108; Characterization of Flavonoid-Biomembrane Interactions.
57. Spencer, J.P.E.; Abd El Mohsen, M.M.; Rice-Evans, C. *Archiv. Biochem. Biophys.* **2004**, *423*, 148-161; Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity.
58. Walle, T. *Free Rad. Biol. Med.* **2004**, *36*, 829-837; Absorption and Metabolism of Flavonoids
59. Nikolic, D.; van Breemen, R.B. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 387-397; New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes.
60. Kroon, P.A.; Clifford, M.N.; Crozier, A.; Day, A.J.; Donovan, J.L.; Manach, C.; Williamson, G. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 15-21; How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?
61. Rishton, G.M. *Drug Disc. Today* **2003**, *8*, 86-96; Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening.
62. Cheng, Z.Y.; Ren, J.; Yan, G.T.; Li, Y.Z.; Chang, W.B.; Chen, Z.D. *Bioorg. Chem.* **2003**, *31*, 149-162; Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds.
63. Shadyro, O.I.; Edimecheva, I.P.; Glushonok, G.K.; Ostrovskaya, N.I.; Polozov, G.I.; Murase, H.; Kagiya, T. *Free Rad. Res.* **2003**, *37*, 1087-1097; Effects of phenolic compounds on reactions involving various organic radicals.

64. Baldock, R.W.; Hudson, P.; Katritzky, A.R.; Soti, F. *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1974**, 1422-1427; Stable Free Radicals. Part I. A New Principle governing the Stability of Organic Free Radicals.
65. Stella, L.; Janousek, Z.; Merényi, R.; Vieche, H.G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 691-692; Stabilization of Radicals by "Capto-Dative" Substitution - C-C Addition to Radiophilic Olefins.
66. Deuchert, K.; Hünig, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 875-886; Multistage Organic Redox Systems - A General Structural Principle.
67. Viehe, H.G.; Merényi, R.; Stella, L.; Janousek, Z. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 917-932; Capto-dative Substituent Effects in Syntheses with Radicals and Radicophiles.
68. Harborne, J.B.; Baxter, H.; Moss, G.P. Eds., *Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Francis Ltd, London, **1999**.
69. Hausen, B.M.; Schmalte, H.W.; Marshall, D.; Thomson, R.H. *Arch. Dermatol. Res.* **1983**, *275*, 365-370; 5,8-Dihydroxyflavone (primetin) the contact sensitizer of *Primula mistassinica* Michaux.
70. Tokalov, S.V.; Kind, B.; Wollenweber, E.; Gutzeit, H.O. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 239-245; Biological Effects of Epicuticular Flavonoids from *Primula denticulata* on Human Leukemia Cells.
71. Edenharder, R.; Keller, G.; Platt, K.L.; Unger, K.K. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2767-2773; Isolation and Characterization of Structurally Novel Antimutagenic Flavonoids from Spinach (*Spinacia oleracea*).
72. Hsieh, H-K.; Lee, T-H.; Wang, J-P.; Wang, J-J.; Lin, C-N. *Pharmaceut. Res.* **1998**, *15*, 39-46; Synthesis and Anti-inflammatory Effect of Chalcones and Related Compounds.
73. Nam, N-H.; Kim, Y.; Sou, Y-J.; Hong, D-H.; Kim, H-M.; Ahn, B-Z. *Europ. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 179-187; Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity.
74. Ko, H-H.; Tsao, L-T.; Yu, K-L.; Liu, C-T.; Wang, J-P.; Lin, C-N. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 105-111; Structure –Activity Relationship Studies on Chalcone Derivatives: The Potent Inhibition of Chemical Mediators Release.
75. Konopa, J.K.; Konieczny, M.T.; Horowska, B.J.; Kunikowski, A.J.; Asao, T.; Nishino, H.; Yamada, Y. **1997**, *Patent japoński nr 9025278*; 2-Thioflavone derivative and its production.

76. Konieczny, M.T. Horowska, B.; Kunikowski, A.; Konopa, J.; Wierzba, K.; Yamada, Y.; Asao, T. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*(2), 359 - 364; Synthesis and reactivity of 5,8-dihydroxythioflavanone derivatives.
77. Taylor, A.W.; Dean, D.K. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1845-1848; A New Synthesis of Thioflavones.
78. Konieczny, M.T.; Konieczny, W. *Heterocycles*, **2005**, *65*, 451-464; Synthesis and Reactivity of Thioaurones over the Past One Hundred Years.
79. Konieczny, M.T.; Konieczny, W.; Wolniewicz, S.; Wierzba, K.; Suda, Y.; Sowiński, P. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8648-8655; New Domino Reaction. One Pot Synthesis of 4,7-Dihydroxythioaurone Derivatives from Benzaldehydes and 4-Acetyl-2-oxo-benz[1,3]oxathiole.
80. Konieczny, M.T.; Konieczny, W.; Okabe, S.; Tsujimoto, H.; Suda, Y.; Wierzba, K., *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 350-353; Synthesis and Cytostatic Activity of 4,7-Dihydroxythioaurone Derivatives. Effect of B Ring Substitution on the Activity.
81. Konieczny, M.T.; Maciejewski, G.; Konieczny, W. *Synthesis*, **2005**, 1575-1577; Selectivity Adjustment in the Cleavage of Allyl Phenyl and Methyl Phenyl Ethers with Boron Trifluoride - Methyl Sulfide Complex.
82. Konieczny, M.T.; Konieczny, W. XLIX Zjazd PTChem i SITPChem, Gdańsk, 18-22 września **2006**, *Materiały zjazdowe*, str. 60; Mechanizm izomeryzacji 4,4'-dimetoksy-7,7'-di(piperydynokarbonyloksy)-3'-hydroksy-3'-metylo-3-keto-[3,3'-spirobi(2H, 3H, 3'H-benzo[b]tiofenu)].
83. Kalinowski, H. O.; Berger, S.; Braun, S. *Carbon 13 NMR Spectroscopy*, John Wiley, N.Y. 1991, p. 526.
84. Marshall, J. L. *Carbon - Carbon and Carbon - Hydrogen NMR Couplings*, Verlag Chemie Int., Deerfield Beach, 1983, p.33.
85. Eggers, K.; Fyles, T.M.; Montoya-Pelaez, P.J. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 2966-2977; Synthesis and Characterization of Photoswitchable Lipids Containing Hemithioindigo Chromophores.
86. Steinle, W.; Rück-Braun, K. *Organic Lett.*, **2003**, *5*, 141-144; Synthesis and Characterization of Novel Bifunctional Hemithioindigo Chromophores.
87. Lougheed, T.; Borisenko, V.; Hennig, T.; Rück-Braun, K.; Woolley, G. A. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 2798-2801; Photomodulation of ionic current through hemithioindigo-modified gramicidin channels.

88. Réamonn, L.S.S.; O'Sullivan, W.I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1977**, 1009-1012; Configuration of 2-Arylmethylene-2,3-dihydro-5-methylbenzo[b]thiophen-3-ones.
89. Mostoslavskii, M.A.; Izmail'skii, V.A. *J. Gen. Chem. USSR* **1961**, *17*, 21-31; Absorption Spectra of 3-Keto-2,3-dihydrothionaphthene and its Derivatives.
90. Somogyi, L. *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 1159-1165; Elimination, ring contraction, and fragmentation reactions of 1-thioflavanone 1-oxides.
91. Konieczny, M.T.; Konieczny, W.; Sabisz, M.; Składanowski, A.; Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 729-733; Acid-catalyzed synthesis of oxathiolone fused chalcones. Comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line.
92. Konieczny, M.T.; Konieczny, W.; Sabisz, M.; Składanowski, A.; Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55* (5), 817-820; Synthesis of isomeric, oxathiolone fused chalcones, and comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line.
93. Konieczny, M.T.; Konieczny, W.; Pirska, D.; Bułakowska, A.; Sabisz, M.; Składanowski, A.; Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z. *Heterocycles*, **2007**, w druku; Synthesis of oxathiolone fused chalcones bearing o-aminoalkyl side chain. Comparison of stability of isomeric benzoxathiolones under alkylation reaction conditions.
94. Go, M.L.; Wu, X.; Liu, X.L. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 483-499; Chalcones: An Update on Cytotoxic and Chemoprotective Properties.
95. Dhar, D.N. *The Chemistry of Chalcones and Related Systems*, Willey, N.Y. **1981**. 29.
96. Noyce, D.S.; Pryor, W.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1397-1401; Carbonyl Reactions. I. Kinetics and Mechanism of the Acid-catalyzed Aldol Condensation of Benzaldehyde and Acetophenone.
97. Noyce, D.S.; Pryor, W.A.; Bottini, A.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1402-1405; Carbonyl Reactions. II. The Role of the Intermediate Ketol in the Kinetics of the Formation of Chalcone.
98. Davey, W.; Tivey, D.J. *J. Chem. Soc.* **1958**, 1230-1236; Chalcones and Related Compounds. Part iV. Addition of Hydrogen Cyanide to Chalcones.
99. Blatt, A.H. *Org. React.* **1942**, *1*, 342-369; The Fries Reaction.
100. Konieczny, M.T. Horowska, B.; Kunikowski, A.; Konopa, J.; Wierzba, K.; Yamada, Y.; Asao, T. *Synthesis* **2001**, *9*, 1363 - 1367; Synthesis of Polyhydroxylated Derivatives of Phenyl Vinyl Sulfone as Structural Analogs of Chalcones.



101. Konopa, J.K.; Konieczny, M.T.; Horowska, B.J.; Kunikowski, A.J.; Asao, T.; Nishino, H.; Yamada, Y. **1997**, *Patent japoński nr 9003037*; Phenylsulfone derivatives and its production.
102. Pagani, G.; Maiorana, S. *Chimica e l'Industria (Milano)* **1971**, 53, 468.
103. Parham, W. E.; Willette, G. L. *J Org.Chem.* **1960**, 25, 53.
104. Parham, W. E.; Jones, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 1068.
105. Baliah, V.; Ganapathy, K.; Ananthapadmanabhan, S. *Indian J. Chem. Ser. B*, **1982**, 21B, 208.
106. Cao, S.; Fan, A.; Huang, Z.; Zhang, Z. *Synthetic Commun.* **1996**, 26, 3979.
107. Cao, S.; Zhang, Z. *Huaxue Shiji* **1999**, 21, 176; *Chem. Abstr.* **1999**, 131, 144567.
108. Konieczny, M.T. Sprawozdanie z realizacji projektu badawczego nr 2 PO5F 055 28; Nowe pochodne chalkonu: synteza i wielokierunkowa ocena przydatności farmakologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności wobec komórek nowotworowych i wielolekoopornych.