

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

Tomasz Stefański

Projektowanie, synteza i ocena biologiczna tiopochodnych stilbenu

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Stanisław Sobiak



Poznań 2014

Słowa kluczowe:

Polimeryzacja tubuliny

Czynniki antymitotyczne

Stilbeny

Kombretastatyna A-4

Resweratrol

Praca powstała przy wsparciu finansowym projektów badawczych koordynowanych przez Narodowe Centrum Nauki (wcześniej Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego):

1. „Badanie modulacji dróg przekaźnictwa sygnałowego przez naturalne i syntetyczne stilbeny - potencjalne czynniki chemoprewencyjne i chemioterapeutyczne”, nr N N405 209737
2. „Projektowanie, synteza i ocena aktywności biologicznej metylotiopochodnych kombretastatyny A-4- potencjalnych czynników antymitotycznych”, nr 2011/03/B/NZ7/00509

Doktorant był stypendystą w ramach projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego w latach 2012/2013.

Praca została wykonana we współpracy z:

- Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu kierowanym przez Panią prof. dr hab. Wandę Baer-Dubowską – w zakresie badań cytotoxyczości otrzymanych związków,
- Katedrą i Zakładem Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu kierowanym przez Panią prof. dr hab. Jadwigę Jodynis-Liebert – w zakresie badań cytotoxyczości otrzymanych związków,
- Zakładem Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie kierowanym przez Pana prof. dr hab. Andrzeja J. Bojarskiego – w zakresie komputerowo wspomaganego projektowania otrzymanych pochodnych kombretastatyny A-4.

Specjalne podziękowania pragnę złożyć:

*Panu Profesorowi **Stanisławowi Sobiakowi**, mojemu promotorowi za opiekę naukową, poświęcony czas, wsparcie i zaufanie,*

*Panu Doktorowi habilitowanemu **Tomaszowi Goślińskiemu**, kierownikowi Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za szereg cennych uwag i wszelką pomoc w trakcie realizacji niniejszej pracy*

oraz szczególnie

*Pani Doktor **Renacie Mikstackiej** za nieocenioną pomoc podczas przeprowadzania badań nad wpływem otrzymanych związków na polimeryzację tubuliny oraz interpretacji uzyskanych wyników. Ponadto pragnę podziękować za wsparcie, ciągłą motywację zarówno przy ubieganiu się o wsparcie finansowe niniejszej pracy, jak i jego dalszej realizacji oraz przy publikowaniu wyników badań,*

*Panu Doktorowi **Rafałowi Kurczabowi**, mojemu przyjacielowi, za współpracę w zakresie badań wirtualnych oraz interpretację wyników niezbędnych w procedurze projektowania otrzymanych pochodnych kombretastatyny A-4, jak również wiele cennych uwag i dyskusji z tym związanych.*

Pragnę także podziękować:

*Panu Doktorowi **Zbigniewowi Dutkiewiczowi** za współpracę w zakresie badań *in silico* wykorzystanych przy projektowaniu pochodnych kombretastatyny A-4 oraz za pomoc w ich interpretacji,*

*Panu Doktorowi **Michałowi Cichockiemu** oraz Panu Doktorowi habilitowanemu **Markowi Muriasowi** za współpracę w zakresie badań cytotoksyczności otrzymanych związków,*

*Pani Magister **Agnieszce Gielarze-Korzańskiej** za udostępnienie wyników analizy retgenostrukturalnej,*

*Pani **Ricie Kubie** oraz pozostałym Pracownikom Katedry za miłą atmosferę i pomoc w trakcie wykonywania badań.*

*Pamięci Mamy i Tacie za potrzebne wsparcie.
Pracę pragnę zadedykować mojej ukochanej żonie Oli oraz dzieciom:
Piotrusiowi i Kasi.*

Część zaprezentowanych w tej pracy wyników opisują badania przedstawione w następujących publikacjach naukowych, jak również zgłoszenia patentowe:

1. Mikstacka, R.; Rimando, A. M.; Dutkiewicz, Z.; Stefański, T.; Sobiak, S. Design, synthesis and evaluation of the inhibitory selectivity of novel trans-veratrol analogues on human recombinant CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 5117-5126.
2. Gielara-Korzańska, A.; Stefański, T.; Korzański, A.; Sobiak, S. (E)-1-[4-(Methylsulfanyl)phenyl]-2-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-ethene. *Acta Crystallographica E* **2012**, 68, o2791.
3. Mikstacka, R.; Stefański, T.; Różański, J. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2013**, 18, 368-397.
4. Zgłoszenie Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej nr P.398659.
Tytuł: „*Nowe pochodne (Z)-1,2-difenyloetenu*”
Autorzy: Stefański Tomasz, Różański Jakub
Data potwierdzenia zgłoszenia: 29.03.2012
5. Zgłoszenie międzynarodowe WIPO/PCT nr WO/2013147629 A1.
Tytuł: „*The new derivatives of (Z)-1,2-diphenylethene*”
Autorzy: Stefański Tomasz, Różański Jakub, Mikstacka Renata, Sobiak Stanisław
Data potwierdzenia zgłoszenia: 28.03.2013

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	12
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA	14
2.1. Projektowanie leków wspomagane komputerowo.....	14
2.1.1. Wirtualny skrining (VS)	15
2.1.2. Metody bazujące na strukturze związków aktywnych (LBVS).....	17
2.1.2.1. Deskryptory i fingerprinty molekularne.....	17
2.1.2.2. Modele farmakoforowe	19
2.1.2.3. Metody przeszukiwania przestrzeni chemicznej i eksploracja danych	20
2.1.3. Metody oparte na strukturze miejsca aktywnego.....	21
2.1.3.1. Dokowanie molekularne	22
2.1.3.2. Fingerprinty oddziaływań ligand – receptor.	25
2.1.4. Bioizosteryzm - strategia w racjonalnym projektowaniu leków przy optymalizacji struktury wiodącej.....	26
2.2. Mikrotubule jako cel molekularny dla związków o aktywności przeciwnowotworowej.....	28
2.2.1. Struktura mikrotubul i ich dynamiczna niestabilność	29
2.2.2. Struktura tubuliny.....	31
2.2.3. Czynniki oddziałujące na polimeryzację tubuliny i ich domeny wiążące.....	33
2.2.3.1. Kolchicynowa domena wiążąca	34
2.3. Naturalne pochodne stilbenu - struktury wiodące w projektowaniu leków przeciwnowotworowych.....	36
2.3.1. Charakterystyka ogólna.....	36
2.3.2. Resweratrol (RSV)	38
2.3.3. Przykłady naturalnych pochodnych resweratrolu	41
2.3.4. Kombretastatyna A-4 (CA-4) i analogi.....	41
2.3.5. Aktywność farmakologiczna pochodnych stilbenu.....	44

2.3.5.1.	Resweratrol i jego pochodne	45
2.3.5.2.	Kombretastatyna A-4 (CA-4).....	48
2.3.6.	<i>Zależność między budową a działaniem (badania SAR) pochodnych RSV.....</i>	<i>50</i>
2.3.7.	<i>Zależność między budową a działaniem (badania SAR) – aktywne analogi CA-4 i CA-1.....</i>	<i>51</i>
2.4.	Podstawowe kierunki syntezy pochodnych stilbenu.....	58
2.4.1.	Synteza Perkina.....	58
2.4.2.	Reakcja Wittiga i jej modyfikacje	60
2.4.3.	Reakcja Hornera-Woodswortha-Emmonsa (HWE).....	64
2.4.4.	Reakcja Hecka	65
2.4.5.	Synteza McMurry’ego.....	67
2.4.6.	Reakcja Suzuki.....	67
2.4.7.	Reakcja krzyżowej metatezy alkenów	68
3.	CEL PRACY	71
4.	CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	72
4.1.	Komputerowo wspomagane projektowanie tiopochodnych CA-4.....	72
4.1.1.	<i>Uwagi ogólne.....</i>	<i>72</i>
4.2.	Synteza tiopochodnych RSV i CA-4.....	72
4.2.1.	<i>Uwagi ogólne.....</i>	<i>72</i>
4.2.2.	<i>Wykaz stosowanych rozpuszczalników i reagentów.....</i>	<i>74</i>
4.3.	Synteza tiopochodnych RSV	76
4.3.1.	<i>Synteza 4-metylotiobenzylfosfonianu dietylu (Fos1).....</i>	<i>76</i>
4.3.2.	<i>Generalna procedura syntezy związków S1-S8.....</i>	<i>77</i>
4.4.	Synteza CA-4.....	81
4.5.	Synteza tiopochodnych CA-4.....	83
4.5.1.	<i>Synteza bromobenzaldehydów.....</i>	<i>83</i>
4.5.2.	<i>Synteza O-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów.....</i>	<i>84</i>

4.5.3.	<i>Synteza S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów</i>	87
4.5.4.	<i>Synteza cyklicznych acetai (1,3-dioksolanów) wybranych S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów</i>	91
4.5.5.	<i>Synteza metylotiobenzaldehydów</i>	92
4.5.6.	<i>Synteza pochodnych kwasu α-fenylocynamonowego (Kom-C)</i>	96
4.5.7.	<i>Synteza pochodnych (Z)-stilbenu (Kom)</i>	98
4.5.8.	<i>Synteza oksazolowych pochodnych CA-4 (KomOx)</i>	100
4.5.9.	<i>Synteza N-metyloimidazolowych pochodnych CA-4 (KomNMeI)</i>	112
4.6.	Badania biologiczne	118
4.6.1.	<i>Badanie wpływu wybranych tiopochodnych RSV i CA-4 na proces polimeryzacji tubuliny in vitro</i>	118
4.6.1.1.	Materiały i odczynniki	118
4.6.1.2.	Zasada metody.....	118
4.6.1.3.	Metodyka.....	119
4.6.2.	<i>Badanie cytotoksyczności tiopochodnych RSV i CA-4 (test żywotności komórek – MTT) in vitro</i>	120
4.6.2.1.	Materiały i odczynniki	121
4.6.2.2.	Zasada metody MTT	122
4.6.2.3.	Metodyka.....	122
5.	WYNIKI I DYSKUSJA	124
5.1.	Synteza tiopochodnych RSV	124
5.1.1.	<i>Synteza 4-metylotiobenzylfosfonianu dietylu (FosI)</i>	125
5.1.2.	<i>Generalna procedura syntezy tiopochodnych RSV (S1-S8)</i>	126
5.2.	Badania biologiczne tiopochodnych RSV	136
5.3.	Komputerowo wspomagane projektowanie tiopochodnych CA-4	139
5.4.	Synteza CA-4	148
5.5.	Synteza tiopochodnych CA-4	149
5.5.1.	<i>Synteza tiopochodnych benzaldehydów</i>	149

5.5.1.1.	Synteza bromobenzaldehydów.....	150
5.5.1.2.	Synteza O-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów	151
5.5.1.3.	Synteza S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów	153
5.5.1.4.	Synteza cyklicznych acetai (1,3-dioksolanów) wybranych pochodnych S-tiokarbaminowych benaldehydów	156
5.5.1.5.	Synteza metyloitiobenzaldehydów	158
5.5.2.	<i>Synteza tiopochodnych kwasu α-fenylocynamonowego (Kom-C)</i>	<i>160</i>
5.5.3.	<i>Synteza tiopochodnych (Z)-stilbenu (Kom).....</i>	<i>163</i>
5.5.4.	<i>Synteza tosylometylo izocyjanków (TosMIC).....</i>	<i>164</i>
5.5.5.	<i>Synteza oksazolowych tiopochodnych CA-4 (KomOx).....</i>	<i>166</i>
5.5.6.	<i>Synteza N-metyloimidazolowych tiopochodnych CA-4 (KomNMeI) ...</i>	<i>174</i>
5.6.	Badania biologiczne tiopochodnych CA-4.....	178
6.	PODSUMOWANIE	186
7.	STRESZCZENIE.....	188
8.	ABSTRACT.....	190
9.	BIBLIOGRAFIA	192
10.	SUPLEMENT.....	208
	A. ^1H, ^{13}C, 1D NMR	208
	B. FT IR	344

1. WSTĘP

Poszukiwanie nowych leków jest niezwykle pasjonującym i jednocześnie znużającym procesem leżącym w centrum zainteresowania wielu grup badawczych zajmujących się aspektami chemii medycznej na całym świecie. Ludzkość bowiem od zarania dziejów starała się poszukiwać skutecznych sposobów leczenia różnych schorzeń. Początkowo w oparciu o tak zwaną medycynę ludową wykorzystywano surowce naturalne, by następnie dzięki rozwojowi m.in. metod syntetycznych, technik biochemicznych oraz komputerowego modelowania struktur bardziej racjonalnie podejść do poszukiwania leków. Jako element tych badań wprowadzono metody racjonalnego projektowania leków (ang. *rational drug design*), których wirtualnym rozszerzeniem są metody komputerowo wspomaganego projektowania leków (ang. *computer-aided drug design*, CADD). Ogromny rozwój mocy a co za tym idzie szybkości komputerów oraz dostępność specjalistycznego oprogramowania umożliwiły wykorzystanie tych metod w większości laboratoriów specjalizujących się w dziedzinie chemii medycznej, stając się obok metod tradycyjnych, ważną techniką w badaniach i pracy dydaktycznej. Możliwości, jakie niosą ze sobą powyższe metody dają szansę oraz znacznie przyspieszają możliwości ingerencji w specyficzne właściwości projektowanej cząsteczki, jak poprawa wielu parametrów terapeutycznych, czy też fizykochemicznych np. skuteczności, selektywności, rozpuszczalności oraz zmniejszenia aspektów negatywnych jakimi jest toksyczność.

Pojęcie racjonalnego poszukiwania nowych substancji leczniczych w tym metody CADD wydają się być obecnie bardziej istotne niż kiedykolwiek. Ciągły rozwój cywilizacyjny i postępujące przy tym tempo życia powoduje bowiem nasilenie oddziaływania czynników mających negatywny wpływ na nasze zdrowie. Zwiększeniu ulega odsetek osób dotkniętych zwłaszcza chorobami nowotworowymi, przez co stanowią one światowy problem społeczny. Mimo znacznego postępu w zrozumieniu molekularnych podstaw kancerogenezy i w związku z tym możliwości bardziej racjonalnego projektowania nowych leków, zapadalność na nowotwory nie maleje, a śmiertelność z tym związana w ciągu minionych 25 lat utrzymuje się na podobnym poziomie. Stwarza to zatem potrzebę poszukiwania nowych, skutecznych chemioterapeutyków o wielokierunkowym działaniu przeciwnowotworowym, które nie wykazywałyby jednocześnie toksyczności w stosunku do zdrowych komórek.

Mikrotubule uważane są za jeden z głównych celów molekularnych w terapii chorób nowotworowych. Pełnią one ważną funkcję w trakcie podziału komórek podczas mitozy tworząc wrzeciono podziałowe, dzięki któremu chromosomy rozdzielają się do przeciwległych biegunów komórki. Zablokowanie tego procesu jest więc interesującą drogą zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. Mechanizm ten jest obecnie z powodzeniem wykorzystywany w leczeniu, czego dowodem jest chociażby sukces kliniczny paklitakselu.

Istnieją liczne doniesienia naukowe mówiące o aktywności antymitotycznej pochodnych stilbenowych ze związkami wiodącymi pochodzenia naturalnego: kombretastatyną A-4 (CA-4) oraz resweratrole (RSV) na czele. Istotne więc wydaje się kontynuowanie poszukiwań nowych leków przeciwnowotworowych, których mechanizm działania oparty jest o wpływ na proces polimeryzacji tubuliny właśnie wśród tych pochodnych.

Biorąc pod uwagę tematykę badawczą niniejszej pracy doktorskiej w części literaturowej przedstawiono w trzech głównych wątkach: metody CADD będące wsparciem przy projektowaniu nowych leków, molekularne podstawy aktywności biologicznej, aspekty chemiczne oraz metody syntezy pochodnych RSV i CA-4.

W części wyniki i dyskusja przedstawiono zastosowany protokół do generowania i przeszukiwania kombinatorycznej biblioteki (VCL-VS, ang. *virtual combinatorial library-virtual screening*) związków, dzięki któremu wyselekcjonowano tiopochodne CA-4 poddane następnie syntezie i ocenie aktywności biologicznej. Omówiono metodykę syntezy tiopochodnych stilbenu wraz z analizą uzyskanych danych spektralnych. Ostatecznie przedstawiono wyniki badań *in vitro* oceniające ich aktywność cytotoksyczną na różnych liniach komórek nowotworowych oraz antymiotyczną poprzez wpływ na proces polimeryzacji tubuliny.

W części doświadczalnej przedstawiono informacje ogólne dotyczące zastosowanych narzędzi oraz programów wykorzystywanych przy badaniach *in silico*, poszczególne procedury syntezy umożliwiające otrzymanie nowych tiopochodnych stilbenu wraz z danymi spektralnymi potwierdzającymi ich struktury oraz metodykę badań biologicznych uwzględniając testy cytotoksyczności oraz polimeryzacji tubuliny.

W postaci suplementu zamieszczono widma NMR uzyskanych w trakcie syntezy zarówno struktur pośrednich jak i końcowych związków oraz widma FT IR dla uzyskanych tiopochodnych RSV i CA-4.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

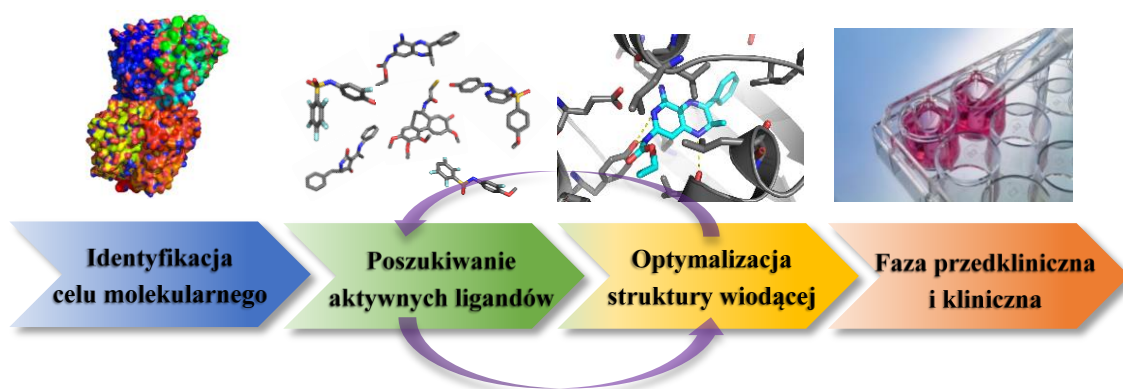
2.1. Projektowanie leków wspomagane komputerowo

Systematyczny wzrost mocy obliczeniowej komputerów, rozwój bioinformatyki oraz dostępność molekularnych baz danych białek i związków chemicznych sprawiają, że komputerowo wspomagane projektowanie leków (CADD) staje się coraz wydajniejszym i coraz częściej stosowanym narzędziem.

Współczesne metody obliczeniowe nie pozwalają jeszcze, co prawda na pewne i wiarygodne przewidzenie ostatecznej struktury działających leków, jakkolwiek umożliwiają wybór obiecujących kandydatów spośród milionów cząsteczek dostępnych zarówno w komercyjnych bazach danych, jak i własnych bibliotekach kombinatorycznych oraz ich optymalizację pod kątem oddziaływania z receptorem. Pozwala to znacznie obniżyć koszty i czas trwania procesu projektowania nowego leku.

Samo odkrywanie nowych leków jest procesem interdyscyplinarnym, w którym wykorzystywana jest wiedza z takich dyscyplin naukowych jak: chemii, biochemii, biologii, farmakologii, farmakokinetyki, medycyny, matematyki oraz informatyki. Proces ten można przedstawić w ogólnej postaci, jako zespół następujących faz (Rysunek 1) uzupełniających się wzajemnie, a mianowicie:

1. Identyfikację celu biologicznego, zwykle białka, którego funkcja biologiczna ma być modulowana przez projektowany lek,
2. Identyfikację struktury wiodącej (ang. *lead structure*),
3. Modyfikację jej struktury celem poprawy właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych,
4. Potwierdzenie aktywności i/lub mechanizmu działania na modelach komórkowych (*in vitro*) i zwierzęcych (*in vivo*),
5. Badania kliniczne.



Rysunek 1. Etapy poszukiwania leków

Poszukiwanie nowych substancji aktywnych, które w przyszłości mogą stać się lekami rozpoczyna się najczęściej od znalezienia struktury/struktur wiodących, czyli związków wykazujących powinowactwo do założonego celu biologicznego. W poszukiwaniach tych wykorzystuje się badania przesiewowe związków pochodzenia naturalnego (produkty mikroorganizmów, roślinne lub morskie) w wybranym teście/testach biologicznych *in vitro*, znane pod nazwą skriningu wysokoprzepustowego (ang. *high-throughput screening*, HTS). Przykładem takich badań była m.in. „wojna z rakiem” ogłoszona przez Kongres Stanów Zjednoczonych oraz Narodowy Instytut Raka (ang. *National Cancer Institute*) na początku lat siedemdziesiątych XX wieku, dzięki którym wyselekcjonowano kilka leków przeciwnowotworowych, w tym m.in. paklitaksel znany pod nazwą handlową jako Taxol[®]. Niestety pomimo dużej wydajności tej metody wskaźnik trafień (ang. *actives hit rate*), tj. stosunek ilości zidentyfikowanych związków wiodących w stosunku do wszystkich przebadanych jest zazwyczaj niski. Dlatego też powstało wiele komplementarnych do HTS metod, z których obecnie najczęściej wykorzystywany jest wirtualny skrining (ang. *virtual screening*, VS).

2.1.1. Wirtualny skrining (VS)

Wirtualny skrining jest komputerową techniką automatycznego przeszukiwania i oceny potencjalnej aktywności biologicznej (rankingowania) dużych baz danych związków chemicznych przy użyciu narzędzi chemoinformatycznych, bioinformatycznych i modelowania molekularnego [1, 2]. Zaletą tej metody jest wykorzystanie metod obliczeniowych, które ograniczają koszty i czas procesu decyzyjnego podczas zawężania bibliotek lub syntezy tylko wybranych, najbardziej aktywnych struktur spośród tysięcy możliwych do otrzymania lub zakupu.

Zależnie od ilości, rodzaju informacji oraz dostępności specjalistycznego oprogramowania, jakimi dysponuje się rozpoczynając opracowanie schematu postępowania w wirtualnym skriningu możemy wyróżnić jego dwie podstawowe metody [2]:

- oparte o znaną lub przewidzianą strukturę receptora (ang. *structure-based virtual screening*, SBVS),
- bazujące na strukturze jego znanych ligandów (ang. *ligand-based virtual screening*, LBVS).

Biorąc pod uwagę różne strategie realizacji protokołu VS wprowadzono również podział na procedurę równoległą i kaskadową. W procedurze równoległej poszczególne związki z biblioteki są niezależnie oceniane różnymi metodami a następnie wszystkie oceny zostają zintegrowane przy wykorzystaniu metod statystycznych (np. fuzji danych) i na ich podstawie tworzona jest sumaryczna klasyfikacja. Dzięki tej procedurze uzyskujemy bardzo duże ilości informacji o wszystkich związkach z danej bazy jednak wykorzystywana może być głównie do oceny małych baz danych (liczących do kilku tysięcy związków) z uwagi na duże wymagania obliczeniowe. Strategia skriningu kaskadowego z kolei polega na selekcji związków, które nie spełniają założonych kryteriów dla danej metody (zastosowanie tzw. filtrów). Pozwala to po każdym etapie coraz bardziej zawęzić przeszukiwaną bazę, co skutkuje nawet kilkudziesięciokrotnym skróceniem czasu obliczeń, w porównaniu do metody równoległej. Niestety wadą tej strategii jest możliwość odrzucenia interesujących związków na jednym z wcześniejszych etapów.

W procesie tworzenia biblioteki związków opartej na procedurze wirtualnego skriningu pojawia się pytanie, jak wybrać te właściwe do dalszej oceny ich właściwości biologicznych. Zastosowanie będą tutaj miały metody filtrowania pozwalające na odrzucenie związków o niepożądanych właściwościach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych. W przypadku metod SBVS wyróżniamy m.in. dokowanie molekularne, fingerprinty oddziaływań ligand receptor natomiast w strategii LBVS wykorzystywany jest stopień podobieństwa do znanych związków o potwierdzonej aktywności (ang. *similarity search*): deskryptory molekularne, fingerprinty molekularne oraz przeszukiwanie w oparciu o modele farmakoforowe.

2.1.2. Metody bazujące na strukturze związków aktywnych (LBVS)

Metody te opierają się na założeniu, że podobieństwo strukturalne związków zwiększa szansę na uzyskanie przez nie podobnego efektu biologicznego [3]. Dla zestawu znanych aktywnych związków można określić pewien wspólny zbiór charakterystycznych cech strukturalnych, topologicznych czy przestrzennych determinujących teoretycznie ich aktywność biologiczną. Dzięki zastosowaniu tak otrzymanego wzorca (hipotezy aktywności), możliwe staje się przeszukiwanie dużych chemicznych baz danych celem znalezienia struktur podobnych. Pomocne są w tym narzędzia chem- i bioinformatyczne oraz metody statystyczne i matematyczne (np. metryki podobieństwa, metody uczenia maszynowego).

2.1.2.1. Deskrytory i fingerprinty molekularne

Aktywność biologiczna związków chemicznych jest wypadkową jego właściwości fizykochemicznych takich jak: rodzaj podstawników, rozmiar cząsteczki, ładunek, polaryzowalność czy rozpuszczalność w wodzie i tłuszczach. Deskrytory są funkcjami pozwalającymi przypisać tym cechom wartości liczbowe [4]. Ze względu na charakter właściwości, które opisują oraz jedno, dwu- lub trójwymiarową strukturę cząsteczki można podzielić je na różne grupy:

- właściwości strukturalne, np.: masa molowa, objętość molekularna, pole powierzchni, momenty bezwładności, liczba wiązań pojedynczych (rotujących), parametry steryczne Tafta,
- właściwości elektronowe, np.: ładunek całkowity, moment dipolowy, polaryzowalność, energia HOMO, energia LUMO, stałe Hammeta, współczynniki indukcyjne i rezonansowe,
- właściwości termodynamiczne, np.: współczynnik podziału między wodę i oktanol (logP), hydrofobowość podstawników, refraktywność molowa,
- właściwości przestrzenne pól - 3D QSAR (ang. *3D quantitative structure-activity relationship*).

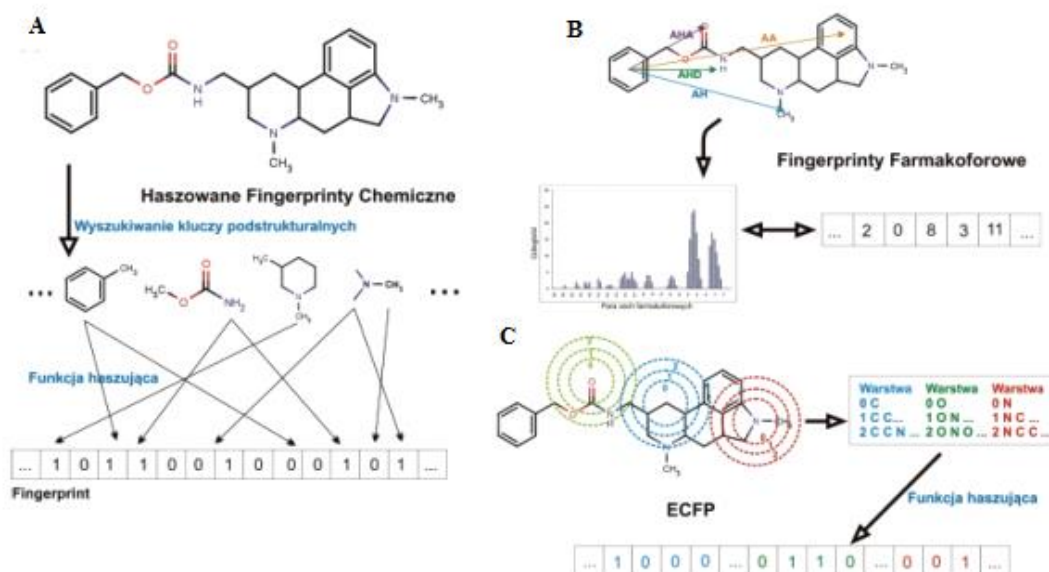
Część deskryptorów molekularnych (np. masa molowa, objętość, ilość rotowanych wiązań pojedynczych, donorów/akceptorów wiązania wodorowego, pierścieni aromatycznych, rozkład ładunku, logP itd.) jest łatwych do obliczenia i dlatego często wykorzystuje się je we wstępnym profilowaniu baz danych. Jednym z wielu popularnych filtrów złożonych z zestawu skalarnych deskryptorów molekularnych jest

tw. reguła 5 Lipińskiego, opracowana na podstawie analizy statystycznej wybranych deskryptorów, obliczonych dla zestawu znanych leków podawanych drogą doustną. Związek chemiczny zgodnie z zasadami tej reguły ma z dużym prawdopodobieństwem szansę stać się strukturą wiodącą a następnie lekiem, gdy.

1. Jego masa molowa jest poniżej 500 Da,
2. clogP (ang. *calculated logP*) jest mniejszy niż 5,
3. Liczba donorów protonów jest mniejsza niż 5,
4. Liczba akceptorów protonów jest mniejsza niż 10.

Obok deskryptorów molekularnych często wykorzystywaną techniką pomocną w filtrowaniu bibliotek wirtualnych są tzw. fingerprinty molekularne (ang. *molecular fingerprint*). Struktura chemiczna jest tutaj reprezentowana w postaci ciągu bitowego, który posiada zakodowane informacje o jej właściwościach strukturalnych, topologicznych czy farmakoforowych. Przyjmuje się, że każda pozycja bitowa w łańcuchu odpowiada określonej funkcji (np. typowi atomu, fragmentowi strukturalnemu, cesze farmakoforowej, itp.) i zostaje włączona (przypisana wartość logiczna 1) lub wyłączona (przypisana wartość logiczna 0), w przypadku gdy dany element jest obecny lub nieobecny w strukturze cząsteczki. W zależności od sposobu konstrukcji fingerprintów molekularnych możemy wyróżnić: haszowane fingerprinty chemiczne (ang. *chemical hashed fingerprints, CHFP*), dwuwymiarowe fingerprinty farmakoforowe (ang. *2D pharmacophore fingerprints, 2DPFP*) oraz rozszerzone fingerprinty bazujące na macierzy połączeń ciężkich atomów w cząsteczce (ang. *extended-connectivity fingerprints, ECFP*). W przypadku haszowanych fingerprintów chemicznych (Rysunek 1a) poszukiwane są w cząsteczce wszystkie podstruktury liniowe (zdefiniowane w postaci kluczy podstrukturalnych), aby następnie przy użyciu wartości liczbowych dla danego typu atomu i wiązania oraz funkcji haszującej sprowadzić je do zapisu w postaci odpowiedniego ciągu bitowego. Dwuwymiarowe fingerprinty farmakoforowe (Rysunek 1b) opisują cząsteczkę za pomocą tzw. funkcji farmakoforowych, czyli rodzajom oddziaływania jakie charakteryzują poszczególne atomy (lub grupy atomów), np. atom tlenu w grupie karbonylowej posiada cechę akceptora wiązania wodorowego, grupa metylowa funkcję hydrofobową, itd. Następnie wyznacza się wszystkie możliwe pary cech farmakoforowych wraz z ich odległościami topologicznymi, a wynik takiego działania przechowywany jest w postaci histogramu lub wektora wartości, czy też wektora binarnego. Fingerprinty ECFP (Rysunek 1c)

natomiast biorą pod uwagę heteroatomy w cząsteczce i tworzą dla nich tzw. warstwy lub powłoki, które opisują schemat połączeń z sąsiadującymi atomami. Ciąg binarny osiągnany jest tutaj przez zastosowanie odpowiedniej funkcji haszującej.



Rysunek 2. Rodzaje fingerprintów molekularnych przedstawione w postaci schematycznej: A – haszowane fingerprinty chemiczne, B – dwuwymiarowe fingerprinty farmakoforowe, C – rozszerzone fingerprinty bazujące na macierzy połączeń ciężkich atomów [5]

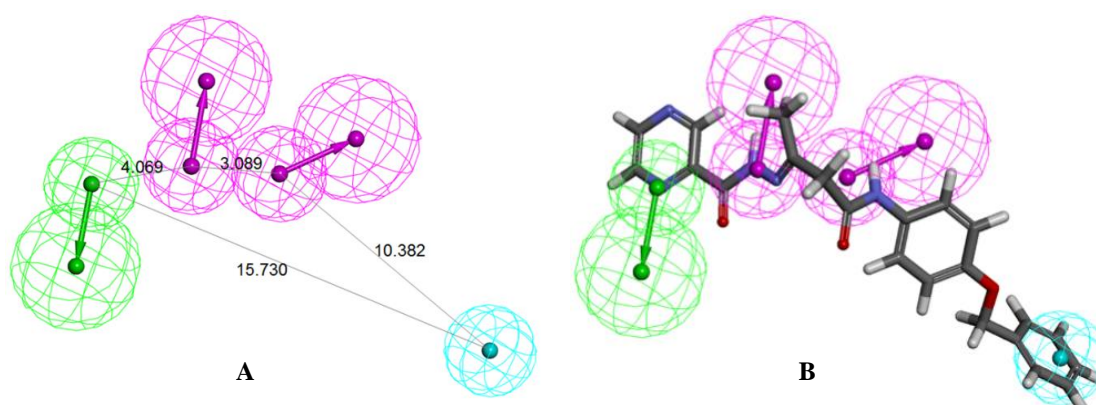
2.1.2.2. Modele farmakoforowe

Pojęcie farmakofora po raz pierwszy zostało wprowadzone w roku 1909 przez Ehrlicha, który zdefiniował farmakofor jako „molekularny szkielet (phoros), zawierający podstawowe informacje odpowiadające za aktywność biologiczną leku (pharmacon). Po ponad stu latach można stwierdzić, że podstawowe pojęcie farmakoforu nie zmieniło się, ale jego znaczenie oraz zakres zastosowań zostały znacznie rozszerzone [6]. Wg najnowszej definicji wprowadzonej przez IUPAC w 1998 roku farmakofor jest zbiorem cech przestrzennych i elektronowych niezbędnych do zapewnienia optymalnych oddziaływań molekularnych z danym celem biologicznym, w celu wywołania (lub blokowania) odpowiedzi biologicznej [7, 8].

Modelowanie farmakoforowe oparte o strukturę znanych ligandów polega na wyodrębnieniu z ich struktur przestrzennych specyficznych cech (funkcji) farmakoforowych odpowiedzialnych za oddziaływanie z łańcuchami bocznymi aminokwasów w miejscu wiążącym (receptorze). Są one opisywane jako: akceptor wiązania wodorowego, donor wiązania wodorowego, pierścień aromatyczny, grupy pozytywnie/negatywnie jonizujące oraz elementy hydrofobowe, a najpopularniejszym

sposobem wizualizacji tych cech jest przedstawienie ich w postaci sfer określonego koloru o danej średnicy.

Tworzenie modeli farmakoforowych ze zbioru ligandów często określanymi jako związki testowe (ang. *training set compounds*) obejmuje dwa główne etapy: generowanie konformacji poszczególnych ligandów z testowego zbioru celem określenia dostępnej przestrzeni konformacyjnej a następnie w wyniku ich przestrzennego nałożenia identyfikowanie wspólnych cech celem stworzenia szablonu farmakoforowego. Obecnie dostępnych jest na rynku wiele programów do tworzenia modeli farmakoforowych, m.in.: Catalyst, (Accelrys Inc.), Phase (Schrodinger Inc.) DISCO, GASP, GALAHAD (Tripos Inc.) MOE (Chemical Computing Group) [6]. Różnią się one między sobą definicją cech oraz algorytmem mapowania funkcji farmakoforowych na przestrzeń konformacyjną związków, co bezpośrednio przekłada się na ich wydajność klasyfikacji.



Rysunek 3. Przykładowy model farmakoforowy z zaznaczonymi odległościami topologicznymi (A) oraz model z nałożonym ligandem (B) na podstawie [9]. Cechy farmakoforowe oznaczono odpowiednimi kolorami: akceptor wiązania wodorowego (kolor zielony), donor wiązania wodorowego (kolor fioletowy), grupa hydrofobowa (kolor niebieski)

2.1.2.3. Metody przeszukiwania przestrzeni chemicznej i eksploracja danych

Aby metody wirtualnego skryningu podczas przeszukiwania dużych wirtualnych bibliotek związków były odpowiednio wydajne należy oprócz narzędzi kodujących strukturę chemiczną i zapisujących ją w postaci ciągu binarnego zastosować efektywne metody potrafiące znaleźć podobieństwo pomiędzy nimi. *N*-bitowy fingerprint (czyli pojedyncza struktura chemiczna, np. związku aktywnego, czyli wzorca) stanowi od strony matematycznej punkt w przestrzeni *N*-wymiarowej. Zgodnie z regułami podobieństwa należy założyć, że punkty (inne związki) znajdujące się w najbliższym

sąsiedztwie związków aktywnych powinny również wykazywać podobną aktywność. Znajdowanie najmniej odległych punktów w przestrzeni N -wymiarowej stanowi podstawę metod opartych na tzw. metrykach podobieństwa (np. *similarity searching* lub *nearest neighbours*) [10]. Najczęściej wykorzystywane z nich są metody przeszukiwania podstrukturalnego, które analizują zdefiniowany wcześniej fragment molekularny i na jego podstawie wyszukują związki posiadające go w swojej strukturze. W przypadku opisanych wcześniej fingerprintów molekularnych najbardziej popularną metryką podobieństwa jest współczynnik Tanimoto (ang. *Tanimoto coefficient*). Inną grupą technik służących do eksploracji danych (ang. *data mining*) i optymalizacji protokołu wirtualnego skriningu są metody uczenia maszynowego. Biorąc pod uwagę sposób „uczenia” dzieli się je na nadzorowane i nienadzorowane, z których częściej stosowane są metody nadzorowane. Modele klasyfikacyjne tworzone są przez nie na podstawie przykładów pozytywnych i negatywnych, podczas gdy metody nienadzorowane same znajdują wzorzec, który wykorzystują w klasyfikacji. Inną a zarazem coraz bardziej popularną procedurą jest metoda tzw. maszyny wektorów nośnych (ang. *support-vector-machines*, SVM), która może służyć z jednej strony jako klasyfikator binarny przypisujący każdemu związkowi w przestrzeni określony identyfikator: klasy „1” dla aktywnych oraz „-1” dla nieaktywnych, a z drugiej tworzyć listy rankingowe szeregując związki od najbardziej do najmniej podobnych względem aktywnych [10].

Z uwagi na to, iż każda z opisanych metod nie jest idealna stosuje się często ich fuzję, która w przypadku poszukiwania cech wspólnych między strukturą odniesienia a związkami zdeponowanymi w bazie zwana jest fuzją podobieństwa (ang. *similarity fusion*).

2.1.3. Metody oparte na strukturze miejsca aktywnego

Idea metod SBVS opiera się na wykorzystaniu informacji o przestrzennej budowie miejsca wiążącego. Ich głównym celem jest poszukiwanie związków wykazujących wysokie powinowactwo do określonego receptora najczęściej białkowego (kieszeni wiążącej lub bruzdy na powierzchni białka) a ich rozwój powiązany jest z doskonaleniem technik umożliwiających określenie przestrzennej budowy makrocząsteczek z rozdzielczością atomową. Należą do nich zarówno metody eksperymentalne, jak rentgenografia strukturalna i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego, czy też komputerowe, jak modelowanie homologiczne. Wyniki

przedstawiające kompleksy ligandów z makrocząsteczkami lub struktury samych makrocząsteczek uzyskane z danych eksperymentalnych są zdeponowane w bazie danych białkowych (ang. *protein data bank*, PDB), która liczy obecnie już blisko 100 tysięcy struktur [11].

Wyróżnić można wiele przykładów zastosowania racjonalnego projektowania struktur wiodących a następnie leków w oparciu o znajomość przestrzennej struktury receptora, nie mniej najbardziej spektakularnym jest odkrycie klasy związków będących inhibitorami proteazy HIV-1 mających zastosowanie w leczeniu AIDS [12, 13, 14].

Istnieją zasadniczo dwie główne metody VS służące do poszukiwania struktur aktywnych na podstawie analizy oddziaływania w receptorze: dokowanie molekularne i fingerprinty oddziaływań ligand-receptor.

2.1.3.1. Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne (ang. *molecular docking*) jest metodą, która na drodze obliczeniowej przewiduje preferowaną orientację przestrzenną jednej cząsteczki (bioaktywną konformację) względem drugiej podczas tworzenia stabilnego kompleksu (Rysunek 4) [15].

Opiera się ono na fundamentalnej zasadzie tzw. rozpoznania molekularnego cząsteczek w celu wywołania określonej odpowiedzi biologicznej. W celu lepszego zrozumienia tego procesu opracowano szereg teorii wyjaśniających zdolność leku do oddziaływania z receptorem, z których najważniejsze wydają się być: teoria zamka i klucza Fischera, model indukowanego dopasowania Koshlanda i teoria zakłóceń makrocząsteczkowych. Należy przy tym zaznaczyć, że teorie te nie są ze sobą sprzeczne a wzajemnie się uzupełniają, i tak teoria zamka i klucza opiera się na założeniu komplementarności kształtu cząsteczki oddziałującej z miejscem wiążącym, teoria indukowanego dopasowania określa, w jaki sposób ta komplementarność jest osiągnięta a teoria zakłóceń makrocząsteczkowych opisuje złożoność konformacyjną receptora białkowego. Wszystkie te założenia są brane pod uwagę podczas opracowywania algorytmów wykorzystywanych w procesie dokowania molekularnego.

W procesie dokowania molekularnego możemy wyróżnić dwa zasadnicze etapy [16]:

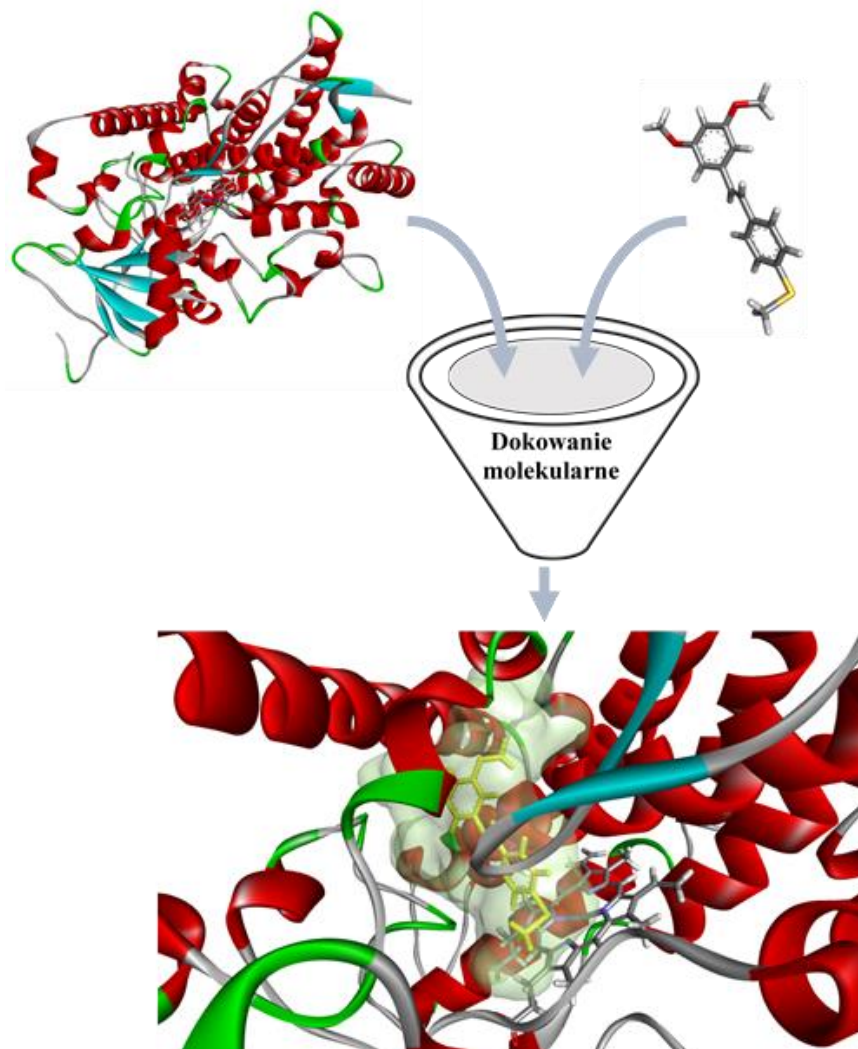
- eksploracja przestrzeni konformacyjnej liganda w miejscu wiążącym celu molekularnego,

- ocena (ranking) otrzymanego kompleksu ligand-receptor na podstawie jego energii swobodnej (ΔG), na którą wpływ mają trzy podstawowe typy oddziaływań (elektrostatyczne, hydrofobowe i wiązania wodorowe).

Proces ten odbywa się w sposób iteracyjny do momentu znalezienia minimum energii swobodnej powstałego kompleksu ligand-receptor [17].

Algorytmy przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej liganda w kieszeni wiążącej receptora możemy podzielić na trzy kategorie [2]:

- a) przeszukiwanie w trakcie dokowania,
- b) przeszukiwanie przed dokowaniem,
- c) dokowanie przyrostowe (ang. *incremental docking*).



Rysunek 4. Schematyczna ilustracja procesu dokowania molekularnego na przykładzie inhibitora – cząsteczki (E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3,5-dimetoksyfenylo)etenu w kieszeni wiążącej izoenzymu CYP1A2 (PDB ID: 2HI4) (enzym biorący udział w metabolizmie ksenobiotyków i aktywacji prokancerogenów) [18]

Pierwszy rodzaj algorytmów dokonuje optymalizacji konformacyjnej cząsteczki liganda bezpośrednio w kieszeni wiążącej receptora, lecz z uwagi na duże wymagania obliczeniowe może być zastosowany tylko dla niewielkich bibliotek związków. Najczęściej wykorzystywanymi algorytmami są tutaj metody Monte Carlo (Glide, AFFINITY) i algorytmy genetyczne (GOLD, AutoDock). Druga klasa algorytmów przeprowadza analizę konformacyjną liganda przed jego umieszczeniem w receptorze a następnie niskoenergetyczne konformacje są na sztywno dokowane do miejsca wiążącego (SLIDE, FRED). Trzecia kategoria algorytmów opartych na konstrukcji przyrostowej polega na podziale cząsteczki liganda w miejscach wiązań pojedynczych na fragmenty, które są następnie umieszczane w kieszeni wiążącej w różnych uprzywilejowanych orientacjach, rozpoczynając od fragmentu podstawowego (FlexX, DOCK) [2].

W kolejnym etapie oszacowywane jest powinowactwo wiązania uzyskanych kompleksów ligand-receptor i ich ranking za pomocą tzw. funkcji oceniających (ang. *scoring functions*). Funkcje oceniające klasyfikuje się jako [19]:

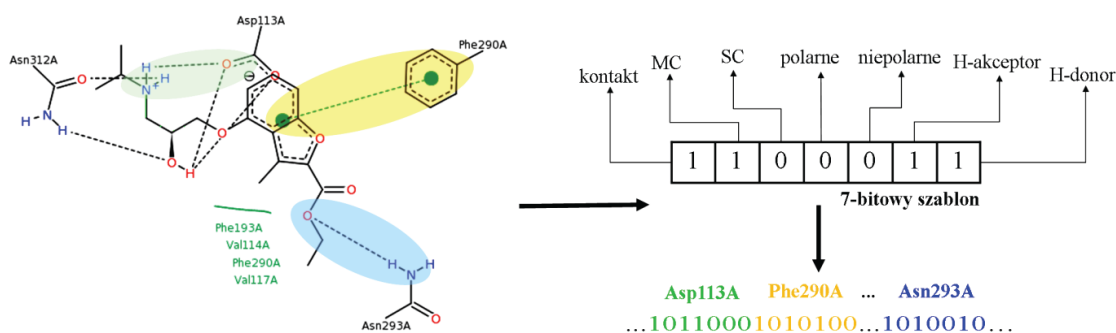
- a) oparte na polach siłowych (ang. *force field based*),
- b) empiryczne (ang. *empirical based*),
- c) bazujące na danych eksperymentalnych (ang. *knowledge based*),
- d) mieszane (ang. *consensus scoring*).

Te pierwsze (np. AutoDock, GOLD) oceniają energię wiązania powstałego kompleksu sumując wszystkie składowe oddziaływań mające na nią wpływ, tj. elektrostatyczne, van der Waalsa, wiązania wodorowe. Empiryczne funkcje oceniające (np. LUDI, PLP, FlexX) rozkładają energię oddziaływania na kilka fragmentów (np. wiązań wodorowych, oddziaływań jonowych, hydrofobowych oraz entropii wiązania), które są następnie mnożone przez odpowiednie współczynniki i sumowane w celu otrzymania ostatecznej oceny. Natomiast współczynniki otrzymuje się w wyniku analizy regresyjnej dopasowania funkcji do testowego zbioru kompleksów ligand-receptor o eksperymentalnie wyznaczonej energii wiązania [5]. Funkcje oceniające bazujące na danych eksperymentalnych (PMF, DrugScore) wykorzystują analizy statystyczne częstotliwości występowania specyficznych oddziaływań atomowych w dużych strukturalnych bazach danych jak np. PDB i na ich podstawie zakładają, że im dane oddziaływanie występuje częściej, tym jest bardziej korzystne energetycznie, więc potencjalnie ma większy udział w oddziaływaniach lek-receptor[5].

Biorąc pod uwagę niedoskonałości pojedynczych funkcji oceniających wprowadzono podejście określane jako „CScore” (ang. *consensus scoring*), które łączy informacje uzyskane z różnych funkcji oceniających w celu poprawy współczynnika trafień.

2.1.3.2. Fingerpriny oddziaływań ligand – receptor.

Szczegółowe zrozumienie oddziaływań międzycząsteczkowych w otrzymanych na drodze dokowania lub analizy rentgenostrukturalnej kompleksach ligand-receptor ma istotne znaczenie podczas projektowania aktywnych związków. Tradycyjne podejście oparte na wizualnym przeglądaniu poszczególnych kompleksów i ich analizie jest nieefektywne szczególnie gdy przeszukujemy biblioteki składające się z bardzo dużej ilości związków tak jak ma to miejsce w wirtualnym skriningu. Opracowano zatem narzędzia pozwalające znacznie przyspieszyć i usprawnić ten proces. Przykładem mogą być tutaj tzw. fingerprinty oddziaływania (ang. *interaction fingerprint*, IF), które kodują informacje pochodzące z trójwymiarowej struktury kompleksu ligand-receptor do postaci jednowymiarowego ciągu bitowego. Po raz pierwszy taki sposób tworzenia IF zaproponował Deng i wsp. [20]. Dla pojedynczego aminokwasu zaangażowanego w tworzeniu kompleksu z ligandem użyli oni 7-bitowego szablonu kodującego różne typy oddziaływań międzycząsteczkowych. W metodzie tej określonej skrótem SIFt (ang. *structural interaction fingerprint*), poszczególne bity są włączane, jeśli dany typ oddziaływania jest obserwowany (Rysunek 5).



Rysunek 5. Procedura tworzenia fingerprintów oddziaływania (SIFt) na przykładzie kompleksu odwrotnego agonisty z receptorem β_2 adrenergicznym (PDB ID: 3NY9) [5]

Biorąc pod uwagę poszczególne bity w prezentowanym szablonie wartość logiczną 1 przypisuje się odpowiednio miejscom 1. jeśli występuje jakiegokolwiek oddziaływanie, 2. gdy oddziaływanie angażuje atomy łańcucha głównego białka (ang. *main-chain*, MC), 3. gdy atomy łańcuchów bocznych (ang. *side-chain*, SC), 4. jeśli oddziaływanie

ma charakter polarny, 5. niepolarny, 6. jeśli w aminokwasie zaangażowany jest akceptor lub 7. donor wiązania wodorowego. W ten sposób każda reszta aminokwasowa w białku reprezentowana jest przez 7-bitowy wektor. Cały IF opisujący analizowany kompleks ligand-receptor powstaje przez łączenie wektorów dla poszczególnych aminokwasów, zgodnie z ich porządkiem numerycznym.

2.1.4. Bioizosteryzm - strategia w racjonalnym projektowaniu leków przy optymalizacji struktury wiodącej

Bioizosteryzm stanowi niezwykle użyteczną i bardzo często wykorzystywaną strategię podczas modyfikacji struktury wiodącej. Służy ona m.in.:

- zwiększeniu aktywności oraz selektywności biologicznej,
- poprawie parametrów farmakokinetycznych,
- zmniejszeniu działań niepożądanych a w konsekwencji toksyczności,
- poprawie indeksu terapeutycznego,
- zwiększeniu stabilności.

Odbywa się to za pośrednictwem tzw. bioizosterów, czyli podstawników lub grup wykazujących podobieństwo własności fizycznych lub chemicznych i na ogół właściwości biologicznych. Koncepcja bioizosteryzmu sięga roku 1919, kiedy to Langmuir [21] badając zachowanie i reaktywność substancji posiadających atomy lub grupy atomów o tej samej liczbie i rozmieszczeniu elektronów zauważył podobieństwa w ich właściwościach fizykochemicznych i określił je jako izostery. Na przestrzeni lat pojęcie to ewoluowało i ostatecznie w roku 1970 Alfred Burger [22, 23] sklasyfikował i wprowadził podział bioizosterów na klasyczne (Tabela 1) i nieklasyczne (Tabela 2). Wśród klasycznych bioizosterów wyróżniamy:

- a) jednowartościowe grupy i atomy,
- b) dwuwartościowe grupy i atomy,
- c) trójwartościowe grupy i atomy,
- d) czterowartościowe atomy,
- e) równoważniki pierścienia.


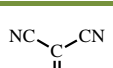



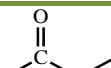


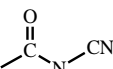
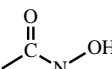

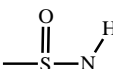

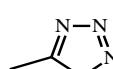
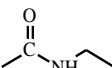
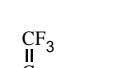
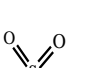

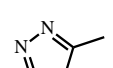
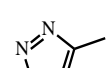
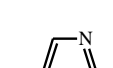


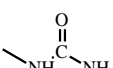
Tabela 1. Bioizostery klasyczne (atomy i grupy atomów)

Jednowartościowe	Dwuwartościowe	Trójwartościowe	Czterowartościowe	Równoważniki pierścienia
-OH, -NH ₂ ,	-CH ₂ -	=CH-	=C=	-CH=CH-, -S- (np. benzen, tiofen)
-D, -H	-O-	=N-	=Si=	-C=, -N= (np. benzen, pirydyna)
-F, -H	-S-	=P-	=N ⁺ =	-O-, -S-, -CH ₂ -, -NH- (np. tetrahydrofuran, tetrahydrotiofen, cyklopentan, pirolidyna)
-F, -OH, -NH ₂ , -CH ₃	-Se-	=As-	=P ⁺ =	
-Si ₃ , -SR	-Te-	=Sb-	=As ⁺ =	
-Cl, -Br, -SH, -OH			=Sb ⁺ =	

Z kolei bioizostery nieklasyczne dzielimy na:

- cykliczne i niecykliczne,
- grupy funkcyjne,
- retroizostery.

Tabela 2. Przykłady bioizosterów nieklasycznych

 (grupa karbonylowa)						
 (grupa karboksylowa)						
 (amidy)						
-X (halogen)	CF ₃	CN	N(CN) ₂	C(CN) ₃		
-OH (grupa hydroksylowa)			-CH ₂ OH		-NH-CN	-CH(CN) ₂

Jak łatwo zauważyć zmiana bioizosteryczna prowadzi do modyfikacji jednego lub kilku parametrów fizykochemicznych takich jak: wielkość, kształt, rozkład elektronów, rozpuszczalność w tłuszczach, rozpuszczalność w wodzie, pK_a , reaktywność oraz liczba akceptorów i donorów wiązania wodorowego. [24, 25, 26]. W zależności od tego jakie posiada właściwości dany fragment poddawany modyfikacji w cząsteczce związku i za co jest odpowiedzialny zmiana bioizosteryczna w jego obrębie może prowadzić do zmiany oddziaływania z receptorem, farmakokinetyki czy metabolizmu. Dzięki takim subtelnym zmianom możemy zatem wpływać na różne parametry modyfikowanej cząsteczki a w konsekwencji poprawić jej aktywność, selektywność, biodostępność czy stabilność chemiczną jak również zmniejszyć działania niepożądane oraz toksyczność. Istnieje wiele przykładów skutecznego zastosowania idei bioizosteryzmu na etapie modyfikacji struktury wiodącej i tak np. często wykorzystuje się zamianę atomu wodoru na atom fluoru w celu poprawy m.in. stabilności metabolicznej modyfikowanego związku [27, 28]. Innym przykładem może być modyfikacja struktury praktololu, leku z grupy β -adrenolityków, który z powodu działań niepożądanych został wycofany z lecznictwa, polegająca na wymianie grupy mocznikowej na amidową, która umożliwiła odkrycie atenololu, będącego obecnie jednym z leków stosowanych w terapii skojarzonej w leczeniu nadciśnienia tętniczego[25].

Podsumowując można stwierdzić, iż umiejętne zastosowanie narzędzi, jakie dają nam techniki CADD w połączeniu z wiedzą na temat budowy przestrzennej celu molekularnego jest obecnie niezwykle pomocne na drodze racjonalnego projektowania skutecznych a zarazem bezpiecznych leków.

W następnych rozdziałach opisane zostaną m.in. tubulina, jako cel molekularny dla cząsteczek o aktywności przeciwnowotworowej, właściwości fizykochemiczne, studia SAR (ang. *structure – activity relationship*) pochodnych RSV oraz CA-4 stanowiących podstawę do ich siarkowych analogów wraz z metodami syntezy.

2.2. Mikrotubule jako cel molekularny dla związków o aktywności przeciwnowotworowej

Jak wspomniano we wstępie mikrotubule a właściwie wchodząca w ich skład tubulina uważana jest za niezwykle interesujący i obiecujący zarazem cel molekularny w terapii chorób nowotworowych. Od roku 1990, kiedy to do lecznictwa wprowadzono paklitaksel o udowodnionym mechanizmie działania opartym na stabilizacji mikrotubul

zainteresowanie tubuliną, jako celem molekularnym w terapii przeciwnowotworowej znacząco wzrosło. Już ponad 25% nowych kandydatów na leki przeciwnowotworowe wchodzących w ostatnie fazy badań klinicznych w latach 2005-2007 miało właśnie taki mechanizm działania.

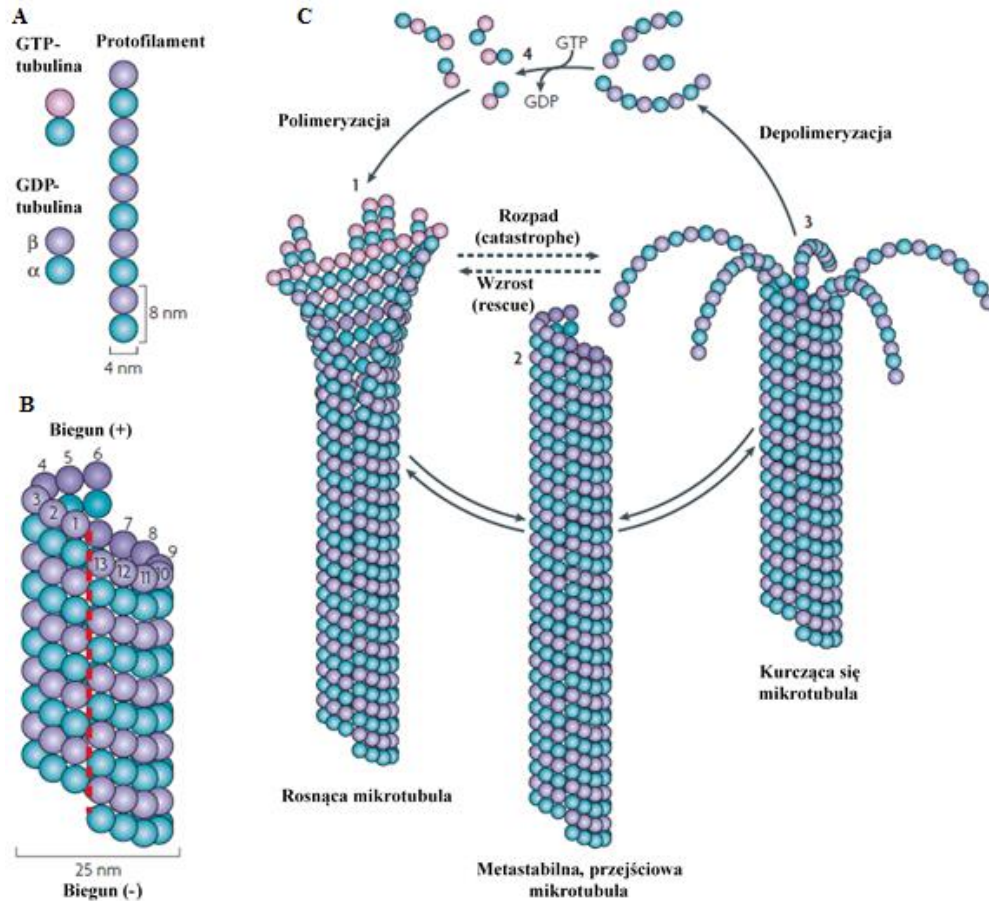
2.2.1. Struktura mikrotubul i ich dynamiczna niestabilność

Mikrotubule są jednym z elementów strukturalnych cytoszkieletu komórek eukariotycznych umożliwiającemu im transport wewnętrzny, odpowiednie ułożenie organelli, zmianę kształtu i co ważne aktywność ruchową. Mikrotubule wykazują swoją różnorodność funkcjonalną m.in. poprzez wiązanie się z licznymi białkami regulatorowymi włączając w to białka towarzyszące mikrotubulom (ang. *microtubule associated proteins*, MAPs). Zbudowane są z globularnego białka – tubuliny występującego w postaci dwóch podjednostek α i β -tubuliny o masie 50kDa każda [29]. Heterodimery α,β -tubuliny w wyniku polimeryzacji tworzą protofilamenty (Rysunek 6A). Sztynna ściana mikrotubul zbudowana jest z helikalnego układu naprzemiennie ułożonych podjednostek α i β -tubuliny tworząc układ 13 protofilamentów o średnicy zewnętrznej 25 nm (Rysunek 6B). Mikrotubule mają, jak wspomniano, znaczenie w aktywności ruchowej komórek a zwłaszcza w rozdzielaniu chromosomów siostrzanych podczas mitozy. Formują się one poprzez łączenie dimerów α,β -tubuliny wiązaniem niekowalencyjnym w specyficzny sposób „głowa do ogona” wpływając tym samym na jej charakterystyczną polarność. Dzięki takiemu ułożeniu białek można wyróżnić biegun (+) oraz biegun (-) mikrotubuli. Biegun (+) zawsze zwieńczony jest podjednostką β -tubuliny, natomiast przeciwległy biegun (-) przez cząsteczką α -tubuliny.

Procesy polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul zachodzą *in vivo* dzięki obecności „molekularnego motoru” – cząsteczki guanozyno-5'-trifosforanu (GTP), która katalizuje proces polimeryzacji. Związane jest to z wydzieleniem energii podczas hydrolizy jednego z wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych. Każda podjednostka tworząca heterodimer zawiera jedną cząsteczkę GTP, przy czym podjednostka α -tubuliny wiąże GTP w sposób nieodwracalny, podczas gdy cząsteczką GTP związana z podjednostką β -tubuliny hydrolizuje podczas polimeryzacji do GDP [31].

Podczas polimeryzacji mikrotubul można wyróżnić trzy odrębne fazy: nukleację, wzrost polimeru oraz stan stacjonarny. W fazie nukleacji tworzy się oligomer składający się z 6-12 podjednostek α i β -tubuliny. W fazie wzrostu cząsteczki GTP

wiążą się do podjednostek α i β -tubuliny, co prowadzi do wydłużania się mikrotubul i tworzenia protofilamentów. W fazie stacjonarnej szybkość polimeryzacji i depolimeryzacji są jednakowe, w związku z czym całkowita masa polimeru nie ulega zmianie.



Rysunek 6. Struktura mikrotubuli i jej dynamiczna niestabilność: A – struktura protofilamentu, B – struktura mikrotubuli, C – ilustracja procesu dynamicznej niestabilności mikrotubuli, 1 – rosnąca mikrotubula, 2 – metastabilna przejściowa mikrotubula, 3 – kurcząca się mikrotubula, 4 – hydroliza GTP wg [30]

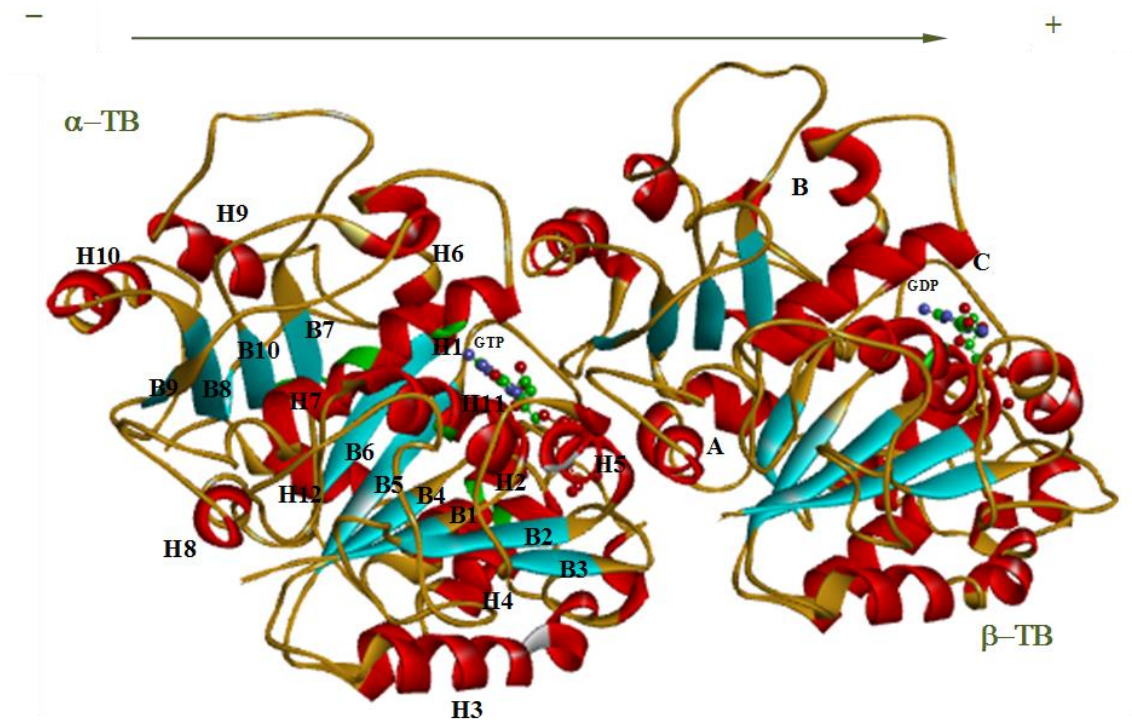
Dynamiczna natura oraz polarność mikrotubul są zasadniczymi cechami, które wpływają na ich funkcje. Dzięki intensywnym badaniom nad dynamiką mikrotubul wyróżniono dwie prawdopodobne drogi tych przemian: „*treadmilling*” oraz dynamiczną niestabilność (ang. *dynamic instability*). „*Treadmilling*” jest procesem przemieszczania się podjednostek tubuliny od bieguna (+) do (-) mikrotubuli, który ostatecznie nie wpływa na zmianę jej długości. Dynamiczna niestabilność z kolei jest procesem naprzemiennego wydłużania się i skracania końców mikrotubuli. Po raz pierwszy została opisana przez Mitchisona i Kirschnera (Rysunek 6C) [32].

Dynamiczna niestabilność mikrotubul jest wykorzystywana podczas podziału komórki, a dokładniej podczas tworzenia wrzeciona mitotycznego. Mikrotubule łączą każdy biegun wrzeciona mitotycznego z kinetochorami, miejscami wiążącymi je z chromosomami. Miejsca zapoczątkowania polimeryzacji przy obu biegunach nie wysyłają dokładnie wycelowanych mikrotubul w kierunku kinetochorów. Przyczynia się to do powstania setek przypadkowo zorientowanych mikrotubul w różnych kierunkach. Mikrotubule sięgające kinetochorów są ustabilizowane, natomiast pozostałe rozpadają się, gdyż mają wolny koniec dodatni. Stąd dynamiczna niestabilność jest przyczyną powstawania dużej różnorodności struktur, które zaangażowane w konstruktywne interakcje stają się ustabilizowane [29]. Z powyższych informacji można łatwo wywnioskować, iż wrzeciono kariokinetyczne zbudowane z mikrotubul jest jedną z bardziej labilnych struktur, szczególnie wrażliwych na działanie substancji zaburzających polimeryzację tubuliny.

2.2.2. Struktura tubuliny

Tubulina jest, jak wspomniano, białkiem globularnym zbudowanym z dwóch podjednostek α i β -tubuliny zawierających około 450 aminokwasów każdy. Obie podjednostki wiążą nukleotyd guaninowy, niewymienialny, gdy jest połączony z podjednostką α (miejsce wiązania z nukleotydem guaninowym α -tubuliny znane jest jako miejsce N) bądź też wymienialny podczas połączenia z podjednostką β (znane jako miejsce E) [33]. Tubuliny posiadają w 40% identyczną sekwencję aminokwasów, występują w kilku formach izostrukuralnych i ulegają różnym potranslacyjnym modyfikacjom.

Struktura krystalograficzna tubuliny w rozdzielczości 3,7 Å (PDB ID: 1JFF) została po raz pierwszy opisana przez Nogales i wsp. (Rysunek 7) [34]. Na jej podstawie stwierdzono, iż struktura obu podjednostek jest w zasadzie identyczna: oba monomery zawierają rdzeń utworzony przez strukturę β -harmonijek otoczonych przez α -helisy.



Rysunek 7. Struktura przestrzenna dimeru $\alpha\beta$ -tubuliny z zaznaczonymi strukturami β -harmonijek (kolor niebieski) oraz α -helisami (kolor czerwony) w podjednostce α -tubuliny. Pokazano również miejsce wiązania GTP i GDP oraz trzy główne domeny wiążące znajdujące się w podjednostce β -tubuliny: domenę kolchicynową (A), domenę taksolową (B), oraz domenę alkaloidów barwinka różowego (ang. *vinca alkaloid*) (C)

Struktura monomerów jest bardzo zwarta, lecz można ją podzielić na trzy zasadnicze domeny:

- domenę N-kończową zawierającą region wiązania z nukleotydem guaninowym utworzoną przez struktury β (B1-B6) i α -helisy (H1-H5),
- domenę pośrednią zawierającą miejsce wiązania paklitakselu, utworzoną przez struktury β (B7-B10) i α -helisy (H6-H10),
- domenę C-kończową, uczestniczącą w wiązaniu z MAPs, utworzoną przez α -helisy (H11-H12).

Rdzeń obu podjednostek składa się z dwóch par układu β -harmonijek: jednego z 6 (B1-B6) a drugiego z 4 (B7-B10) otoczonych przez 12 α -helisy (H1-H12). Domena N-kończowa zawiera reszty aminokwasowe od 1-205. Występuje tutaj miejsce wiązania się z nukleotydem guaninowym, które charakteryzuje się prostopadle ułożonymi strukturami β -harmonijek w stosunku do naprzemiennie leżących α -helis. Helisy H1 i H2 są po jednej stronie układu β -harmonijek, podczas gdy helisy H3, H4 i H5 po drugiej. Dokładnie rzecz biorąc struktury B1-H1, B2-H2, pętla między B3-H3 i bogata

w reszty glicyny pętla między B4-H4 kontaktuje się z grupami fosforanowymi GTP. Pętla między B4-H5 znajduje się blisko rybozy a aminokwasy: Asn-206 w helisie H6 oraz Tyr-224 i Asn-228 w helisie H7 oddziałują z zasadą guaninową.

Domena pośrednia złożona jest z reszt aminokwasowych od 206-381. Rozpoczynają ją helisy H6-H7, które następnie poprzez długą pętlę łączą się z helisą H8. Struktura β -harmonijki B7 oddziałuje ze strukturami β w domenie N-końcowej. Łączy się z helisą H9 poprzez pętlę, która jest bardziej uporządkowana w α -tubulinie i uczestniczy w silnych oddziaływaniach bocznych pomiędzy monomerami.

Domena C-końcowa z kolei utworzona jest z helis H11 i H12. Pętla łącząca obie helisy jest istotna dla oddziaływania z kolejnym monomerem w protofilamencie.

2.2.3. Czynniki oddziałujące na polimeryzację tubuliny i ich domeny wiążące

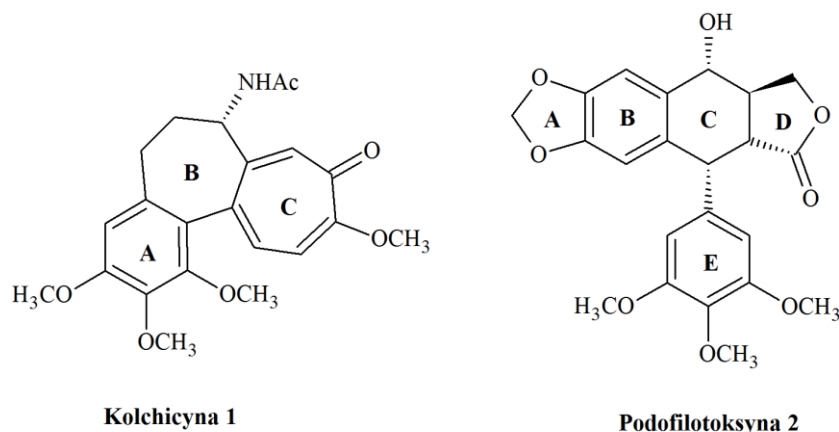
Czynniki oddziałujące z mikrotubulami (ang. *microtubule interfering agents*, MIA) są grupą związków (antymitotyków) o działaniu antykancerogennym wpływających bezpośrednio na proces polimeryzacji tubuliny. Efektem ich działania jest zahamowanie lub zwiększenie tego procesu, co ostatecznie prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego

w fazie G2/M i dalszej apoptozy komórek nowotworowych.

MIA wiążą się z tubuliną w ściśle określonych miejscach zwanych domenami. W przypadku α,β dimerów tubuliny zostały poznane i opisane trzy główne domeny wiążące:

- domena kolchicynowa,
- domena taksolowa,
- domena dla alkaloidów Vinca.

Związki, które wiążą się z domeną kolchicynową (kolchicyna, podofilotoksyna, kombretastatyny) (Rysunek 8) lub miejscem wiązania alkaloidów Vinca (winkrytyna) hamują polimeryzację tubuliny natomiast związki oddziałujące z domeną taksolową (paklitaksel, docetaksel) zwiększają polimeryzację tubuliny poprzez stabilizację jej podjednostek.



Rysunek 8. Struktury 2D ligandów oddziałujących z kolchicynową domeną wiążącą: kolchicyny **1** i podofilotoksyny **2**

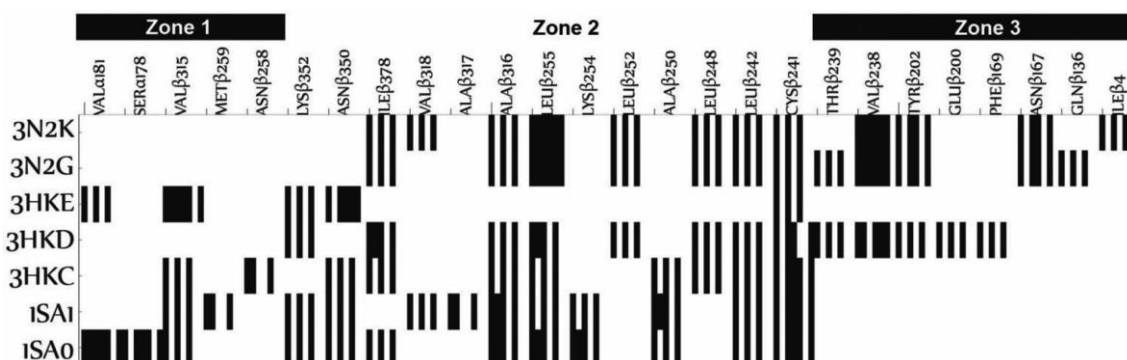
Poniżej przedstawiona zostanie jedynie kolchicynowa domena wiążąca z jej najbardziej znanymi ligandami kolchicyną i podofilotoksyną z uwagi na jej znaczenie w oddziaływaniu z pochodnymi kombretatstatyny A-4.

2.2.3.1. Kolchicynowa domena wiążąca

Domena kolchicynowa, której nazwa pochodzi od jej naturalnego liganda kolchicyny – alkaloidu znajdującego się w nasionach zimowitu jesiennego (*Colchicum autumnale*), została opisana i scharakteryzowana w roku 2004 przez Ravellego i wsp. [35]. Możliwe to było dzięki rozwiązaniu struktury krystalograficznej tubuliny w kompleksie z N-deacetylo-N-(2-merkptoacetylo)kolchicyną (DAMA-kolchicyną) i domeną statminową białka RB3 (PDB ID: 1SA0) jak również w kompleksie z podofilotoksyną **2** (PDB ID: 1SA1). Dało to początek wzmożonych prac nad strukturą kolchicynowego miejsca wiążącego.

Kolchicynowa kieszeń wiążąca znajduje się w głębokiej wnęce znajdującej się między dimerami $\alpha\beta$ -tubuliny w pobliżu α -helis H7 i H8 oraz β -harmonijek B8 i B9. Z uwagi na umiejscowienie domeny kolchicynowej związany ligand wymusza nieco zmianę konformacji aminokwasów w receptorze. Wykorzystując fingerprintny oddziaływań ligand-receptor (SIFt) (rozdz. 2.1.3.2, str. 25) zidentyfikowano 3 strefy w obrębie domeny kolchicynowej (Rysunek 9) [36]:

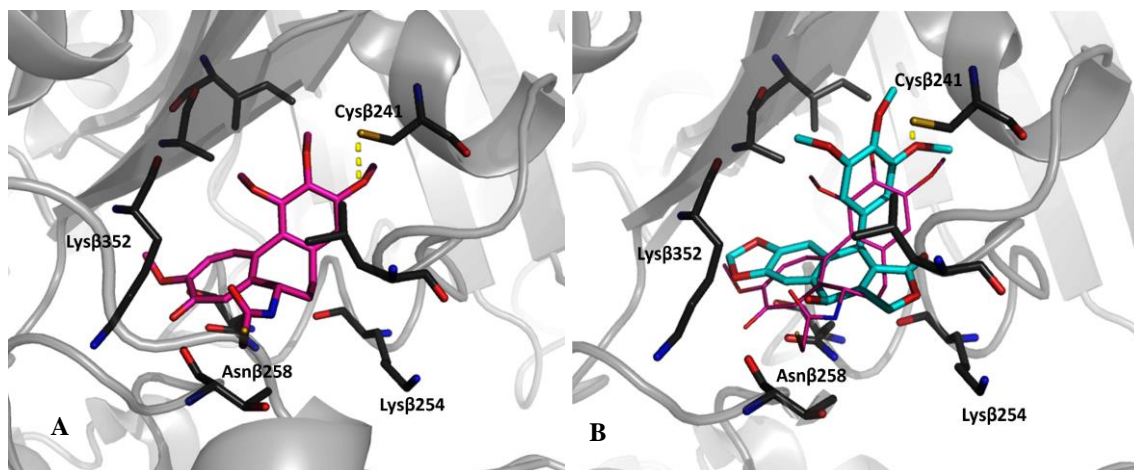
- strefę główną oznaczoną numerem 2, zlokalizowaną w podjednostce β -tubuliny, która zawiera aminokwasy uczestniczące w większości oddziaływań z ligandami,
- strefy pomocnicze 1 i 3, zlokalizowane odpowiednio w podjednostce α -tubuliny.



Rysunek 9. Analiza SIFT struktur krystalograficznych kompleksów ligandów z tubuliną: z lewej strony zaprezentowano oznaczenia z bazy PDB natomiast u góry poszczególne aminokwasy uczestniczące w wiązaniu [36]

Kolchicyna **1** wiąże się do heterodimerów tubuliny w dwóch etapach. Początkowo tworzy ona odwracalny kompleks z receptorem, co powoduje stopniową zmianę konformacyjną miejsca wiążącego, aby ostatecznie utworzyć pseudo-nieodwracalny kompleks [37]. Siedmioczłonowy pierścień C kolchicyny oddziałuje w strefie 1 poprzez oddziaływania van der Waalsa z następującymi aminokwasami: Val α 181, Ser α 178 oraz Val β 315, ponadto grupa karbonylowa uczestniczy w tworzeniu wiązania wodorowego z resztą Val α 181. Pierścień 3,4,5-trimetoksyfenylowy A zlokalizowany jest w hydrofobowej kieszeni (strefa 2), w której znajdują się: Lys β 352, Asn β 350, Leu β 378, Ala β 316, Leu β 255, Lys β 254, Ala β 250 oraz Leu β 242. Grupa metoksyłowa w pozycji 3 tworzy wiązanie wodorowe z grupą tiolową Cys β 241 (Rysunek 10A).

Podofilotoksyna **2** jest inhibitorem kompetencyjnym polimeryzacji tubuliny i współzawodniczy z kolchicyną o miejsce wiązania w domenie kolchicynowej. Jej sposób wiązania charakteryzuje się większą szybkością i odwracalnością tego procesu w porównaniu do kolchicyny [38]. Pomimo, że podofilotoksyna wiąże się w domenie kolchicynowej to przyjmuje nieco inną orientację (Rysunek 10B): Pierścień 3,4,5-trimetoksyfenylowy E podobnie jak pierścień A kolchicyny zlokalizowany jest w hydrofobowej kieszeni i wykazuje oddziaływania van der Waalsa z resztami aminokwasów: Lys β 352, Asn β 350, Val β 318, Ala β 317, Ala β 316, Leu β 255, Lys β 254, Ala β 250 i Leu β 242. Grupa metoksyłowa w pozycji 3 pierścienia E tworzy wiązanie wodorowe z grupą tiolową Cys β 241. Pierścienie A i B zlokalizowane są w rejonie hydrofobowym strefy 1 utworzonym przez reszty Val β 315 and Met β 259.

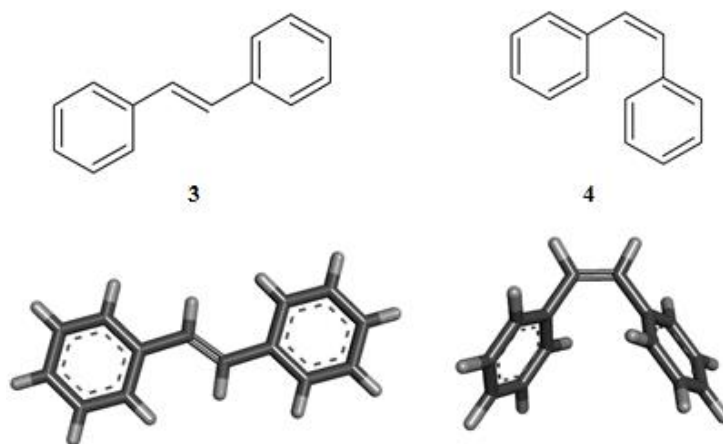


Rysunek 10. Struktura 3D kompleksów ligandów z domeną kolchicynową: A – PDB ID: 1SA0 z **1**, B – PDB ID: 1SA1 z **2**. Szkielet kolchicyny oznaczono kolorem fioletowym a szkielet podofilotoksyny kolorem niebieskim. Aminokwasy uczestniczące w oddziaływaniach zaznaczona na czarno. Na rysunku B dodatkowo pokazano nałożone cząsteczki ligandów: podofilotoksyny i kolchicyny. Żółtą linią przerywaną zaznaczono oddziaływanie wodorowe

2.3. Naturalne pochodne stilbenu - struktury wiodące w projektowaniu leków przeciwnowotworowych

2.3.1. Charakterystyka ogólna

Identyfikacja struktury wiodącej jest kluczowym etapem w procesie projektowania nowych leków w tym leków przeciwnowotworowych. Jednym z ich głównych źródeł jest środowisko naturalne gdzie bardzo liczną grupą związków są stilbeny będące pod względem chemicznym pochodnymi 1,2-difenyloetenu. Układ ten, z uwagi na obecność grupy etylenowej (winylovej) może występować w postaci dwóch izomerów geometrycznych: (E)-1,2-difenyloetenu ((E)-stilbenu) oraz (Z)-1,2-difenyloetenu ((Z)-stilbenu) (Rysunek 11).



Rysunek 11. Struktury 1,2-difenyloetenu (stilbenu) (2D i 3D): izomer (E) **3**, izomer (Z) **4**

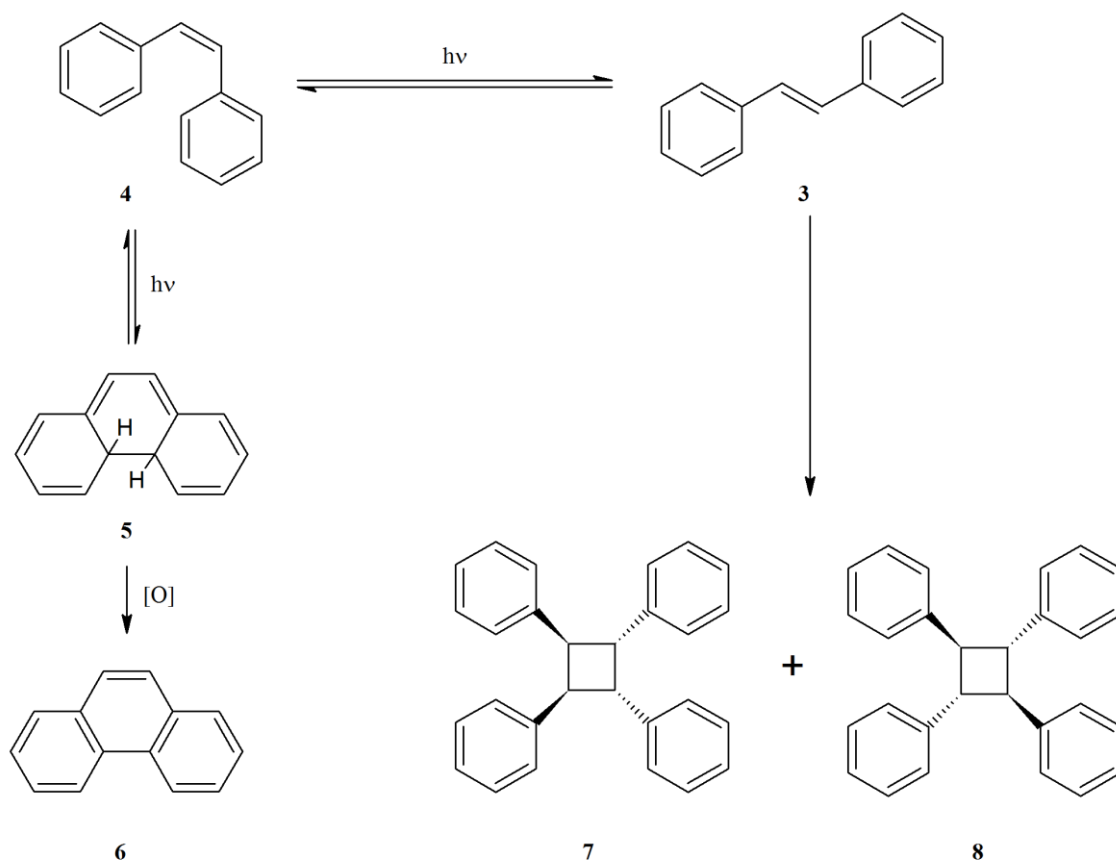
Pochodne stilbenowe podstawione w pierścieniach fenyłowych grupami hydroksylowymi są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Zaliczane są do frakcji polifenoli obok takich związków jak flawonoidy czy antocyjany. Spełniają one rolę fitoaleksyn, czyli substancji syntetyzowanych przez komórki roślinne w odpowiedzi na atak czynników patogennych (zarówno biopatogenów: grzybów i bakterii, jak i czynników fizycznych – promieniowania UV, wolnych rodników tlenowych) [39]. W przyrodzie występują oba izomery geometryczne stilbenu, przy czym zdecydowaną przewagę ilościową posiadają izomery (E).

Istnieje wiele publikacji prezentujących informacje na temat struktury przestrzennej obu izomerów wykorzystujących zarówno dane eksperymentalne, jak i pozyskane w oparciu o metody obliczeniowe [40, 41, 42, 43, 44].

Zgodnie z nimi (E)-stilben **3** ma praktycznie płaską strukturę, w której dwa pierścienie fenyłowe są odchylone od płaszczyzny wiązania podwójnego o około 6° natomiast w przypadku (Z)-stilbenu **4** pierścienie fenyłowe z uwagi oddziaływania steryczne są znacznie bardziej skrzyżowane o kąt około 43° . Struktury przestrzenne obu izomerów determinują zarówno ich właściwości fizykochemiczne, jak i funkcje biologiczne.

Temperatura topnienia tych dwóch form izomerycznych wynosi odpowiednio 125°C dla (E)-stilbenu oraz 6°C dla formy (Z). Stilben jest względnie niereaktywnym, bezbarwnym związkiem, praktycznie nierozpuszczalnym w wodzie. Stilbeny a zwłaszcza izomery (Z) są związkami niestabilnymi ulegającymi w roztworze fotochemicznym przemianom (Rysunek 12) a mianowicie: odwracalnej izomeryzacji (Z/E), cyklizacji (Z)-stilbenu **4** do dihydrofenantrenu **5** i jego następczej oksydacji do fenantrenu **6** oraz dimeryzacji (E)-stilbenu **3** do dwóch diastereoizomerów tetrafenylocyklobutanu **7** i **8** [45].

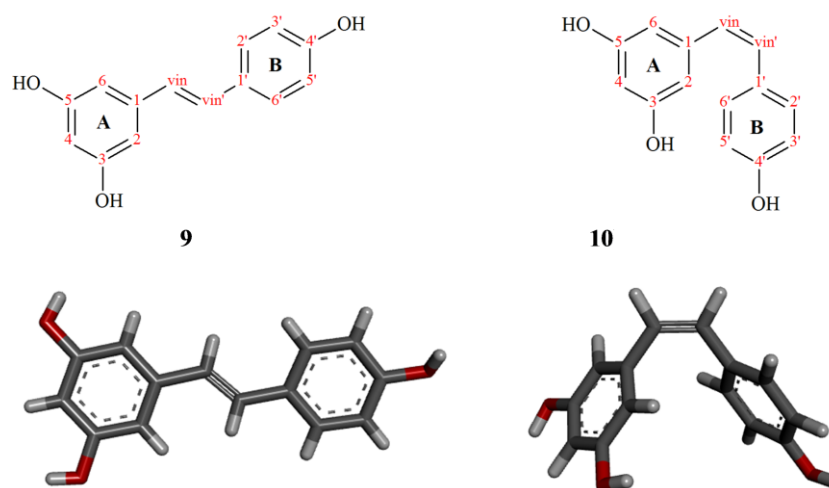
Spśród całej grupy stilbenoidów pochodzenia naturalnego dwa monostilbeny skupiają od wielu lat szczególną uwagę naukowców z całego świata a mianowicie resweratrol będący przedstawicielem pochodnych (E)-stilbenu oraz kombretastatyna A-4 jako pochodna (Z)-stilbenu. Stanowią one będą struktury wiodące, będące podstawą do syntezy ich siarkowych analogów w niniejszej rozprawie doktorskiej.



Rysunek 12. Fotochemiczne przemiany stilbenów wg [45]

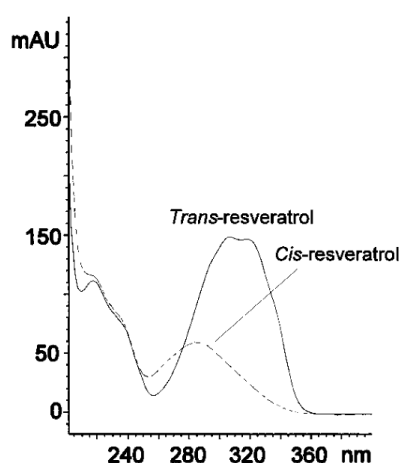
2.3.2. Resweratrol (RSV)

Resweratrol należy do grupy związków naturalnych i jest szeroko rozpowszechniony w świecie roślinnym. Jego nazwa chemiczna to 1-(4-hydroksyfenilo)-2-(3,5-dihydroksyfenilo)eten (3,4',5-trihydroksystilben) a zwyczajowa (E)-3,4',5-trihydroksystilben. Został on po raz pierwszy wyizolowany z kłącza ciemnicy wielokwiatowej (*Veratrum grandiflorum*) w roku 1940 przez Takaoke [46]. Resweratrol występuje w obu formach izomerycznych (Rysunek 13), choć izomer (E) zdecydowanie przeważa zarówno ilościowo, jak i funkcjonalnie nad formą (Z). Dlatego też, często pomija się w nazwie rodzaj izomeru mając na myśli izomer (E) i oznacza skrótem RSV. Pierścienie fenylowe obu izomerów oznaczono w celach porównawczych odpowiednio literą A pierścień podstawiony dwiema grupami – OH w pozycjach 3 i 5 a literą B pierścień monopodstawiony.



Rysunek 13. Struktury chemiczne (2D i 3D) (E)- **9** i Z-resweratrolu **10**

RSV **9** jest białą, krystaliczną substancją o temperaturze topnienia 253-255°C bardzo słabo rozpuszczalną w wodzie (rozpuszczalność w temp. 25°C wynosi 0,000387 g/100 g H₂O), natomiast bardzo dobrze rozpuszczalną w etanolu (rozpuszczalność w temp. 25°C wynosi 85,118 g/100 g etanolu), DMSO oraz DMF. Współczynnik log P wynosi 3,139±0,343. Stałe dysocjacji RSV odpowiadające deprotonacji poszczególnych protonów z grup hydroksylowych w postaci wartości pK_a otrzymane dla monoanionu, dianionu oraz trianionu wynoszą odpowiednio 9,3, 10,0 oraz 10,6 [47]. Maksimum absorpcji UV w etanolu dla izomeru (E) **9** obserwuje się przy długości fali 308nm, a dla izomeru (Z) **10** 288nm.



Rysunek 14. Widma UV izomerów (E)- **9** i (Z)-resweratrolu **10** wg [48]

Zgodnie z widmem ¹H NMR [Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.47] widać wyraźne różnice w przesunięciach poszczególnych sygnałów jakkolwiek podstawową informacją mówiącą o geometrii obu stereoisomerów jest stała sprzężenia protonów winyliowych wynosząca odpowiednio dla izomeru (Z) **10** J=12,4 Hz oraz dla izomeru

(E) **9** $J=16,6$ Hz. Struktury przestrzenne obu izomerów (Rysunek 13) uzyskane w oparciu o dane eksperymentalne (rentgenografia strukturalna) oraz obliczeniowe [49, 50] wskazują, że w przypadku izomeru (E) **9** pierścienie fenyłowe A i B są odchylone w stosunku do płaszczyzny grupy etylenowej o kąt równy, odpowiednio 3° (kąt dwuścienny Cvin'-Cvin-C1-C2) i 8° (kąt dwuścienny C6'-C1'-Cvin'-Cvin) natomiast w przypadku izomeru (Z) **10** 39° (kąt dwuścienny Cvin'-Cvin-C1-C2) i 27° (kąt dwuścienny C6'-C1'-Cvin'-Cvin).

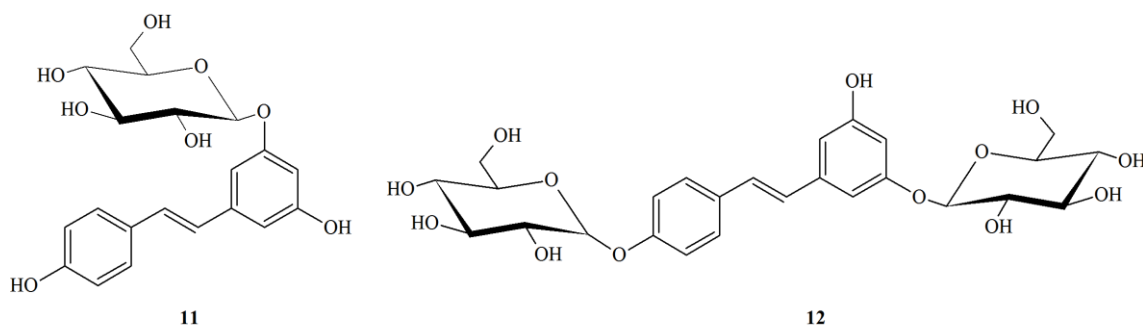
RSV jest spotykany w wielu roślinach, jakkolwiek najbogatszymi jego źródłami są:

- liście i skórka owoców winorośli właściwej (*Vitis Vinifera*), zwłaszcza, gdy roślina porażona była szarą pleśnią (*Botrytis cinerea*) lub poddana silnemu działaniu promieni UV [51],
- wino czerwone i w mniejszym stopniu białe [51],
- korzenie rdestu ostrokończastego (*Polygonum cuspidatum*), znane w medycynie chińskiej jako proszek Ko-jo-kon [52],
- liście, owoce, korzenie orzecha ziemnego (*Arachis hypogea*) [53].

Znajduje się również w wielu warzywach, jak np. czerwonej kapiście, brokułach, burakach, cebuli.

Najbardziej znanym źródłem resweratrolu jest niewątpliwie czerwone wino gdzie występuje on w stężeniach rzędu $0,09-58,7$ μM [51]. Dla porównania jego zawartość w orzeszkach ziemnych wynosi $0,09-7,84$ nmol/g .

Resweratrol występuje oprócz formy wolnej również w postaci glikozydowanej. Koronnym przykładem jest tutaj piceid **11** czyli 3-O- β -glukopiranozyd resweratrolu.

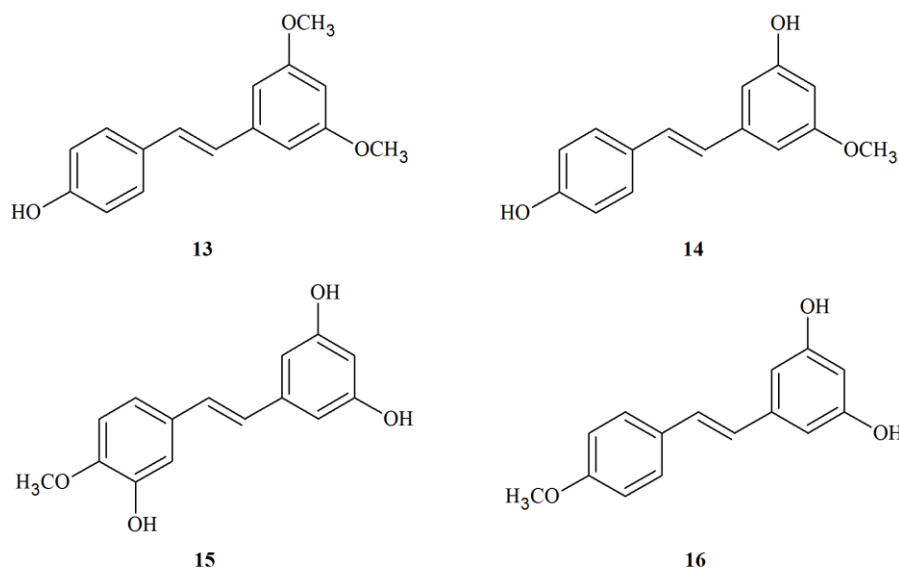


Rysunek 15. Pochodne glikozydowe RSV: piceid **11**, mulberrozyd E **12**

Inną pochodną glikozydową jest mulberrozyd E **12** (3,4'-O- β -diglukopiranozyd (E)-resweratrolu) występujący w morwie białej (*Morbus alba*) [54].

2.3.3. Przykłady naturalnych pochodnych resweratrolu

Poza resweratrolu **9** w przyrodzie istnieje szereg jego analogów, głównie w postaci eterów metylowych. Do najważniejszych a zarazem najczęściej cytowanych w literaturze możemy zaliczyć, m.in. pterostilben **13** ((E)-3,5-dimetoksy-4'-hydroksystilben) wyizolowany z indyjskiego drzewa sandalinu (*Pterocarpus marsupium*) [55], pinostilben **14**.



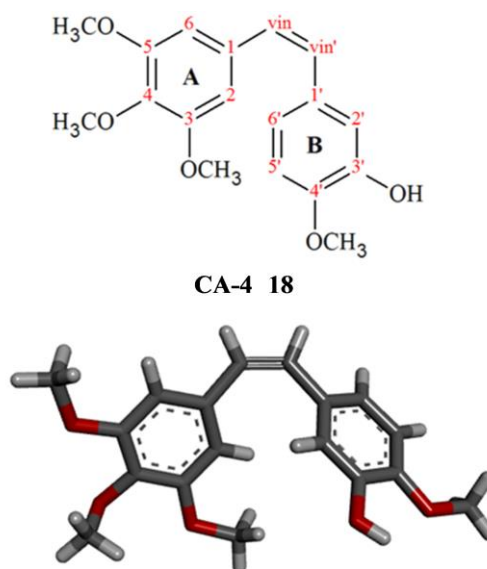
Rysunek 16. Etery metylowe RSV: pterostilben **13**, pinostilben **14**, rapontygenina **15**, deoksyrapontygenina **16**

((E)-3,4'-dihydroksy-5-metoksytilben), pochodzący z drewna sosny zwyczajnej (*Pinus silvestris*) będący pochodną pinosylwinu ((E)-3,5-dihydroksystilben). Innymi metylo pochodnymi są rapontygenina **15** ((E)-3,3',5-trihydroksy-4'-metoksytilben) oraz deoksyrapontygenina **16** ((E)-3,5-dihydroksy-4'-metoksytilben) będące analogami piceatannolu ((E)-3,3,4',5-tetrahydroksystilben), jednego z metabolitów resweratrolu, a występujące w kłączach rabarbaru (*Rheum rhaponticum*) [56].

2.3.4. Kombretastatyna A-4 (CA-4) i analogi

Kombretastatyna A-4 (CA-4) jest poza resweratrolu jedną z najlepiej poznanych naturalnych pochodnych stilbenu. Należy ona do licznej grupy związków (kombretastatyn) występujących w roślinach z rodzaju *Combretum* z rodziny *Combretaceae*. Wstępne badania nad związkami naturalnymi roślin z tej rodziny wyizolowanych z kory afrykańskiego drzewa *Combretum caffrum* Kuntze doprowadziły do odkrycia dwudziestu związków będących inhibitorami wzrostu komórek nowotworowych posiadających w swojej strukturze m.in. szkielet stilbenowy,

bibenzylowy, dihydrofenantrenowy lub fenantrenowy [57]. Pierwszym wyizolowanym związkiem z grupy kombretastatyn w roku 1982 przez George R. Pettit i wsp. była (-)-kombretastatyna **17** [58]. Kilka lat później ta sama grupa naukowców wyizolowała i określiła strukturę i konfigurację kombretastatyny A-4 **18** jako związku cytotoksycznego o wysokiej aktywności antymitotycznej i antyangiogennej, której mechanizm działania opiera się o hamowanie polimeryzacji tubuliny [59, 60]. Pod względem chemicznym CA-4 **18** należy do pochodnych (Z)-stilbenu a jej nazwa chemiczna to (Z)-1-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten (CA-4) a zwyczajowa to (Z)-3'-hydroksy-3,4,4',5-tetrametoksystilben (Rysunek 17).



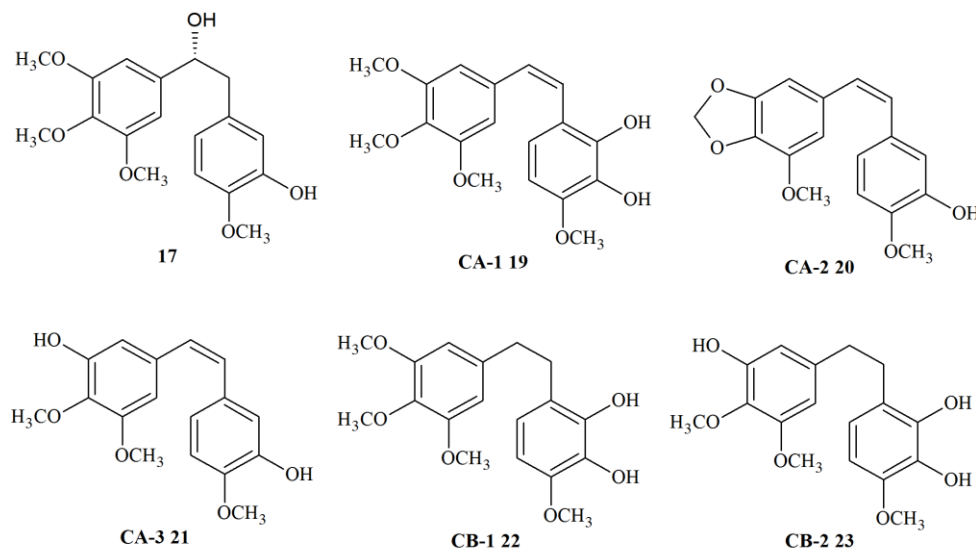
Rysunek 17. Struktura chemiczna (2D i 3D) kombretastatyny A-4 (CA-4) **18**

CA-4 jest krystalicznym bezbarwnym ciałem stałym o temperaturze topnienia 116°C [61] praktycznie nierozpuszczalnym w wodzie (2,83 µg/ml). Maksyma absorpcji widma UV etanolowego roztworu CA-4 wynoszą 207 i 296 nm [62]. Zgodnie z danymi krystalograficznymi w cząsteczce CA-4 pierścień fenylowy A jest odchylny od płaszczyzny grupy winylowej o kąt około 19° (kąt dwuścienny C2-C1-Cvin-Cvin') podczas gdy pierścień fenylowy B o kąt około 40° (kąt dwuścienny C2'-C1'-Cvin'-Cvin) [63]. Widmo protonowe magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H NMR, które posłużyło w głównej mierze do określenia struktury cząsteczki CA-4 zaprezentowano w tabeli 3 zgodnie z [64].

Tabela 3. Widmo ^1H NMR cząsteczki CA-4 **18** w CDCl_3 (częstość robocza 400 MHz) na podstawie [64]. Przesunięcia chemiczne δ zaprezentowano w ppm wobec wzorca terametylosilanu (TMS)

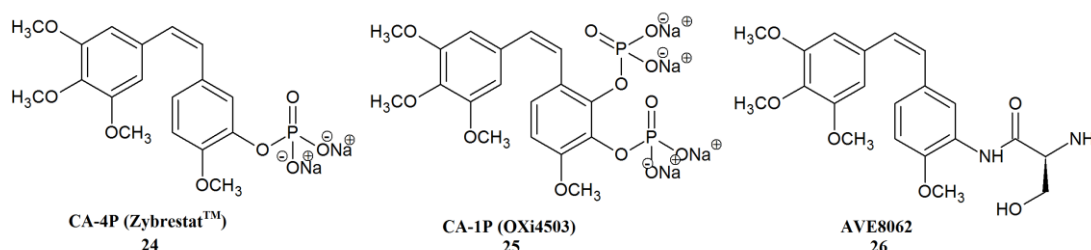
H	δ_{H} (multiplet, J [Hz])
H-2	6,527 (s)
H-6	6,527 (s)
H-vin	6,471 (s, 12,16)
H-vin'	6,412 (s, 12,16)
H-2'	6,925 (d, 2,04)
H-5'	6,734 (d, 8,4)
H-6'	6,799 (dd, 8,42, 2,04)
3'-OH	5,509 (s)
3-OCH ₃	3,700 (s)
4-OCH ₃	3,869 (s)
5-OCH ₃	3,700 (s)
4'-OCH ₃	3,844 (s)

Poza CA-4 wyizolowano również inne kombretastatyny będące strukturalnymi analogami (Z)-stilbenu **19-21** i diarylowych pochodnych etanu **22-23** [65, 66] (Rysunek 18) jako inhibitory polimeryzacji tubuliny z kombretastatyną A-1 (CA-1) **19** posiadającą równie wysoką jak CA-4 aktywnością przeciwnowotworową.



Rysunek 18. Przykładowe struktury chemiczne naturalnych kombretastatyn: (-)-kombretastatyna **17**, kombretastatyna A-1 (CA-1) **19**, kombretastatyna A-2 (CA-2) **20**, kombretastatyna A-3 (CA-3) **21**, kombretastatyna B-1 (CB-1) **22**, kombretastatyna B-2 (CB-2) **23**

Z uwagi na niewielką rozpuszczalność w wodzie zarówno CA-4 **18** jak i CA-1 **19**, co przekłada się na ich niską biodostępność, opracowano formy proleków obu związków w postaci odpowiednich fosforanów disodowych, a mianowicie fosforan disodowy CA-4 (CA-4P, **24** nazwa handlowa Zybrestat™) oraz difosforan disodowy CA-1 (CA-1P, **25**, Oxi4503). Są one obecnie w zaawansowanych badaniach klinicznych odpowiednio III fazy dla CA-4P w leczeniu anaplastycznego raka tarczycy – odmiany bardzo agresywnej i odpornej na leczenie oraz I i II fazy dla CA-1P w leczeniu różnych typów nowotworów. Ponadto drugą generacją proleku CA-4 a właściwie pochodnej CA-4 w której grupa OH została zastąpiona bioizosteryczną grupą NH₂ znajdującą się na etapie badań klinicznych III fazy w leczeniu mięsaka tkanek miękkich jest serynamidowa pochodna (Z)-1-(3-amino-4-metoksyfenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-etenu (Ombrabulin, AVE8062, **26**).



Rysunek 19. Struktury chemiczne proleków CA-4 i CA-1 będące w fazie badań klinicznych

2.3.5. Aktywność farmakologiczna pochodnych stilbenu

Pochodne stilbenowe od wielu lat znajdują się w centrum zainteresowania wielu grup badawczych. Ich wielokierunkowe działanie, a co za tym idzie szereg pożądanych efektów terapeutycznych stanowią podstawę do ciągłego poszerzania informacji na ich temat. Pomyśleć, że wszystko zaczęło się od odkrycia bardzo ciekawego zjawiska wśród ludności południowej Francji w latach siedemdziesiątych XX wieku. Wtedy to zaobserwowano, że pomimo wysokiego spożycia produktów zawierających duże ilości nasyconych kwasów tłuszczowych, zdecydowanie rzadziej niż pozostałe populacje europejskie (aż o 40%) zapada ona na chorobę wieńcową serca oraz nowotwory. Zjawisko to nazwane później „francuskim paradoksem”, tłumaczono wysokim spożyciem czerwonego wina w tym regionie. Choć początkowo zasługi te przypisywano alkoholowi etylowemu to odkrycie resweratrolu w czerwonym winie skłoniło naukowców do głębszego przyjrzenia się jego unikalnym właściwościom, jak i innych pochodnych stilbenowych.

2.3.5.1. Resweratrol i jego pochodne

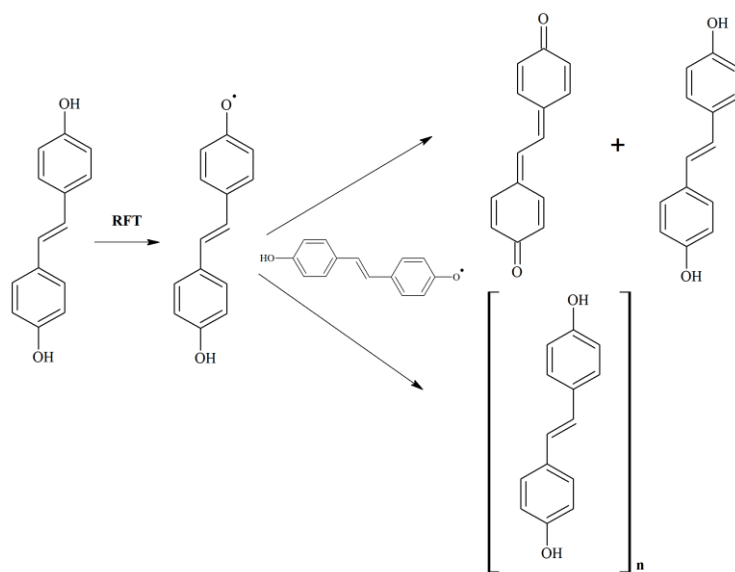
Istnieje szereg udowodnionych efektów farmakologicznych wywoływanych przez RSV i jego pochodne. Do najważniejszych z nich należą:

- działanie przeciwutleniające i przeciwolnorodnikowe [67],
- hamowanie aktywności enzymów cytochromowych [18, 68, 69],
- działanie przeciwzapalne (wpływa na kaskadę kwasu arachidonowego) [70],
- działanie estrogenowe [71],
- działanie przeciwnowotworowe [72, 73, 74, 75, 76].

Działanie antyoksydacyjne i przeciwolnorodnikowe

Wolne rodniki (reaktywne formy tlenu, RFT) stanowią szczególnie niebezpieczne źródło będące przyczyną uszkodzeń struktury m.in. lipidów błonowych, lipoprotein, kwasów nukleinowych, jak również białek i węglowodanów. Działanie to jest jedną z przyczyn inicjacji procesu nowotworowego. RSV, a jak udowodniono zwłaszcza pochodne stilbenu zawierające większą liczbę grup hydroksylowych wykazują działanie antyoksydacyjne i unieszkodliwiają reaktywne formy tlenu [67]. Same ulegają wówczas dimeryzacji lub dysproporcjonowaniu (Schemat 1). Dzięki temu stanowią one dodatkową ochronę komórki (podobnie jak wiele innych polifenoli), wspomagając jej naturalne mechanizmy antyoksydacyjne (katalazy, dysmutazy, peroksydazy).

Ponadto RSV okazał się również związkiem chelatującym jony miedzi Cu^{2+} , zmniejszając w ten sposób ich wpływa na metalozależną peroksydację lipidów błonowych i lipoprotein [77].



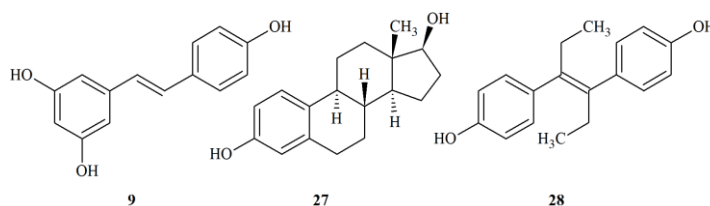
Schemat 1. Mechanizm działania przeciwolnorodnikowego pochodnych stilbenu wg [67]

Działanie na cytochromy P450 z rodziny 1 (CYP1)

Superrodzina cytochromów P450 (CYP) stanowi grupę enzymów mikrosomalnych i mitochondrialnych odpowiedzialnych za metabolizm większości substancji w organizmie, zarówno endogennych, jak i egzogennych (ksenobiotyków) [78]. Zlokalizowane są one głównie w tkankach aktywnych metabolicznie: wątrobie, jelitach, nerkach, płucach, sercu. CYP występuje w postaci kilku izoenzymów odznaczających się szeroką i nakładającą się na siebie specyfiką substratową. Niektóre z izoenzymów rodziny 1 CYP (CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1) stanowią potencjalną drogę inicjacji kancerogenezy wskutek biotransformacji prokancerogenów m.in. wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i heterocyklicznych amin do kancerogennych mediatorów. Ponadto CYP1B1 uczestniczy w metabolizmie 17β -etsradiolu do 4-hydroksyetstradiolu, który ulega następnie utlenieniu przy udziale peroksydaz do estradiolo-3,4-chinonu, który tworzy addukty z DNA przez co odpowiada za estrogenozależną kancerogenezę [79]. Ludzki CYP1B1 ulega nadekspresji w komórkach nowotworowych co może być przyczyną dalszej progresji procesu nowotworowego. Dlatego też sugeruje się, iż inhibitory ekspresji oraz aktywności katalitycznej cytochromów z rodziny 1 mogą mieć istotne znaczenie w chemoprewencji nowotworów zwłaszcza w początkowym stadium procesu nowotworowego. RSV charakteryzuje się umiarkowaną aktywnością w odniesieniu do izoform CYP1A1 i CYP1B1 i raczej słabą w stosunku do CYP1A2 [80]. Naturalne metoksy pochodne RSV z kolei są bardziej specyficznymi i silniejszymi inhibitorami izoform z tej rodziny [68, 81, 82]. Również silnymi i specyficznymi inhibitorami są w tym aspekcie metylotiopochodne RSV, które przewyższyły nawet aktywnością ich odpowiedniki metoksylowe [69].

Działanie estrogenne

RSV oraz inne hydroksypochodne (E)-stilbenu wykazują strukturalne podobieństwo z dietylostilbestrolem (DES), syntetycznym odpowiednikiem żeńskiego hormonu płciowego – estradiolu. Podobieństwo to warunkuje estrogenne działanie RSV.



Rysunek 20. Podobieństwo strukturalne RSV **9** do estradiolu **27** i DES **28**

Ponieważ DES jest z powodzeniem stosowany w leczeniu raka piersi u kobiet po menopauzie oraz w paliatywnej terapii raka prostaty, pochodne (E)-stilbenu mają również w tym aspekcie potencjalne możliwości zastosowania [71].

Działanie przeciwnowotworowe

Aktywność przeciwnowotworowa RSV i innych pochodnych stilbenu dotyczy zarówno działania chemoprewencyjnego związanego z ograniczeniem ryzyka powstawania zmian nowotworowych, jak i bezpośredniego działania na komórki już objęte takimi zmianami (chemioterapia).

Chemoprewencja.

Chemoprewencyjne właściwości RSV związane są z aktywnością przeciwnowotworową obejmującą trzy zasadnicze stadia kancerogenezy: inicjację, promocję i progresję [83, 84, 85].

Właściwości te wynikają z opisanych już przeze mnie efektów farmakologicznych wywoływanych przez RSV takich jak:

- działanie antyoksydacyjne, antymutagenne, hamowanie izoenzymów CYP odpowiada za aktywność antyinicjacyjną,
- działanie przeciwzapalne – hamowanie cyklooksygenazy i hydroperoksydazy odpowiada za aktywność antypromocyjną,
- działanie antyproliferacyjne poprzez indukcję apoptozy odpowiada za aktywność antyprogresyjną.

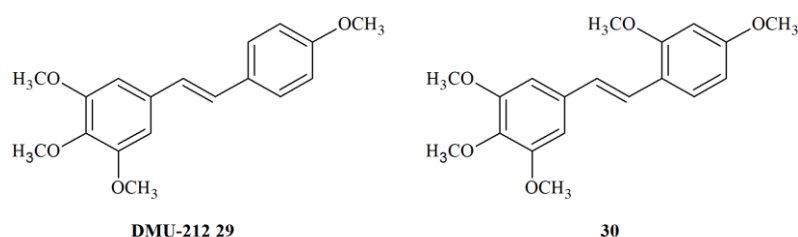
Chemioterapia.

Wielokierunkowe badania nad resweratrolem dowiodły, że ma on właściwości hamowania cyklu komórkowego i indukcji apoptozy [86]. Prowadzi to do zahamowania cyklu komórkowego w fazie S i G₂, a w konsekwencji do śmierci zmutowanych komórek [87]. Ciekawym zjawiskiem jest to, że działanie proapoptotyczne resweratrolu dotyczy tylko komórek nowotworowych i nie ma wpływu na cykl komórek normalnych. W zdrowych komórkach w odpowiedzi na atak onkogenów aktywowane jest bowiem białko p53, które powoduje wyhamowanie cyklu komórkowego i indukcję apoptozy, zapobiegając tym samym inicjacji procesu nowotworowego. W obrębie istniejącego już guza działanie tego onkosupresora zostaje zahamowane. RSV silnie

aktywuje działanie p53 zwiększając jego stężenie w komórkach wielu rodzajów nowotworów, dzięki czemu ulegają one apoptozie tak jak komórki zdrowe.

Wysokie tempo podziałów mitotycznych charakterystyczne dla komórek nowotworowych powoduje również szybką syntezę DNA. RSV okazał się inhibitorem reduktazy rybonukleotydowej, enzymu zapewniającego odpowiednią ilość deoksyrybonukleotydów w komórce w fazie S [88].

Chociaż mechanizm działania przeciwnowotworowego RSV nie jest powiązany z wpływem na proces polimeryzacji tubuliny to w wielu badaniach podkreśla się iż pochodne (E)-stilbenu oddziałują na polimeryzację tubuliny stymulując ten proces. Jednym z takich związków jest (E)-3,4,4',5-tetrametoksytilben **29** (MR-4, DMU-212, Rysunek 21), który jest obecnie jednym z najbardziej aktywnych przeciwnowotworowo pochodnych RSV. Wykazuje 4-krotnie większą aktywność hamowania wzrostu komórek raka jelita grubego HCA-7 w stosunku do RSV [72].



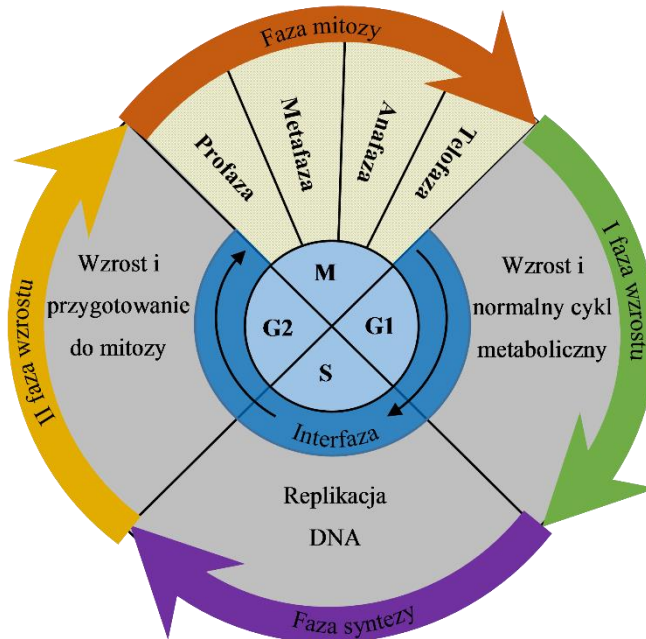
Rysunek 21. Struktury chemiczne pochodnych RSV jako związków oddziałujących z tubuliną: DMU-212 **29**, PMS **30**

Ponadto jest silnym inhibitorem gruczolaka w mysim modelu kancerogenezy Apc^{Min+} [73]. Wykazuje również wyższą cytotoksyczność w komórkach raka piersi linii estrogenozależnej MCF-7 oraz estrogenoniezależnej MDA-MB-435 niż RSV. Udowodniono, iż wykazuje efekt stabilizujący mikrotubule na poziomie IC_{50} wynoszącym $2,5 \mu M$ porównywalnym z efektem paklitakselu przy stężeniu $10 \mu M$ [74]. Inną metoksy pochodną RSV o udowodnionym działaniu proapoptotycznym opartym o wpływ na polimeryzację tubuliny w komórkach raka jelita grubego jest (E)-2,3',4,4',5'-pentametoksytilben (**30**) (PMS, rysunek 21) [89]. Hamuje on cykl komórkowy w fazie G2/M podobnie jak CA-4.

2.3.5.2. Kombretastatyna A-4 (CA-4)

CA-4 **18** należy, oprócz przedstawionych wcześniej kolchicyny **1** i podofilotoksyny **2** do grupy naturalnych czynników antymitotycznych i antyangiogennych, której cytotoksyczność jest m.in. wynikiem oddziaływania z tubuliną wchodzącą w skład

mikrotubul. CA-4 hamuje polimeryzację tubuliny przez co zaburza dynamikę powstawania mikrotubul, prowadząc do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G₂/M (Rysunek 22) i dalszej apoptozy. Jej wysoką aktywność antymitotyczną i cytotoksyczną potwierdziły liczne badania naukowe [57, 90, 91].



Rysunek 22. Cykl komórkowy

CA-4 jest jednym najlepiej poznanych inhibitorów polimeryzacji tubuliny *in vitro*. Wiąże się ona do domeny kolchicynowej (rozdz. 2.2.3.1, str. 34) w miejscu wiązania kolchicyny współzawodnicząc o miejsce wiązania w receptorze. Wartość IC₅₀ CA-4 w odniesieniu do hamowania polimeryzacji tubuliny została oznaczona w wielu laboratoriach naukowych i waha się w granicach 0,53 do 2,4 μM [57, 92, 93, 94].

CA-4 charakteryzuje się wysoką aktywnością cytotoksyczną w stosunku do wielu linii komórek nowotworowych, włączając w to komórki wykazujące oporność wielolekową (ang. *multi-drug resistance*, MDR) [95, 96, 97].

CA-4 poza hamowaniem polimeryzacji tubuliny posiada jeszcze jedną istotną właściwość. Należy ona do klasy związków określanych jako (ang. *vascular targeting agents*, VDA). Charakterystyczną cechą tych związków jest hamowanie wzrost tkanki nowotworowej poprzez specyficzne niszczenie naczyń krwionośnych niezbędnych szczególnie szybko dzielącym się komórkom. Udowodniono, że jest to jedna z niezwykle skutecznych metod walki z nowotworami [98]. Ponadto związki te „rozpoznają” różnice patofizjologiczne między zdrową a chorą tkanką ograniczając w ten sposób efekty toksyczne.

2.3.6. Zależność między budową a działaniem (badania SAR) pochodnych RSV

Już w 1868 roku Crum-Brown i Fraser badając wpływ czwartorzędowych pochodnych amoniowych oraz alkaloidów z czwartorzędowymi grupami amoniowymi na przewodnictwo nerwowo mięśniowe doszli do wniosku, że działanie biologiczne cząsteczki jest funkcją jej budowy chemicznej [99]. Zarówno ich obserwacje, jak i następnych naukowców stały się podstawą późniejszych badań zależności między budową a działaniem.

Badania SAR dla resweratrolu, tak jak zresztą dla większości związków biologicznie czynnych (w tym również kombretastatyn), polegały na syntetyzowaniu możliwie jak największej liczby analogów struktury wiodącej a następnie badania ich wpływu na aktywność (lub siłę działania) w celu poprawienia indeksu terapeutycznego. Posługiwano się m.in. wartościami ED_{50} oraz IC_{50} , gdzie:

- ED_{50} – oznacza dawkę skuteczną wywołującą maksymalne działanie terapeutyczne u 50% badanych osobników,
- IC_{50} – oznacza stężenie dające u 50% osobników efekt hamowania enzymu czy antagonizmu receptora.

Modyfikacje strukturalne (E)- **9** i (Z)-resweratrolu **10** polegały na wprowadzaniu bioizosterów do pierścieni fenylowych A i B oraz modyfikacji mostka etylenowego. Z uwagi na wielokierunkowe działanie RSV przeprowadzono liczne badania SAR w odniesieniu do efektu hamowania specyficznych izoenzymów cytochromu P450 (m.in. CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2, CYP2E1), COX-1 oraz COX-2, aktywności cytotoksycznej w stosunku do linii komórkowych różnych nowotworów oraz aktywności przeciwrodnikowej. W wyniku tych badań stwierdzono, iż:

- w odniesieniu do oddziaływania na różne rodzaje izoenzymów cytochromu P450 obserwuje się wyraźne zwiększenie efektu ich hamowania oraz selektywności poprzez zastąpienie grup hydroksylowych grupami metoksyłowymi i to niezależnie od ilości, jak i położenia [68]. Poprawa skuteczności widoczna jest również gdy zamiast grup hydroksylowych obecne były grupy metylotiolowe [18, 69]. Ponadto badania Yanga i wsp. [100] wykazały, że modyfikacja cząsteczki RSV, polegająca na wymianie grupy hydroksylowej w pozycji 4' na podstawnik metylotiolowy prowadzi do znaczącego obniżenia toksyczności wobec komórek nerki ludzkiego embrionu (HEK 293) oraz zwiększa zdolność do aktywacji ludzkiej Sirtuiny-1, białka z

rodziny deacetylaz i mono-rybozylotransferaz wpływających na procesy starzenia, transkrypcję i apoptozę,

- selektywność i siła hamowania wobec COX-2 zwiększa się wraz ze zwiększeniem ilości grup hydroksylowych. Najsilniejszymi inhibitorami okazały się 3,3',4,4',5,5'-heksahydrokso-*trans*-stilben oraz 3,3',4',5-tetrahydrokso-*trans*-stilben z selektywnością mierzoną jako IC₅₀(COX-1/COX-2) równą odpowiednio 719,23 i 417,08 [70]. Posiadały one również znacznie większą aktywność przeciworodnikową niż resweratrol [67]. Wprowadzenie grup metoksyloowych z kolei obniża aktywność wobec obu cyklooksygenaz [70],
- aktywność cytotoksyczna zwiększa się przy zastąpieniu grup hydroksylowych grupami metoksyłowymi przy czym wysoką aktywność przeciwnowotworową posiadają związki posiadające trzy grupy metoksylove w pierścieniu A w pozycjach 3,4,5 co wiąże się w głównej mierze z ich aktywnością antymitotyczną poprzez oddziaływanie z tubuliną. Jedną z najlepiej przebadanych pochodnych RSV w tej grupie jest DMU-212 **29** [72, 73, 74],
- aktywność cytotoksyczna metylo pochodnych *cis*-resweratrolu jest większa w stosunku do ich *trans*-analogów co wiąże się z ich wysoką aktywnością antymitotyczną, której mechanizm działania oparty jest na hamowaniu polimeryzacji tubuliny [75, 76],
- w odniesieniu do efektu hamowania receptora węglowodorów aromatycznych (AhR) stwierdzono, iż zastąpienie grup hydroksylowych grupami elektronobiorczymi (np. -Cl, Br, CF₃) wyraźnie zwiększa siłę hamowania tego receptora [101].

Biorąc pod uwagę powyższe informacje na temat badań SAR (*E*)- i (*Z*)-resweratrolu należy podkreślić, że jedną z podstawowych zalet wprowadzenia do cząsteczki grup metoksyloowych jest poprawa biodostępności tych związków poprzez spowolnienie ich metabolizmu na skutek reakcji sprzęgania wolnych grup fenolowych z kwasem siarkowym lub/i glukuronowym

2.3.7. Zależność między budową a działaniem (badania SAR) – aktywne analogi CA-4 i CA-1

Aktywność biologiczna CA-4 uzależniona jest od konfiguracji geometrycznej tego związku. Izomer (*Z*) jest bardziej pożądanym ponieważ wykazuje około 2000 razy

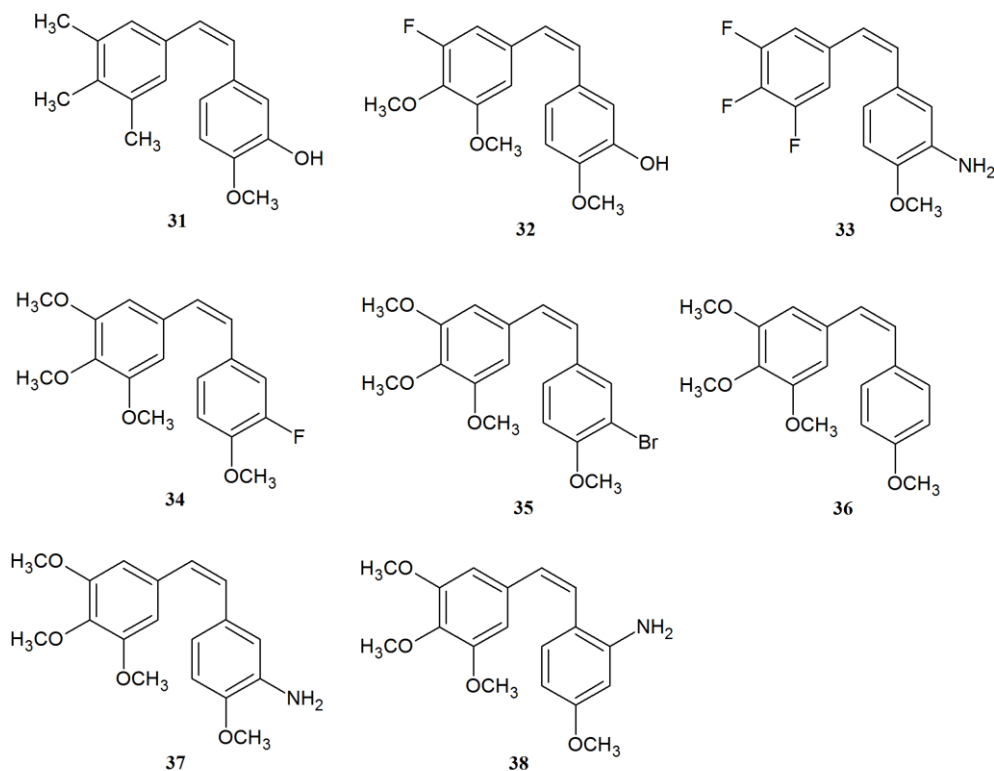
silniejszą aktywność od izomeru (E), a skłonność do przechodzenia jednej formy w drugą sprawia liczne problemy w syntezie chemicznej [102].

Poszukiwane są stale analogi CA-4 i związki o strukturze *cis*-stilbenu, które stanowią szkielet strukturalny, do syntezy pokrewnych związków o lepszych właściwościach biologicznych, i farmakokinetycznych. Na podstawie licznych modyfikacji strukturalnych cząsteczki CA-4 wyodrębniono podstawniki oraz ich położenie niezbędne dla zachowania jej aktywności biologicznej. Modyfikacje te dotyczą trzech podstawowych elementów struktury CA-4, tj. pierścieni aromatycznych A i B oraz mostka winylowego. Należy przy tym podkreślić, że obecne w pierścieniu A grupy metoksylowe w pozycji 3, 4 i 5, grupa metoksylova w pozycji 4 w pierścieniu B, oraz jak wspomniano wcześniej konfiguracja (Z) są niezbędne dla zachowania zdolności wiązania związku do kolchicynowego miejsca wiążącego w tubulinie.

Modyfikacja pierścienia A

Obecność ugrupowania trimetoksylowego w pierścieniu A ma zasadnicze znaczenie dla uzyskania odpowiedniego działania cytotoksycznego. Odnotowano znaczny spadek działania dla związków, w których usunięto grupy metoksylowe w pozycji meta lub para. Podobne działanie zaobserwowano gdy grupy metoksylowe zastąpiono grupą np. etoksylową, która może odgrywać istotną rolę w sterowaniu. Modyfikacja ugrupowania trimetoksylowego grupami o większym charakterze lipofilowym w celu wykorzystania oddziaływań hydrofobowych, które mogą wystąpić w miejscu wiązania tubuliny (trimetylofenyl, naftalen), pozwoliło otrzymać związek **31** o zmniejszonej cytotoksyczności podczas gdy zachowane zostaje selektywne hamowanie tubuliny [103, 104].

Pettit i współpracownicy zsyntetyzowali szereg związków, których grupa metoksylova w pozycji meta została zastąpiona atomem fluoru. W tym przypadku związek **32** wykazał aktywność porównywalną do CA-4 i tylko niewiele mniejszą siłę działania [105]. Próbowano również zastąpić atom fluoru atomem bromu lub chloru, jednak w efekcie otrzymano związki o ograniczonej cytotoksyczności i aktywności względem tubuliny [106, 107]. W odniesieniu do pochodnych CA-4 w których grupy metoksylowe zastąpiono atomami fluoru Hall i wsp. uzyskali związek (Z)-3'-amino-4'-metoksy-3,4,5-trifluorostilben **33** będący silnym inhibitorem polimeryzacji tubuliny o wartości IC_{50} na poziomie 2,9 μ M [108].



Rysunek 23. Wybrane analogi CA-4 modyfikowane w pierścieniu A i B

Modyfikacja pierścienia B

Od początku większą uwagę zwracano na możliwość modyfikacji pierścienia B cząsteczki CA-4. Zmiany w jego obrębie dotyczą: podstawienia pierścienia fenyłowego i tworzenia pierścieni heterocyklicznych [109]. Dużą uwagę skupiono na modyfikacji wokół grupy 3'-OH. Podjęto próbę zastąpienia jej atomem fluoru, jednak zaobserwowano znaczny wzrost cytotoksyczności, co może być spowodowane zwiększeniem stabilności metabolicznej tak uzyskanej pochodnej **34** [110]. W przypadku gdy wprowadzono w to miejsce atom bromu udało się zachować aktywność antytubulinową, a jednocześnie 10-krotnemu obniżeniu uległa aktywność cytotoksyczna związku **35** [111]. Podjęto także próby podstawienia atomu węgla w pierścieniu aromatycznym atomem azotu, co znacznie zmieniło właściwości farmakologiczne cząsteczki, przy czym wykazano istotny wpływ pozycji w której dokonano podstawienia. W pozycji orto otrzymano związki, w których obniżenie cytotoksyczności było większe niż aktywności antytubulinowej, natomiast w pozycji meta otrzymano związki o silnej cytotoksyczności i aktywności antytubulinowej [102]. Cushman i wsp. [112] otrzymali serie pochodnych (Z)-4'-metoksy-3,4,5-trimetoksytylbenenu, w której w miejsce grupy metoksy w pozycji 4' wprowadzali różne podstawniki jakkolwiek najbardziej aktywnym inhibitorem polimeryzacji

tubuliny okazał się związek wyjściowy (Z)-4'-metoksy-3,4,5-trimetoksytilben **36** z aktywnością porównywalna z CA-4 (IC₅₀ wyniosło 2,0 μM). Wymiana bioizosteryczna grupy OH na NH₂ lub podstawienie grupy aminowej w pozycji orto pozwoliła na otrzymanie bardzo silnych inhibitorów polimeryzacji tubuliny i wysoce cytotoksycznych związków **37** i **38** przeciwko liniom komórek nowotworowych drobnokomórkowego raka płuc NCI-H460 oraz raka prostaty DU-145 [113, 114].

Modyfikacja mostka etenowego

Analizując cząsteczkę CA-4 pod kątem mostka etenowego ważny jest fakt, iż nasylenie lub wydłużenie i zwiększenie nienasylenia prowadzi do utraty każdego opisanego rodzaju aktywności. Wykazano, iż mostek ten wykazuje głównie rolę konstytutywną, a nie jest tylko elementem łączącym, pozwalając na usytuowanie pierścienia benzenowego w odpowiedniej odległości przy zachowaniu odpowiedniego kąta dwuściennego, tak aby zwiększyć maksymalnie oddziaływanie cząsteczki z miejscem docelowym. Wiązanie podwójne o konfiguracji (Z) łatwo ulega izomeryzacji pod wpływem temperatury, światła oraz różnorodnych nośników protonów. W związku z tym nienasycony mostek poddawano modyfikacji, tak aby ustabilizować odpowiednią konformację i zwiększyć efekt działania biologicznego [106, 115].

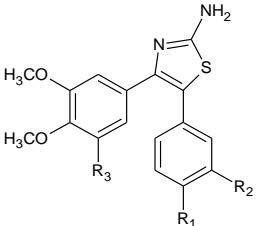
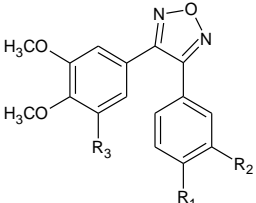
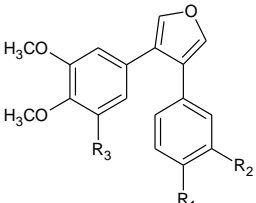
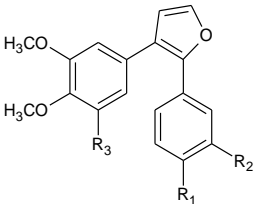
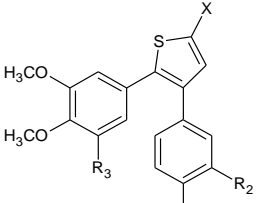
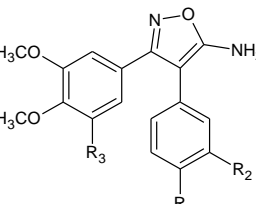
Podjęto także liczne próby tworzenia pięcioczłonowych pierścieni w oparciu o strukturę nienasyconego linkera. Obserwując zachowanie struktury CA-4 udowodniono podatność podwójnego wiązania na rozbudowę. Zalety takiego rozwiązania są liczne, przede wszystkim: zapobieganie izomeryzacji kombretastatyny (Z) do (E), zwiększenie specyficzności, ponieważ izomery (E) mogą być rozpoznawane przez inne komórki docelowe, co nie jest efektem pożądanym, a także zwiększenie wykorzystania potencjału terapeutycznego leków wykorzystujących układy heterocykliczne w strukturze [106, 116].

Wiązanie podwójne o konfiguracji (Z) może zostać zastąpione przez różne pięcioczłonowe układy heterocykliczne jak pirazol [95], imidazol [95, 96, 117], tiazol [118, 119], furazan (1,2,5-oksadiazol) [120], furan [121, 122], tiofen [123, 124], izoksazol [125, 126], oksazol [95, 127, 128, 1,2,3-tiadiazol [129], triazol [130, 131, 132, 133], 1,2,3,4-tetrazol [134] i dioksolan [135] z wytworzeniem konformacyjnie sztywnego analogu wykazującego skuteczne hamowanie polimeryzacji tubuliny i wzrost komórek nowotworowych w różnych liniach komórkowych, również w tych wykazujących oporność wielolekową. W tabeli 4 przedstawiono struktury

heterocyklicznych analogów CA-4 i CA-1 z najbardziej aktywnymi przykładami jakie zostały otrzymane w ciągu ostatnich kilku lat.

Tabela 4. Heterocykliczne analogi CA-4 i CA-1 z przykładami najsilniejszych inhibitorów polimeryzacji tubuliny.

Ogólna struktura chemiczna	Nazwa ogólna	Odnosiłnik literaturowy	Przykład Aktywność biologiczna (hamowanie polimeryzacji tubuliny) IC ₅₀ (μM)
	2,3-dipodstawiony pirazol	[95]	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =NH ₂ , R ₃ =OCH ₃ [*] nie zmierzono
	1,2-dipodstawiony imidazol	[95]	R ₁ =N(CH ₃) ₂ , R ₂ =H, R ₃ =OCH ₃ 35
	1,5-dipodstawiony imidazol	[95]	R ₁ = -N(CH ₃)CHCH- R ₃ =OCH ₃ 1.8 CA-4 (1.2)
	4,5-dipodstawiony imidazol	[95]	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =NH ₂ , R ₃ =OCH ₃ 0.68 CA-4 (1.2)
	4,5-dipodstawiony N-metyloimidazol	[95]	R ₁ = -N(CH ₃)CHCH- R ₃ =OCH ₃ 2.0 CA-4 (1.2)

Ogólna struktura chemiczna	Nazwa ogólna	Odnosnik literaturowy	Przykład Aktywność biologiczna (hamowanie polimeryzacji tubuliny) IC ₅₀ (μM)
	2-amino-4,5-dipodstawiony tiazol	[119]	R ₁ =OC ₂ H ₅ , R ₂ =H, R ₃ =OCH ₃ 0.44 CA-4 (1.2)
	furazan (1,2,5-oksadiazol)	[120]	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH, R ₃ =OCH ₃ [*] nie zmierzono
	3,4-dipodstawiony furan	[121]	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =NH ₂ , R ₃ =OCH ₃ [*] nie zmierzono
	2,3-dipodstawiony furan	[122]	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH, R ₃ =OCH ₃ [*] nie zmierzono
	2,3-dipodstawiony tiofen	[123, 124]	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =NH ₂ , R ₃ =OCH ₃ , X=H [*] nie zmierzono
	5-amino-3,4-dipodstawiony izoksazol	[125]	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =H, R ₃ =OCH ₃ 1.8 CA-4 (1.2)

Ogólna struktura chemiczna	Nazwa ogólna	Odnosińnik literaturowy	Przykład Aktywność biologiczna (hamowanie polimeryzacji tubuliny) IC ₅₀ (μM)
	4,5-dipodstawiony izoksazol	[126]	$R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{NH}_2, R_3 = \text{OCH}_3^*$ nie zmierzono
	4,5-dipodstawiony oksazol	[127, 128]	$R_1 = \text{SCH}_3, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OCH}_3^*$ $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{F}, R_3 = \text{Cl}^*$ nie zmierzono
	4,5-dipodstawiony 1,2,3-tiadiazol	[129]	$R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OCH}_3$ 0.7 CA-4 (0.81)
	1,5-dipodstawiony 1,2,4-triazol	[130]	$R_1 = \text{OC}_2\text{H}_5, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OCH}_3$ 0.76 CA-4 (1.2)
	1,5-dipodstawiony 1,2,3-triazol	[130, 131, 132]	$R_1 = \text{OCH}_3, R_2, R_4 = \text{NH}_2, R_3 = \text{OCH}_3$ (5.2) $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{NH}_2, R_3 = \text{OCH}_3$ (4.5) CA-1 (3.5)
	1,5-dipodstawiony 1,2,3,4-tetrazol	[134]	$R_1 = \text{OC}_2\text{H}_5, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OCH}_3$ 1.1 CA-4 (1.3)

Ogólna struktura chemiczna	Nazwa ogólna	Odnosnik literaturowy	Przykład Aktywność biologiczna (hamowanie polimeryzacji tubuliny) IC ₅₀ (μM)
	S,S-dioksolan	[135]	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =OH, R ₃ = OCH ₃ 4-6 CA-4 (3-4)

* najbardziej cytotoksyczny związek w badanej grupie

2.4. Podstawowe kierunki syntezy pochodnych stilbenu

Istniejące badania nad wykorzystaniem pochodnych RSV i CA-4 jako nowych skutecznych leków przeciwnowotworowych sprawiły, że znacznie wzrosło zapotrzebowanie na wydajne metody ich syntezy. Jednym z głównych problemów podczas otrzymywania pochodnych stilbenu jest podatność mostka winylowego łączącego pierścienie fenyłowe na różne typy reakcji: utlenienia, substytucji elektrofilowej, izomeryzacji. Dlatego też tworzy się go możliwie najpóźniej w toku syntezy, po uprzednim skonstruowaniu odpowiednio podstawionych pochodnych fenyłowych. Ponadto jego obecność warunkuje możliwość wystąpienia odpowiedniej konfiguracji (izomeria E/Z), co w praktyce zawęża wybór reakcji do możliwie najbardziej stereoselektywnych.

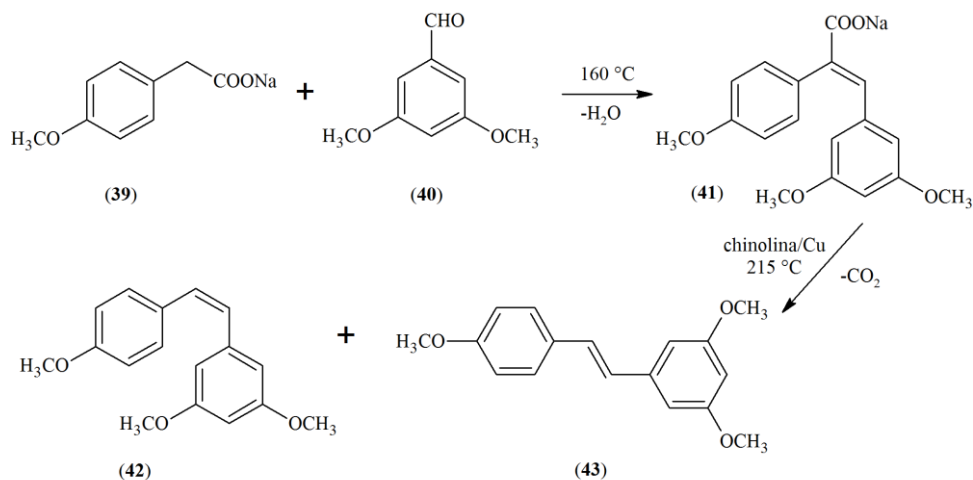
Istnieje wiele metod syntezy pochodnych stilbenu, lecz niewielka ich część jest wykorzystywana w pełnej syntezie tych związków. Przede wszystkim należą do nich: synteza Perkina, reakcja Wittiga i Hornera-Woodswortha-Emmons, reakcja Hecka, synteza McMurry'ego, reakcja Suzuki oraz krzyżowa metateza alkenów.

2.4.1. Synteza Perkina

Synteza Perkina należy do reakcji typu kondensacji aldolowej, w której aryłowy aldehyd po utracie protonu przy węglu karbonylowym kondensuje z acetylenem tworząc pochodną α,β -nienasyconego kwasu cynamonowego.

Jest to historycznie najstarsza metoda syntezy RSV opracowana przez Spätha i Krompa w roku 1941. Do reakcji użyli oni sól sodową kwasu 4-metoksyfenylooctowego **39** i 3,5-dimetoksybenzaldehyd **40**, a powstały produkt – sól

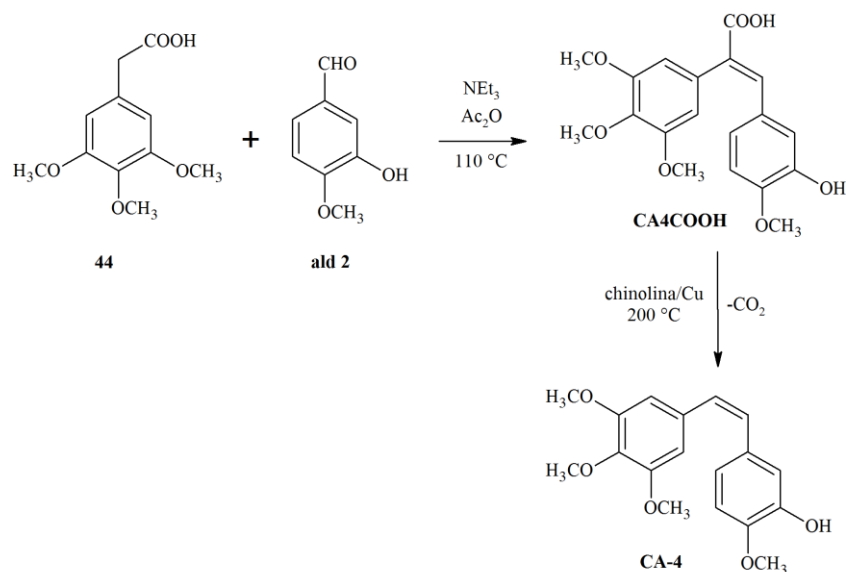
sodową kwasu (E)-2-(4-metoksyfenylo)-3-(3,5-dimetoksyfenylo)prop-2-enowy (sól kwasu stilbenokarboksyłowego) **41** poddali następnie dekarboksylacji otrzymując ostatecznie mieszaninę trieteru metylowego (Z) **42** i (E)-resweratrolu **43** (Schemat 2) [136]



Schemat 2. Synteza (Z)- i (E)-trimetoksyresweratrolu **42**, **43** metodą Perkina wg Späth'a

W reakcji Perkina, z uwagi na strukturę przestrzenną kwasu stilbenokarboksyłowego, izomery (Z) powstają w przewadze. Badania nad poprawą stereospecyficzności tej reakcji dowiodły, że w obecności niewielkiej ilości bezwodnej trietyloaminy powstają praktycznie wyłącznie izomery (Z) pochodnych stilbenu [137].

Metodę tę wykorzystuje się bardzo często do otrzymywania CA-4 i jej pochodnych. W reakcji syntezy CA-4 (Schemat 3) wykorzystuje się łatwo dostępne odczynniki jak kwas 3,4,5-trimetoksyfenylooctowy **44** oraz 3-hydrokso-4-metoksybenzaldehyd (izowanilinę) **ald 2** które w obecności trietyloaminy (Et₃N) oraz bezwodnika kwasu octowego (Ac₂O) ulegają kondensacji z wytworzeniem produktu pośredniego – kwasu (E)-3-(3-hydrokso-4-metoksyfenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)prop-2-enowego **CA4COOH**. Dekarboksylacja powstałego kwasu **CA4COOH** w środowisku chinoliny z dodatkiem sproszkowanej miedzi pozwala otrzymać **CA-4** z wydajnością powyżej 60%. [138].



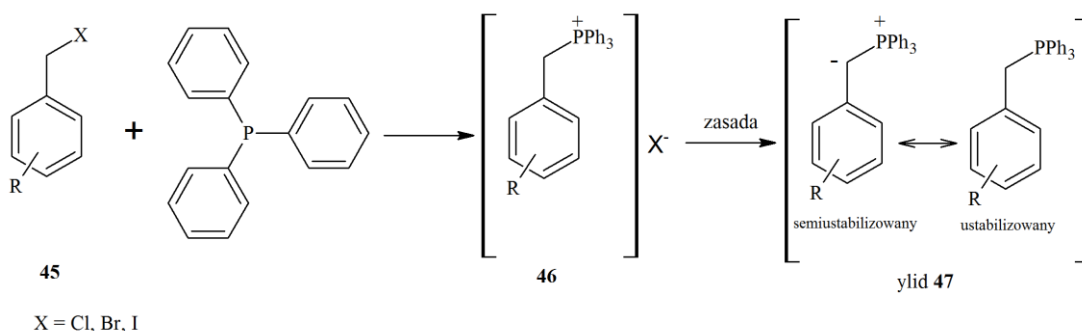
Schemat 3. Synteza CA-4 metodą Perkina wg [138]

2.4.2. Reakcja Wittiga i jej modyfikacje

Niewątpliwie najpowszechniej stosowaną metodą syntezy pochodnych stilbenu jest reakcja Wittiga. Świadczyć może o tym choćby ogromna liczba modyfikacji wprowadzanych dla jej optymalizacji. Opracowana została w latach 50-tych XX wieku przez Georga Wittiga, który w 1979 roku otrzymał za jej odkrycie nagrodę Nobla.

Reakcja ta pozwala otrzymywać alkeny z aldehydów (lub ketonów) i ylidów fosforowych. Ylidy fosforowe (**47**) otrzymuje w dwóch etapach (Schemat 4):

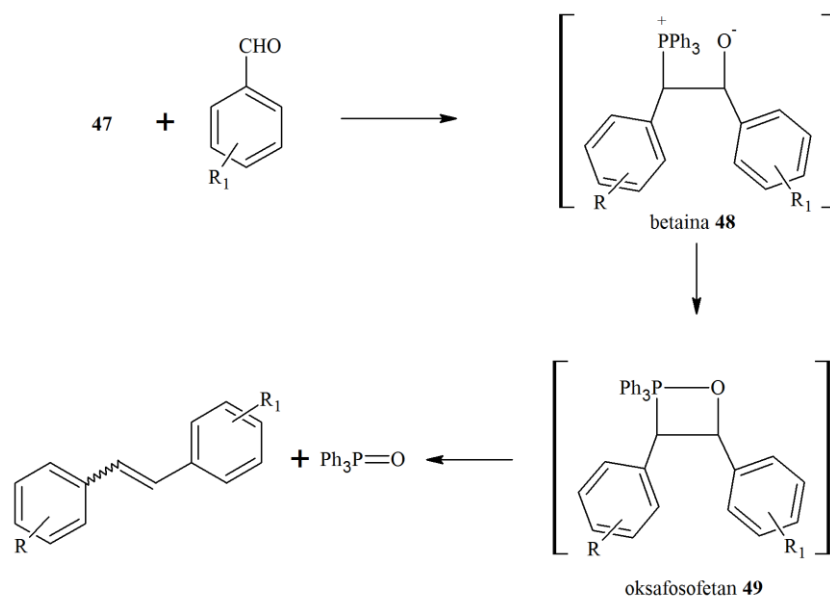
- atak nukleofilowy tryfenylofosfiny zgodnie z mechanizmem S_N2 na halogenek alkilowy lub benzyłowy (**45**) z utworzeniem soli fosfoniowej (**46**),
- oderwanie protonu w środowisku zasadowym.



Schemat 4. Synteza ylidów fosforowych: halogenek benzyłowy **45**, sól fosfoniowa **46**, ylid **47**

Jako zasad używa się związków metaloorganicznych (butolitu, fenylolitu), alkoholów, wodoru sodu.

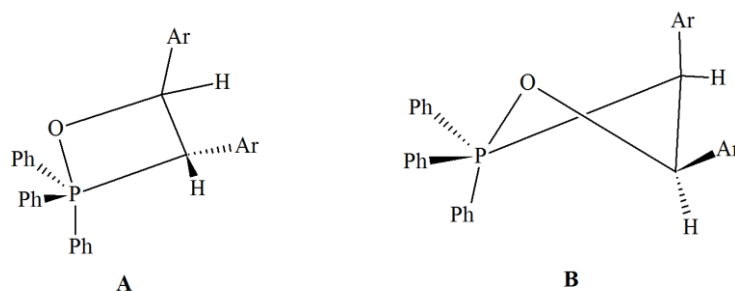
Cząsteczka ylidu obdarzona jest w jednej ze swych struktur mezomerycznych ładunkiem ujemnym przy atomie węgla (karboanion), dzięki czemu, w kluczowym etapie reakcji Wittiga, możliwy jest atak na ubogi w elektrony węgiel karbonylowy aldehydu. Stadium pośrednie tych przemian stanowi betaina **48**, która przekształca się do oksafosfetanu **49**, aby po samorzutnej eliminacji utworzyć alken (stilben) i tlenek trifenylfosfiny (Schemat 5).



Schemat 5. Otrzymywanie stilbenów za pomocą reakcji Wittiga

Zgodnie z ogólną reaktywnością ylidów fosforowych zostały one sklasyfikowane jako semiustabilizowane oraz ustabilizowane [139].

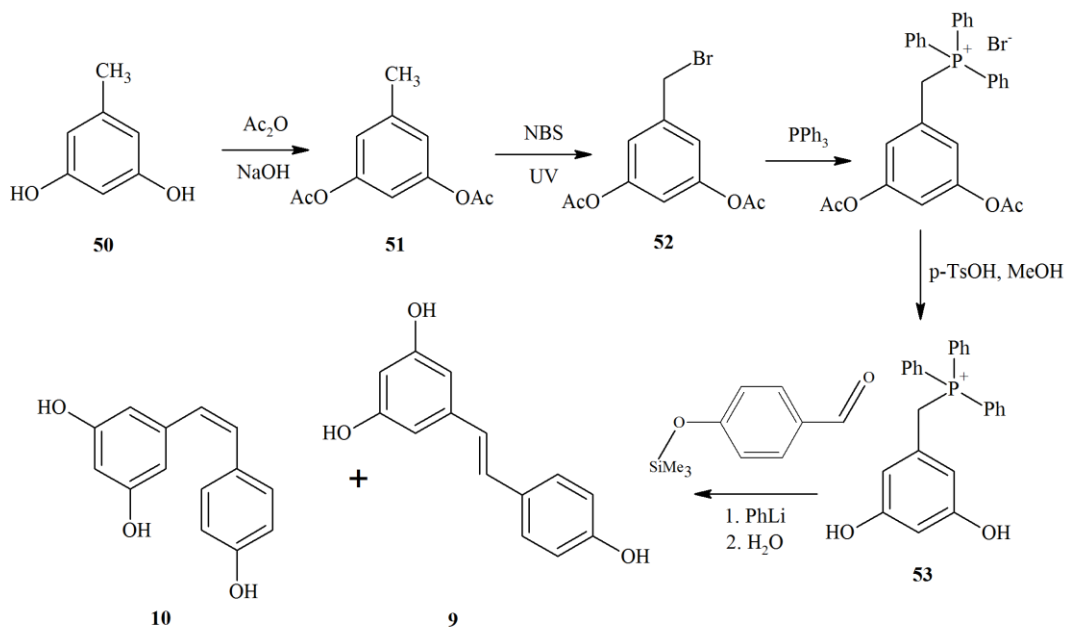
Wzajemny stosunek ilościowy powstających izomerów (E) i (Z) alkenów jest uzależniony od uwarunkowanej energetycznie konformacji przejściowego oksafosfetanu **49**. Jeśli oksafosfetan powstaje z ylidu ustabilizowanego posiada konformację planarną, a produktem eliminacji tlenku trifenylfosfiny jest (E)-stilben. W przypadku, gdy oksafosfetan przyjmuje konformację wygiętą (pochodzi od ylidu semiustabilizowanego), powstaje izomer (Z) (Rysunek 24) [140, 141].



Rysunek 24. Struktura oksafosfetanu **49**: planarna (A) i skręcona (B)

Reakcja Wittiga wykorzystana została do syntezy RSV po raz pierwszy w 1985 roku przez Hiszpanów Moreno-Mañas'a i Pleixats'a. Do reakcji użyli oni orcynolu (5-metylo-1,3-benzenodiolu) **50**, w którym grupy hydroksylowe zabezpieczone zostały poprzez acetylację bezwodnikiem octowym. Diacetyloorcynol **51** poddali następnie bromowaniu

N-bromosukcynimidem (NBS), otrzymując bromek **52**, który włączyli do reakcji z trifenylofosfiną. Następnie, stosując metanol i kwas p-toluenosulfonowy (p-TsOH), odblokowali grupy OH i poddali tak otrzymaną sól **53** reakcji Wittiga z 4-(trimetylosiloksy)-benzaldehydem (jako zasady użyli fenylolitu w trzykrotnym molowym nadmiarze). Wynikiem reakcji były izomery (E) **9** i (Z)-resweratrolu **10** uzyskane z wydajnością 10% (Schemat 6) [142].



Schemat 6. Metoda syntezy resweratrolu wg Moreno-Mañas'a i Pleixats'a [142]

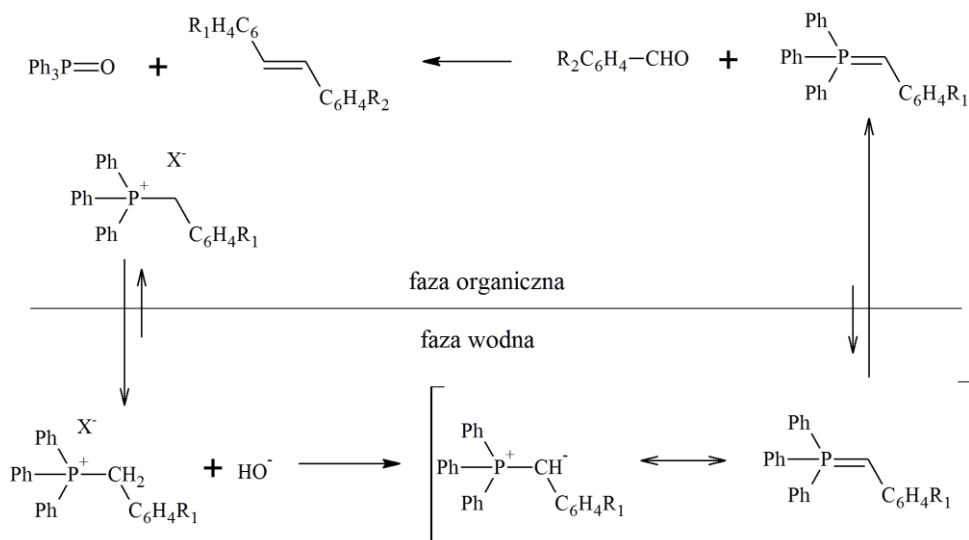
Metodę Moreno-Mañas'a i Pleixats'a zmodyfikowano, stosując do reakcji pochodne metoksyłowe zarówno aldehydu, jak i soli fosfoniowej, a jako zasady użyto równomolowej ilości tert-butanolanu potasu w THF. Produktem była mieszanina izomerów (E)- i (Z)-3,4',5-trimetoksystilbenu w stosunku 48:52, a całkowita wydajność reakcji wynosiła 99%. Mieszanina została poddana następnie izomeryzacji difenylosulfidem do czystego izomeru (E), aby odblokowując ostatecznie grupy metoksyłowe tribromkiem boru otrzymać RSV [143].

Możliwość otrzymywania w reakcji Wittiga zarówno izomerów (E), jak i (Z) stanowi negatywny aspekt tej metody, szczególnie, jeżeli wziąć pod uwagę problemy z ich dalszym rozdziałem. Poprzez liczne badania udowodniono, że stereoselektywność

jest tutaj mocno uzależniona od struktury wyjściowego ylidu, jak i od warunków reakcji. Choć klasyczne metody reakcji Wittiga prowadzone są w warunkach homogenicznych z wykorzystaniem organicznych rozpuszczalników (DMF, THF, CCl₄, metanol) to coraz większą popularność zyskują metody syntezy prowadzone w układach heterogenicznych ciecz-ciecz lub ciało stałe-ciecz.

W układzie ciało stałe-ciecz fazą stałą stanowi mieszanina zasady (KOH w dwukrotnym nadmiarze) i koronaeteru 18-crown-6, który pełni funkcję katalizatora przeniesienia międzyfazowego (ang. *phase transfer catalyst*), fazą ciekłą natomiast roztwór soli fosfoniowej i odpowiedniego benzaldehydu w rozpuszczalniku organicznym. Metoda ta pozwala na uzyskanie wysokich wydajności a stereoselektywność można kontrolować poprzez odpowiedni dobór parametrów (temperatury i podstawników) [144]. Izomery (Z) stilbenu powstają, gdy obecne są podstawniki elektronodonorowe, do reakcji użyto jodków alkilowych i polarnych rozpuszczalników (CHCl₃, CH₂Cl₂), a proces prowadzony był w temperaturze pokojowej. Izomery (E) z kolei powstają łatwiej, gdy substraty podstawione są grupami elektroakceptorowymi, stosowane były chlorki i bromki alkilowe, a reakcja prowadzona była w niepolarnych rozpuszczalnikach (benzen, CCl₄), w niższej temperaturze [144].

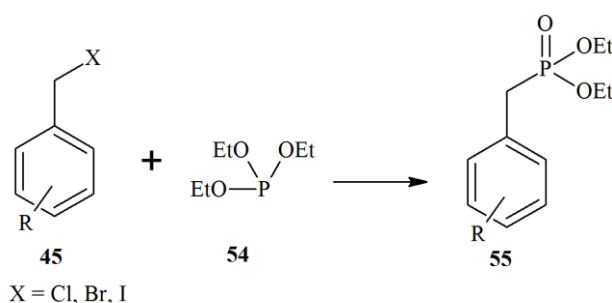
W układzie typu ciecz-ciecz fazą organiczną jest, podobnie jak powyżej, roztwór soli fosfoniowej i odpowiedniego benzaldehydu w rozpuszczalniku polarnym bądź niepolarnym, a fazą wodną roztwór 0,1M NaOH. Synteza ylidu odbywa się tutaj w fazie wodnej, z której przenika on do fazy organicznej reagując tam z aldehydem. Czwartorzędowa sól fosfoniowa pełni tutaj rolę zarówno substratu, jak i katalizatora przeniesienia międzyfazowego (Schemat 7) [145]. Zaobserwowano, że selektywność wobec izomerów E/Z uzależniona jest wyłącznie od reakcji między ylidem a benzaldehydem zachodząca w fazie organicznej. Szybkość mieszania oraz pozostałe parametry były bez znaczenia. Ograniczeniem jest więc tutaj brak możliwości regulowania stereospecyficzności reakcji. Jakkolwiek jest to metoda pozwalająca uzyskiwać dość wysokie wydajności, szybka oraz stosunkowo łatwa do przeprowadzenia.



Schemat 7. Reakcja Wittiga prowadzona w układzie dwufazowym ciecz-ciecz [145]

2.4.3. Reakcja Hornera-Woodswortha-Emmonsza (HWE)

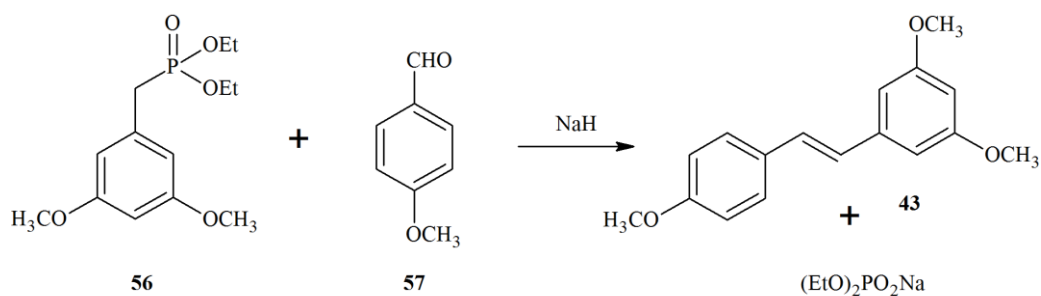
W reakcji HWE zamiast soli trifenylofosfoniowych (reakcja Wittiga) stosuje się ylidy – pochodne estrów kwasu fosforowego (III) otrzymywane z halogenków alkilowych lub benzylowych **45** i najczęściej trietylofosforynu **54** w reakcji Michaelisa-Arbuzowa (Schemat 8).



Schemat 8. Synteza ylidu fosforylowego (pochodnej benzylofosfonianu dietylu **55**) w reakcji Michaelisa-Arbuzowa

Powstałe pod wpływem zasady karboaniony fosforylowe są bardziej reaktywne w porównaniu z ylidami fosfoniowymi. Stabilizacja ładunku ujemnego grupy fosforylowej powoduje w odróżnieniu od ylidów wzrost reaktywności. Spowodowane jest to delokalizacją 6 elektronów π pomiędzy tylko 5 atomów. Produktami reakcji HWE są przede wszystkim (E)-stilbeny. Związane jest to z trudniejszą eliminacją grupy opuszczającej stan przejściowy (fosforanu) w porównaniu z analogicznym procesem w reakcji Wittiga (eliminacja tlenu trifenylofosfiny) [146].

Do syntezy podstawionych stilbenów reakcją HWE po raz pierwszy wykorzystano w roku 1993 stosując 3,5-dimetoksybenzylofosfonian dietylu **56** i 4-metoksybenzaldehyd **57** oraz wodorek sodu jako zasadę (Schemat 9) [147].

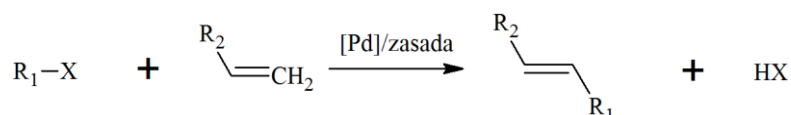


Schemat 9. Synteza (E)-trimetoksyresweratrolu **43** za pomocą metody HWE

2.4.4. Reakcja Hecka

Reakcja syntezy alkenów z wykorzystaniem halogenków arylowych na katalizatorze palladowym znana jako reakcja Hecka (Mizoroki-Hecka) jest jedną z dobrze ugruntowanych metod efektywnego sprzęgania typu C-C. Z uwagi na jej niezwykłą selektywność chemiczną oraz możliwość zastosowania dużej różnorodności substratów jest szeroko wykorzystywaną metodą w syntezie organicznej [148].

Ogólny mechanizm polega na reakcji między halogenkiem arylowym (elektrofilem) a alkenem pod wpływem katalizatora palladowego, ligandu fosfinowego i w obecności zasady (Schemat 10).

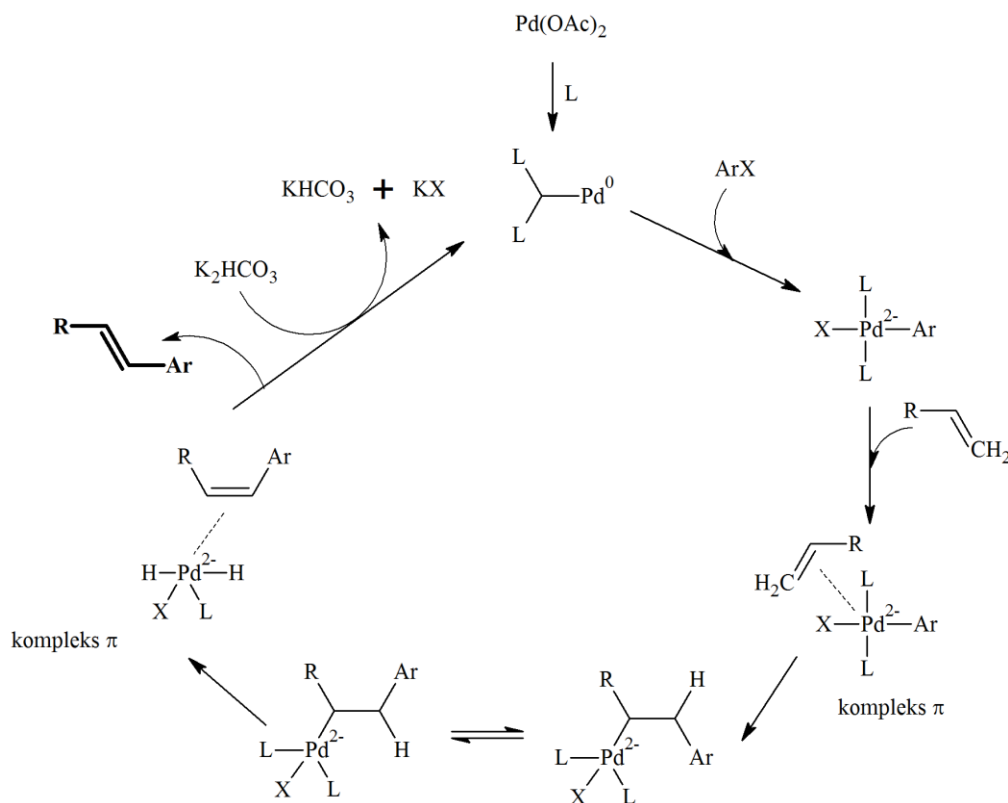


Schemat 10. Ogólny mechanizm reakcji Hecka [148]

Katalizatorem palladowym może być kompleks palladu (0) z trifenylofosfiną, chlorek palladu (II), octan palladu (II), jako zasady najczęściej używa się natomiast octanu sodu, trietyloaminy albo węgłanu sodu. Reakcję cechuje wysoka stereoselektywność w kierunku izomeru (E).

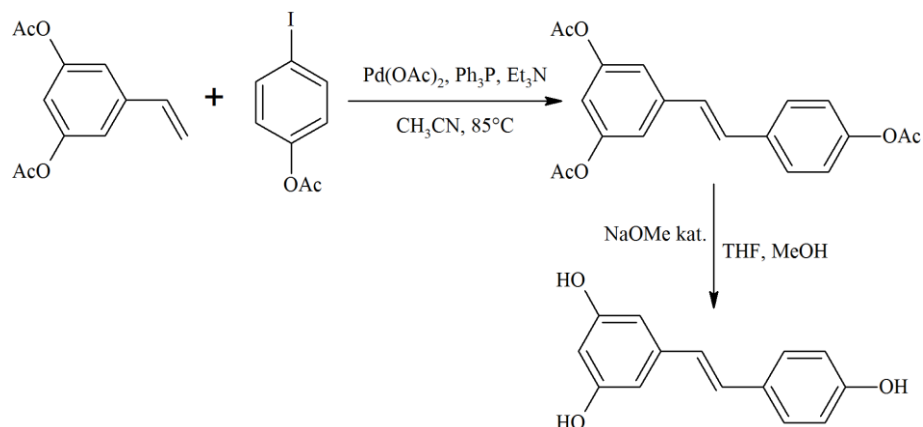
Mechanizm reakcji zakłada wieloetapowe przemiany w obrębie katalizatora palladowego. Kompleks palladu (0) powstaje zwykle *in situ* z prekursora, np. octanu palladu (II) przez redukcję za pomocą ligandu (np. trifenylofosfiny). Następnie katalizator palladowy włącza się pomiędzy pierścień benzenowy a atom chlorowca halogenku arylowego, aby w następnym etapie (poprzez pośrednie stadium kompleksu π) umożliwić jego połączenie w pozycji *syn* z drugim substratem. Z uwagi na bliskość

dużych sterycznie podstawników dochodzi do samorzutnej rotacji wobec wiązania C-C w położenie *anti*, dzięki czemu fragment palladowy (poprzez kompleks π) odłącza się, tworząc nowy alken. Katalizator regeneruje się poprzez redukcyjną eliminację z węglanem potasu (Schemat 11) [149].



Schemat 11. Mechanizm reakcji Hecka [149]

Do syntezy stilbenów tą metodą używa się odpowiednio podstawionych (i zablokowanych) pochodnych styrenu, w których terminalny atom węgla grupy winylowej wykazuje dużą gęstość elektronową, co ułatwia atak elektrofilowy halogenku aryłowego. Syntezę RSV metodą Hecka ilustruje poniższy schemat.

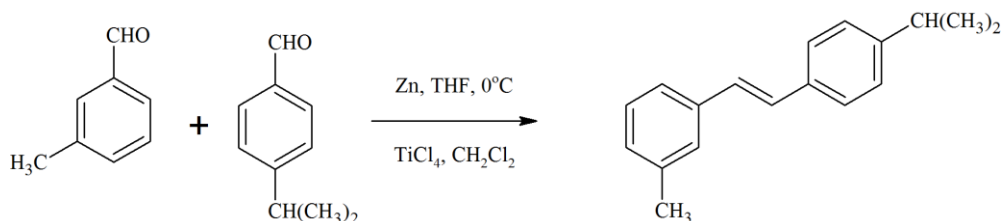


Schemat 12. Synteza RSV metodą Hecka [149]

2.4.5. Synteza McMurry'ego

Reakcja McMurry'ego jest reakcją redukcyjnego sprzęgania, w wyniku której dwa ketony lub aldehydy w obecności chlorku tytanu (III) oraz czynnika redukującego dają alken.

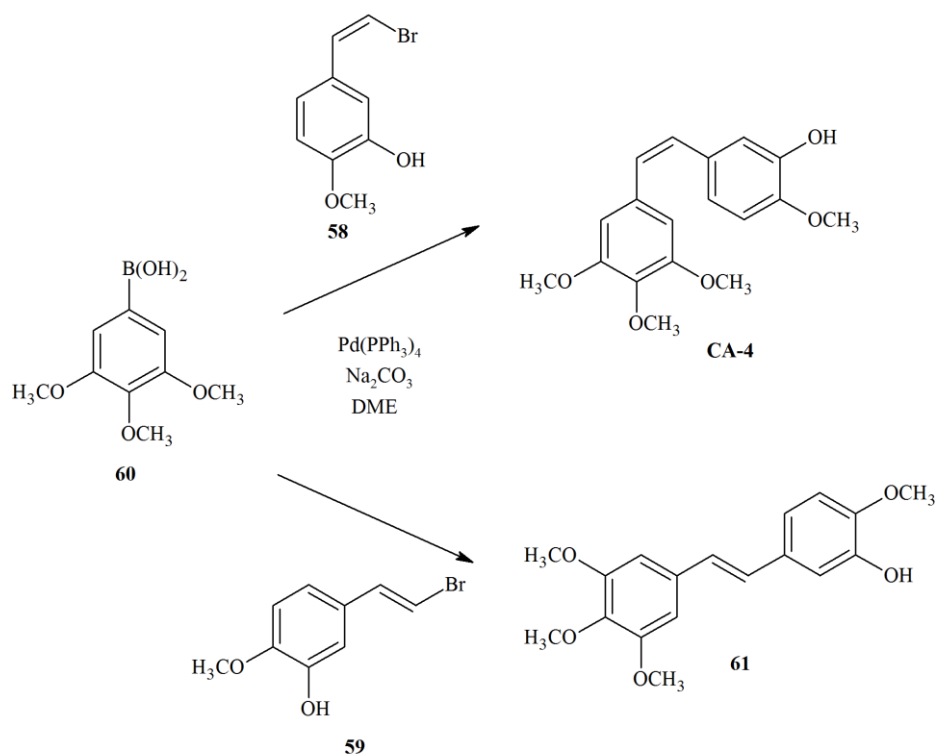
Początkowo utrzymując niską temperaturę oraz krótki czas reakcji, głównym produktem reakcji są pochodne polialkoksy-, które następnie wobec chlorku tytanu (IV), jako katalizatora reagują z utworzeniem wiązania podwójnego między karbonylowymi atomami węgla. Reakcja prowadzi do syntezy związków o konfiguracji (E) [150]. Schemat reakcji otrzymywania analogu (E)-stilbenu przedstawiono na poniższym schemacie.



Schemat 13. Stereoselektywna reakcja syntezy pochodnej stilbenu zgodnie z mechanizmem reakcji McMurry'ego

2.4.6. Reakcja Suzuki

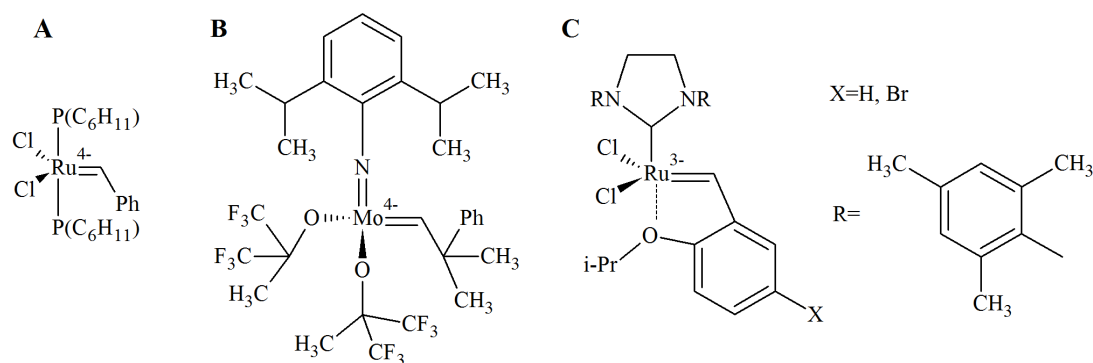
Reakcja pomiędzy nukleofilowymi kwasami organoborowymi (także ich solami lub estrami) a halogenkami aryłowymi lub solami aryldiazoniowymi (względnie alkenami) w obecności katalizatorów palladowych nosi nazwę reakcji Suzuki. Metoda ta odznacza się dużą tolerancją na występowanie różnych grup funkcyjnych i wysoką stereoselektywnością, dlatego może być wykorzystana do syntezy podstawionych stilbenów. Jednym z ciekawych przykładów jej zastosowania jest synteza CA-4 oraz jej (E) izomeru **61** przy wykorzystaniu odpowiedniego izomeru (Z) **58** lub (E) **59** pochodnej bromku winylowego oraz kwasu 3,4,5-trimetoksyfenyloboronowego **60** (Schemat 14) [138].



Schemat 14. Synteza CA-4 oraz jej (E)-izomeru 61 za pośrednictwem metody Suzuki wg [138]

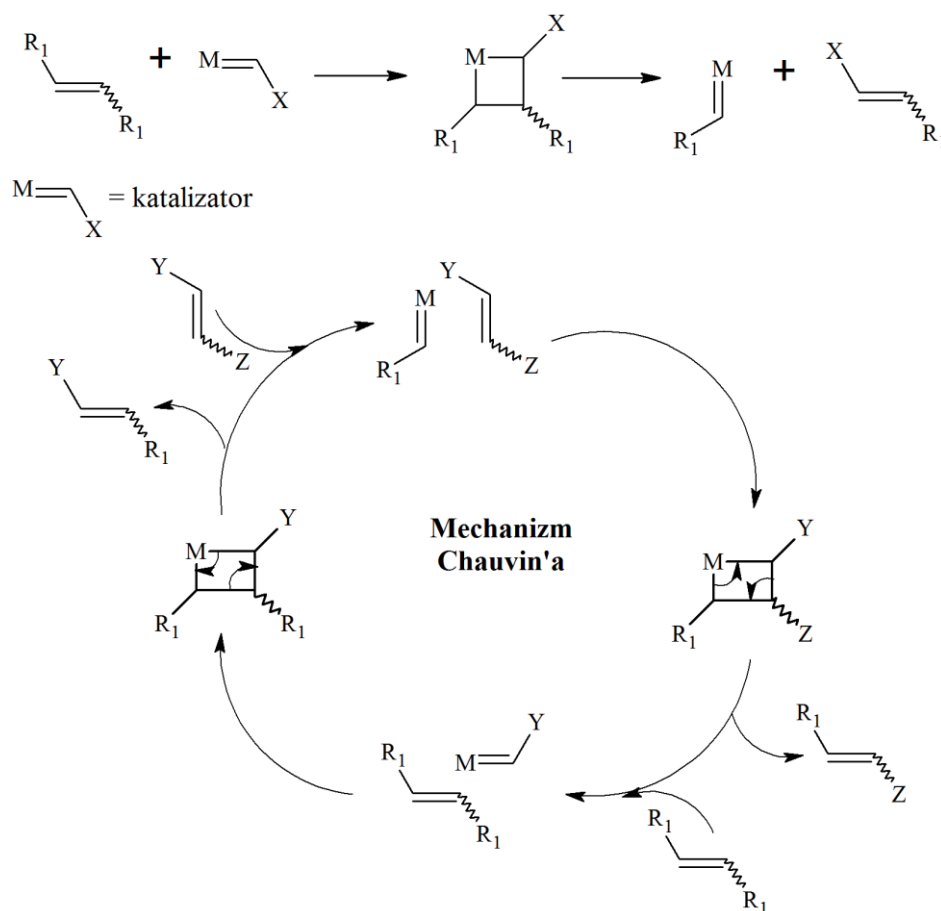
2.4.7. Reakcja krzyżowej metatezy alkenów

Metateza olefin określana jako „transalkilidencja” to wymiana grup funkcyjnych pomiędzy dwoma różnymi alkenami. Reakcji tej po raz pierwszy użyto w rafinacji ropy naftowej (w obecności katalizatora niklowego i pod zwiększonym ciśnieniem). Obecnie jest ona bardzo szeroko stosowana w wielu gałęziach przemysłu. Rozwój tej metody umożliwiło opracowanie wydajnych, homogennych katalizatorów molibdenowych (Schrocka) i rutenowych (Grubbsa) oraz tzw. katalizatorów II generacji (Rysunek 25), dzięki którym reakcja zachodzi z udziałem związków o różnych grupach funkcyjnych [151, 152].



Rysunek 25. Przykładowe katalizatory stosowane w krzyżowej metatezie: katalizator Grubbsa (A), katalizator Schrocka (B), katalizator Grubbsa II generacji (C)

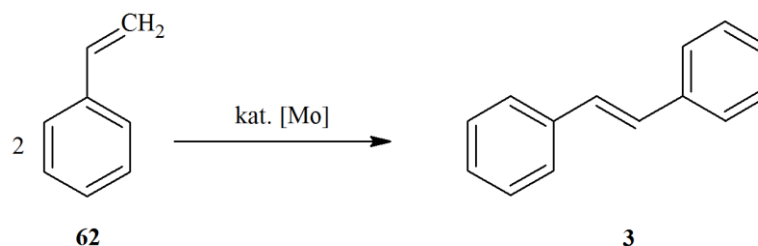
Pod pojęciem metatezy rozumie się: krzyżową metatezę alkenów (ang. *cross metathesis, CM*), metatezę zamykającą pierścień (ang. *ring closing methathesis, RCM*) oraz metatezę otwierającą pierścień (ang. *ring opening methathesis, ROM*). Ogólny mechanizm reakcji składa się z inicjacji i cyklu katalitycznego (Schemat 15) (wyjaśnienie przebiegu procesu przez Yves'a Chauvin'a uhonorowano w 2005 roku Nagrodą Nobla). W fazie inicjacji katalizator metaloorganiczny wymienia podstawniki z alkenem 1. Następnie tak zmodyfikowany katalizator wchodzi w reakcję z alkenem 2, z którym, w podobny sposób jak w inicjacji, zamienia grupy funkcyjne, prowadząc do otrzymania produktu. Kolejna reakcja z alkenem 1 daje nową cząsteczkę produktu.



Schemat 15. Mechanizm reakcji metatezy alkenów [152]

W krzyżowej metatezie używane są głównie pochodne winylu lub styrenu, dzięki czemu, w trakcie procesu wydziela się eten, co przesuwa równowagę reakcji w kierunku tworzenia właściwych produktów. Przebieg reakcji krzyżowej metatezy alkenów przedstawiono na przykładzie syntezy (E)-stilbenu ze styrenu przeprowadzonej przez Schrock'a i wsp. (Schemat 16). Krzyżowa metateza 2 równoważników molowych styrenu **62** pod wpływem katalizatora molibdenowego prowadzi do powstania 1

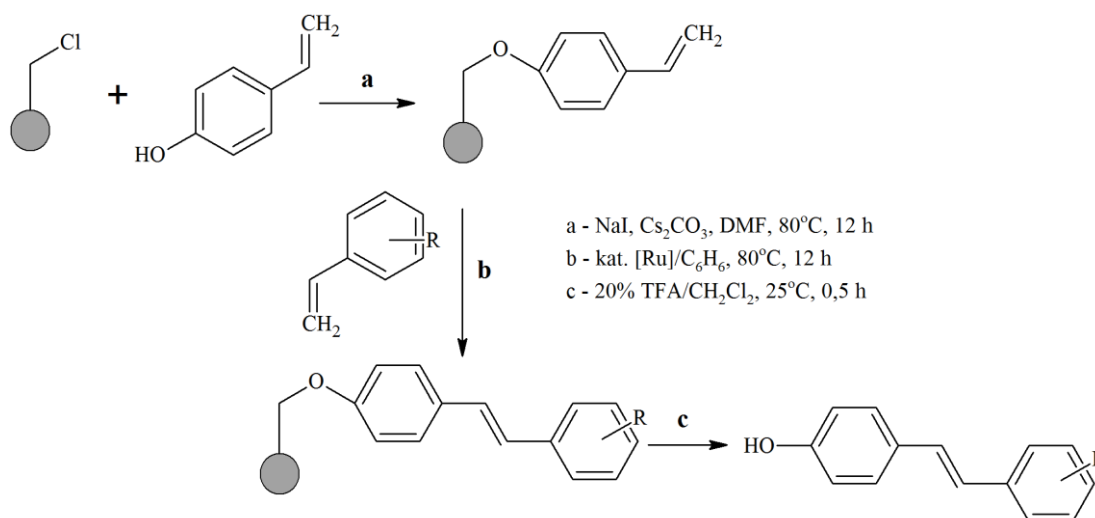
równoważnika molowego (E)-stilbenu **3** oraz etenu. Wydajność zależy silnie od stężenia katalizatora (od 4% dla 0,02 mol% do 95% dla 0,1 mol%) [153].



Schemat 16. Synteza (E)-stilbenu **3** metodą Schrock'a [153]

Jedną z głównych wad reakcji krzyżowej metatezy jest duża liczba potencjalnych produktów, jeżeli substraty nie są identyczne (w wyniku reakcji powstają 3 kombinacje związków, a uwzględniając izomerię geometryczną, liczba ta zwiększa się do 6).

Rozwiązaniem tego problemu stało się opracowanie reakcji krzyżowej metatezy na nośnikach stałych. W metodzie tej jeden z substratów (podstawiony styren) osadzany jest najpierw na żywicy Merrifielda a dopiero potem wprowadza się drugi substrat (inną pochodną styrenu). Otrzymywać można dzięki temu, z dobrą wydajnością i stereoselektywnością pochodne (E)-stilbenu (Schemat 17) [154].



Schemat 17. Synteza pochodnej E-stilbenu za pomocą reakcji krzyżowej metatezy na nośnikach stałych

3. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie, opracowanie optymalnej metody syntezy oraz ocena aktywności biologicznej nowych tiopochodnych (E)- i (Z)-stilbenu (1,2-difenyloetenu) przyjmując odpowiednio RSV oraz CA-4 jako związki wiodące. Modyfikacje strukturalne związków wiodących obejmowały m.in. wymianę atomu/ów tlenu w cząsteczce na bioizosteryczny/e atom/y siarki, a także przyłączane były dodatkowe podstawniki, tj. halogen, grupa metoksylova, metylotiolowa, hydroksylova, tiofenolowa do pozostałych wolnych pozycji w pierścieniach fenyłowych. Ponadto w przypadku pochodnych CA-4 modyfikacje strukturalne obejmowały również mostek winylowy. Polegały one na podstawieniu jednego z protonów winylowych grupą karboksylową lub wprowadzanie aromatycznych układów heterocyklicznych: oksazolu lub N-metyloimidazolu.

Zamierzony cel pracy miał zostać osiągnięty przez realizację następujących zadań badawczych:

1. Opracowanie syntezy substratów koniecznych do otrzymania produktów finalnych.
2. Synteza, izolacja, oczyszczanie, potwierdzenie struktury finalnych tiopochodnych RSV.
3. Badanie biologiczne w zakresie:
 - a. Aktywności cytotoksycznej na wybranych liniach komórek nowotworowych i prawidłowych,
 - b. Wpływu na proces polimeryzacji tubuliny najbardziej cytotoksycznych tiopochodnych RSV.
4. Generowanie wirtualnej biblioteki kombinatorycznej (VCL), wirtualny skrining (VS), komputerowe modelowanie struktur, dokowanie do miejsca receptorowego.
5. Synteza, izolacja, oczyszczanie, potwierdzenie struktury finalnych tiopochodnych CA-4.
6. Badanie biologiczne w zakresie:
 - a. Wpływu na proces polimeryzacji tubuliny tiopochodnych CA-4,
 - b. Aktywności cytotoksycznej na wybranych liniach komórek nowotworowych i prawidłowych.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Komputerowo wspomagane projektowanie tiopochodnych CA-4

4.1.1. Uwagi ogólne

Badania wykonane zostały we współpracy z Panem dr Rafałem Kurczabem z Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk (IF PAN) w Krakowie oraz Panem dr Zbigniewem Dutkiewiczem z jednostki macierzystej na zakładowych klastrach obliczeniowych obu jednostek. Strategia badań CADD obejmowała implementację protokołu VCL-VS, narzędzia do tworzenia i analizy wirtualnych kombinatorycznych bibliotek dla nowych tiopochodnych CA-4. Do zdefiniowania elementów protokołu VCL-VS wykorzystano następujące oprogramowanie: ChemAxon Instant JChem (system zarządzania chemicznymi bazami danych [155], Discovery Studio 3.5 [156], Glide [157] oraz biblioteki chemoinformatyczne MayaChemTools [158] i JChem [159]. Rysunki 3D zadokowanych struktur tiopochodnych CA4 w domenie kolchicynowej wykonano przy pomocy programu PyMOL [160]. Wszelkie obliczenia statystyczne (krzywe ROC, ang. *Receiver Operating Characteristic*, wartości AUC, ang. *Area Under the Curve*) oraz określenie precyzji i czułości użytych klasyfikatorów dla otrzymanych modeli predykcyjnych wykonano za pomocą pakietu R z użyciem biblioteki ROCR.

4.2. Synteza tiopochodnych RSV i CA-4

4.2.1. Uwagi ogólne

Rozpuszczalniki i substraty stosowane w syntezie pochodziły z asortymentu oferowanego przez firmę SigmaAldrich, Fluka, lub POCh. Reakcje z zastosowaniem reagentów wrażliwych na wilgoć lub tlen z powietrza prowadzono w atmosferze azotu w naczyniach osuszonych nad płomieniem palnika. Bezwodne rozpuszczalniki zakupiono w firmie SigmaAldrich lub jak w przypadku THF i toluenu osuszano samodzielnie metodą Na/benzofenon a następnie przechowywano nad sitami molekularnymi 4Å. Reagenty zakupione handlowo oznaczono cyframi arabskimi (z wyjątkiem wybranych hydroksybenzaldehydów: **ald 1**, **ald 2**, **ald 3**, **ald 5**). Wszystkie schematy reakcji oraz struktury związków zostały opracowane w oparciu o darmową

wersję (ang. *freeware version*) oprogramowania ChemSketch 12.1 firmy Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs).

Temperatura topnienia – pomiary przeprowadzono na aparacie „Stuart” firmy Bibby Sterlin Ltd®, przy użyciu otwartych kapilar, a otrzymane wyniki podano bez poprawek.

Spektroskopia :

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) ^1H ^{13}C rejestrowane były na spektrofotometrze Bruker Avance II 400 (częstość robocza dla ^1H NMR-400 MHz, dla ^{13}C NMR-101 MHz) oraz Bruker Avance III 500 (częstość robocza dla ^1H NMR-500MHz, dla ^{13}C NMR-126 MHz) oraz Bruker Avance III 700 (częstość robocza dla ^1H NMR-700MHz, dla ^{13}C NMR-176 MHz) w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Jako rozpuszczalnika używano głównie CDCl_3 i sporadycznie DMSO-d_6 . Wartości wszystkich przesunięć chemicznych wyrażone są w skali δ (ppm), wobec sygnału rozpuszczalnika, względem wzorca wewnętrznego tetrametylosilanu, a stałe sprzężenia J wyrażono w hercach [Hz]. Dla opisu multipletowości sygnałów zastosowano następujące skróty: s – singlet, d – dublet, dd – dublet dubletów, t - triplet, m - multiplet. Widma NMR wizualizowano i analizowano za pośrednictwem oprogramowania MestReNova w wersji 8.1.2-11880 firmy Mestrelab Research. (licencja akademicka).

Widma w podczerwieni (IR) – wykonano na aparacie Bruker FT-IR IFS 66v/s, w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Widma IR wizualizowano za pomocą oprogramowania MagicPlotPro w wersji 2.5.1 (licencja własna).

Widma masowe – niskorozdzielcze (LRMS) wykonywano z wykorzystaniem aparatu Bruker 320MS/420GC oraz wysokorozdzielcze (HRMS) z wykorzystaniem aparatu Intectra Mass AMD 402 w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W obu metodach wykorzystywano technikę jonizacji Electron Impact (EI).

Analiza rentgenostrukturalna: Umieszczone wyniki analizy rentgenostrukturalnej zostały udostępnione przez Panią mgr Agnieszkę Gielarę-Korzańską i wykonane w Zakładzie Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z wykorzystaniem dyfraktometru Excalibur z detektorem Atlas. Struktury krystalograficzne przedstawione w pracy wizualizowano przy wykorzystaniu

oprogramowania Mercury CSD 3.1 firmy Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC).

Chromatografia :

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) - wykonywano techniką wstępującą na płytkach plastikowych pokrytych żelem krzemionkowym F254 typ 60 firmy E. Merck[®] a do wizualizacji plam używano lampy UV Spectroline przy dwóch długościach fali 254nm lub 365nm. Analizę wykonywano rutynowo, w celu wstępnej identyfikacji produktów.

Chromatografia preparatywna :

Kolumnowa (CC) - wykonano stosując kolumny chromatograficzne różnej wielkości w zależności od ilości nałożonego związku, w tym kolumnę ciśnieniową EZSafe[™] z zastosowaniem głównie żelu krzemionkowego Kieselgel 60 H (40-60 μm) firmy E. Merck[®] oraz sporadycznie do rozdziału izomerów Z/E z zastosowaniem żelu krzemionkowego Kieselgel 60 H (15-40 μm).

4.2.2. Wykaz stosowanych rozpuszczalników i reagentów

- alkohol 4-metylotiobenzylowy **63** (Sigma-Aldrich)
- 2-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd (o-wanilina – **ald 1**) (Sigma-Aldrich)
- 3-hydroksy-4-metoksybenzaldehyd (izowanilina – **ald 2**) (Sigma-Aldrich)
- 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd (wanilina – **ald3**) (Sigma-Aldrich)
- 4-hydroksy-3,5-dimetoksybenzaldehyd – **ald 5** (Sigma-Aldrich)
- 2-metoksybenzaldehyd **65** (Sigma-Aldrich)
- 3-metoksybenzaldehyd **66** (Sigma-Aldrich)
- 2,3-dimetoksybenzaldehyd **67** (Sigma-Aldrich)
- 2,5-dimetoksybenzaldehyd **68** (Sigma-Aldrich)
- 3,5-dimetoksybenzaldehyd **69** (Sigma-Aldrich)
- 2,3,4-trimetoksybenzaldehyd **70** (Sigma-Aldrich)
- 3,4,5-trimetoksybenzaldehyd **71** (Fluka)
- 2,4,5-trimetoksybenzaldehyd **72** (Sigma-Aldrich)
- 2-metylotiobenzaldehyd **75** (Sigma-Aldrich)
- bezwodnik kwasu octowego (Ac₂O) (Sigma-Aldrich)
- bezwodny chlorek wapnia (CaCl₂) (POCH)

- bezwodny dimetyloformamid (DMF) (Sigma-Aldrich)
- bezwodny etanol (Sigma-Aldrich)
- bezwodny węglan potasu (K_2CO_3) (POCH)
- brom (Sigma-Aldrich)
- chinolina (Sigma-Aldrich)
- chlorek N,N-dimetylotiokarbamoilowy **73** (Sigma-Aldrich)
- chlorek tionylu ($SOCl_2$) (Sigma-Aldrich)
- chloroform ($CHCl_3$) (POCH)
- dihydrat kwasu p-toluenosulfonowego (Sigma-Aldrich)
- etanol 96% (POCH)
- eter dietylowy (POCH)
- eter difenylowy (Sigma-Aldrich)
- eter diizopropylowy (POCH)
- glikol etylenowy **74** (Sigma-Aldrich)
- heksan (POCH)
- jodek metylu (CH_3J) (Sigma-Aldrich)
- kwas 3,4,5-trimetoksyfenylooctowy **44** (Sigma-Aldrich)
- kwas solny (POCH)
- metanol (MeOH) (POCH)
- miedź (Cu) (Sigma-Aldrich)
- octan etylu (EtOAc) (POCH)
- 2-propanol (POCH)
- siarczan dimetylu (Sigma-Aldrich)
- siarczan magnezu ($MgSO_4$) (POCH)
- tetrahydrofuran (THF) (POCH)
- toluen (POCH)
- 4-toluenosulfonian sodu **76** (Sigma-Aldrich)
- trietyloamina (Et_3N) (Sigma-Aldrich)
- trietylofosforyn (Sigma-Aldrich)
- węgiel aktywny (Sigma-Aldrich)
- węglan sodu (Na_2CO_3)
- wodorek sodu (NaH – 60% dyspersja w oleju mineralnym) (Sigma-Aldrich)

- wodorotlenek potasu (KOH) (POCH)
- wodorotlenek sodu (NaOH) (POCH)
- sól sodowa kwasu 4-toluenosulfinowego (Sigma-Aldrich)
- eter t-butyloowo-metylowy (TMBE) (Sigma-Aldrich)
- kwas kamforosulfonowy (Sigma-Aldrich)
- formamid (Sigma-Aldrich)
- dimetoksyetan (DME) (Sigma-Aldrich)
- tlenochlorek fosforu (POCl₃) (Sigma-Aldrich)
- wodorowęglan sodu (NaHCO₃) (POCH)
- 33% roztwór metyloaminy w etanolu (MeNH₂) (Sigma-Aldrich)
- lodowaty kwas octowy (AcOH) (POCH)

4.3. Synteza tiopochodnych RSV

4.3.1. Synteza 4-metylotiobenzylfosfonianu dietylu (Fos1)

Synteza chlorku 4-metylotiobenzylowego (64) [161]

W kolbie dwuszyjnej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w płuczkę oraz wkraplacz rozpuszczono alkohol 4-metylotiobenzylowy **63** (13,00 g, 84,20 mmola) w 140 ml bezwodnego toluenu a następnie wkraplano w tempie 1 kropla/s chlorek tionylu (12,40 g, 104 mmole) intensywnie mieszając mieszadłem magnetycznym zawartość kolby reakcyjnej. Barwa roztworu zmieniła się z lekko żółtej na intensywnie żółtą. Po całkowitym wkropleniu chlorku tionylu reakcję prowadzono przez 30 minut. Mieszaninę poreakcyjną przemyto następnie 5-krotnie 150 ml roztworu lodowatej solanki celem pozbycia się resztek chlorku tionylu, osuszono bezwodnym MgSO₄, po czym przesączono przez sączek karbowany. Toluen odparowano na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość (14 g) w postaci jasnożółtego oleju oczyszczano za pomocą destylacji próżniowej zbierając frakcję wrzącą w temp. 115°C/2,5mmHg (lit. 105°C/0,5mmHg [161]) uzyskując **64** (12,27 g, wyd. 84%) jako bezbarwną ciecz, która bardzo łatwo krystalizuje podczas przechowywania w lodówce, R_f=0,6 (heksan:EtOAc, 10:2).

Synteza 4-metylotiobenzylfosfonianu dietylu (Fos1) [162]

W kolbie trójszyjnej o pojemności 100 ml zaopatrzonej we wkraplacz i chłodnicę zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ umieszczono trietylofosforyn (13,82

g, 83,20 mmoli). Następnie układ ogrzewano na łaźni olejowej do temperatury 170 °C, po czym wkroplono **64** (12,27 g, 71,06 mmoli). Zaobserwowano wydzielanie się pęcherzyków chlorku etylowego oraz podczas skapywania z chłodnicy obłoki mgły tego związku. Reakcję utrzymywano w temperaturze delikatnego wrzenia przez około 2 godziny. Po zakończeniu reakcji przeprowadzono destylację pod zmniejszonym ciśnieniem. Zbierano frakcję wrzącą w temp. 151-152°C, pod ciśnieniem 0,4 mmHg (lit. 142-145°C/0,025mmHg [162]). Otrzymano **Fos1** (15,6 g, wyd. 80%) jako bezbarwną ciecz, $R_f=0,05$ (heksan:EtOAc, 10:2).

4-metylotiobenzylfosfonian dietylu (C₁₂H₁₉O₃PS, m.cz. 274,3162) (Fos1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.23 – 7.06 (m, 4H, C2-H, C-3H, C5-H, C6-H), 4.15 – 3.75 (m, 4H, C9-CH₂, C11-CH₂), 3.09 (s, 1H, C8-H), 3.03 (s, 1H, C8-H), 2.42 (s, 3H, C4-SCH₃), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, C10-CH₃, C12-CH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 136.91 (C4), 130.17 (C2), 130.10 (C6), 128.35 (C1), 126.77 (C3), 126,74 (C5), 62.10 (C9), 62.03 (C11), 33.14 (C8), 16.36 (C10), 16.30 (C12), 15.84 (C7). LRMS (EI) m/z 274 ([M]⁺, 100%), 136,9 ([CH₃SPhCH₂]⁺, 68,8%).

4.3.2. Generalna procedura syntezy związków S1-S8

Do wysuszonej w płomieniu palnika kolby dwuszyjnej o pojemności 100 ml zaopatrzonej we wkraplacz oraz płuczkę wprowadzono NaH (60% dyspersja w oleju mineralnym) w 10% nadmiarze molowym (0,24 g, 6,02 mmoli) w stosunku do substratów oraz 10 ml bezwodnego DMF mieszając układ na mieszadle magnetycznym. Do tak przygotowanej zawiesiny wkraplano z szybkością 1 kropla/s **Fos1** (1,50 g, 5,47 mmoli) rozpuszczony w 10 ml bezwodnego DMF obserwując zmętnienie mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadzono w atmosferze azotu w łaźni lodowej w temperaturze 0 do -5°C. Po 30 minutach wkroplono rozpuszczony w 10 ml bezwodnego DMF odpowiedni metoksybenzaldehyd **65-72** (5,47 mmoli) z szybkością 1 kropla/s. Nastąpił zanik zmętnienia mieszaniny reakcyjnej a reakcję doprowadzono do temperatury pokojowej i w tej temperaturze reakcja przebiegała 1,5 godziny. Mieszaninę reakcyjną wylano następnie na wodę z lodem (250 ml) i mieszano na mieszadle magnetycznym do momentu wypadnięcia osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem oraz wysuszono w eksyktorze próżniowym. Tak otrzymany surowy produkt krystalizowano z 96% etanolu otrzymując za każdym razem biały krystaliczny osad produktu.

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2-metoksyfenylo)eten (C₁₆H₁₆OS, m.cz. 256.36) (S1) [69]. (Wyd. 0,85 g, 60 %); t.t. = 87-89°C; R_f = 0,35 (heksan:octan etylu, 10:4). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.51 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, C6-H), 7.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, C2'-H, C6'-H), 7.37 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, Cvin-H), 7.16 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, C4-H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, C3'-H, C5'-H), 6.99 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, Cvin'-H), 6.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, C5-H), 6.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, C3-H), 3.81 (s, 3H, C2-OCH₃), 2.42 (s, 3H, -SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 156.85 (C2), 137.38 (C4'), 135.02 (C1'), 128.59 (C4), 128.43((Cvin), 126.94 (C2', C6'), 126.74 (C3', C5'), 126.41 (Cvin'), 126.32 (C1), 122.90 (C6), 120.74 (C5), 110.93 (C3), 55.51 (C2-OCH₃), 15.92 (-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3048 (ν=C_{Ar}-H), 3023 (ν=C_{vin}-H), 2998 (CH₃), 2918 (CH₃), 2967 (ν_{as} CH₃), 2885 (ν_s CH₃), 2837 (ν O-CH₃), 1628 (ν C_{vin}=C_{vin}), 1592 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1574 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1484 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1462 (δ_{as} CH₃), 1404 (δ_s CH₃), 1241 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1031 (ν_s C_{Ar}-O-C), 973 (γ^{oop}=C_{vin}-H), 808 (γ^{oop}=C_{Ar}-H) 754 (γ^{oop}=C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 256 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₆H₁₆OS: 256,09164. Znaleziono: 256,09205.

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3-metoksyfenylo)eten (C₁₆H₁₆OS, m.cz. 256.36) (S2) [69]. (Wyd. 0,77 g, 55 %); t.t. = 92-94°C; R_f = 0,40 (heksan:octan etylu, 10:4). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, C2'-H, C6'-H), 7.26 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, Cvin'-H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, C3'-H, C5'-H), 7.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, C6-H), 7.08 – 6.99 (m, 3H, C2-H, C5-H, Cvin-H), 6.81 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, C4-H), 3.84 (s, 3H, C3-OCH₃), 2.50 (s, 3H, -SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 159.89 (C3), 138.77 (C4'), 137.93 (C1), 134.17 (C1'), 129.62 (C5), 128.33 (Cvin), 127.95 (Cvin'), 126.91 (C2', C6'), 126.68 (C3', C5'), 119.15 (C6), 113.23 (C2), 111.64 (C4), 55.24 (C3-OCH₃), 15.79 (-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3048 (ν=C_{Ar}-H), 3018 (ν=C_{vin}-H), 2959 (ν_{as} CH₃), 2875 (ν_s CH₃), 2833 (ν O-CH₃), 1632 (ν C_{vin}=C_{vin}), 1598 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1588 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1496 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1456 (δ_{as} CH₃), 1402 (δ_s CH₃), 1244 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1037 (ν_s C_{Ar}-O-C), 969 (γ^{oop}=C_{vin}-H), 845 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 808 (γ^{oop}=C_{Ar}-H) 780 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 686 (γ^{oop}=C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 256 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₆H₁₆OS: 256,09164. Znaleziono: 256,09194.

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,3-dimetoksyfenylo)eten (C₁₇H₁₈O₂S, m.cz. 286.39) (S3) [69]. (Wyd. 0,78 g, 50 %); t.t. = 83-85°C; R_f = 0,38 (heksan:octan etylu, 10:4). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, C2'-H, C6'-H), 7.45 (d, *J* =

16.5 Hz, 1H, Cvin-**H**), 7.30 – 7.25 (m, 3H, C3'-**H**, C5'-**H**, C6-**H**), 7.12 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H, Cvin'-**H**), 7.09 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, C5-**H**), 6.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, C4-**H**), 3.92 (s, 3H, C3-OCH₃), 3.89 (s, 3H, C2-OCH₃), 2.54 (s, 3H, -SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 153.06 (**C2**), 146.86 (**C3**), 137.81 (**C4'**), 134.62 (**C1'**), 131.50 (**Cvin**), 129.20 (**C1**), 127.00 (**C2'**, **C6'**), 126.68 (**C3'**, **C5'**), 124.07 (**Cvin'**), 122.27 (**C6**), 117.74 (**C4**), 111.27 (**C5**), 61.04 (C2-OCH₃), 55.78 (C3-OCH₃), 15.82 (-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3051 ($\nu = C_{Ar}-H$), 3015 ($\nu = C_{vin}-H$), 2972 ($\nu_{as} CH_3$), 2825 ($\nu O-CH_3$), 1623 ($\nu C_{vin}=C_{vin}$), 1586 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1574 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1476 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1455 ($\delta_{as} CH_3$), 1404 ($\delta_s CH_3$), 1260 ($\nu_{as} C_{Ar}-O-C$), 1072 ($\nu_s C_{Ar}-O-C$), 977 ($\gamma^{oop} = C_{vin}-H$), 809 ($\gamma^{oop} = C_{Ar}-H$) 777 ($\gamma^{oop} = C_{Ar}-H$), 718 ($\gamma^{oop} = C_{Ar}-H$). LRMS (EI) m/z 286,1 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₇H₁₈O₂S: 286,10280. Znaleziono: 286,10304.

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,5-dimetoksyfenylo)eten (C₁₇H₁₈O₂S, m.cz. 286.39) (S4). (Wyd. 0,97 g, 62 %); t.t. = 58-60°C; R_f = 0,45 (heksan:octan etylu, 10:4). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.47 (d, $J = 8.30$, 2H, C2'-**H**, C6'-**H**), 7.43 (d, $J = 16.50$, 1H, Cvin-**H**), 7.25 (d, $J = 8.40$, 2H, C3'-**H**, C5'-**H**), 7.16 (s, 1H, C6-**H**), 7.06 (d, $J = 16.37$, 1H, Cvin'-**H**), 6.85 (d, $J = 8.9$, 1H, C3-**H**), 6.81 (d, $J = 8.9$, 1H, C4-**H**), 3.86 (s, 3H, C2-OCH₃), 3.83 (s, 3H, C5-OCH₃), 2.51 (s, 3H, C4'-SCH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 153.73 (**C2**), 151.38 (**C5**), 137.55 (**C4'**), 134.76 (**C1'**), 128.64 (**Cvin**), 127.20 (**C2'**, **C6'**), 126.96 (**C1**), 126.65 (**Cvin'**), 122.64 (**C3'**, **C5'**), 113.62 (**C4**), 112.25 (**C6**), 111.51 (**C3**), 56.22 (C2-OCH₃), 55.74 (C5-OCH₃), 15.81 (C4'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3071 ($\nu = C_{Ar}-H$), 3029 ($\nu = C_{vin}-H$), 2947 ($\nu_{as} CH_3$), 2828 ($\nu O-CH_3$), 1588 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1499 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1442 ($\delta_{as} CH_3$), 1405 ($\delta_s CH_3$), 1214 ($\nu_{as} C_{Ar}-O-C$), 1050 ($\nu_s C_{Ar}-O-C$), 975 ($\gamma^{oop} = C_{vin}-H$), 851 ($\gamma^{oop} = C_{Ar}-H$) 805 ($\gamma^{oop} = C_{Ar}-H$), 718 ($\gamma^{oop} = C_{Ar}-H$). LRMS (EI) m/z 286 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₇H₁₈O₂S: 286,10280. Znaleziono: 286,10104.

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3,5-dimetoksyfenylo)eten (C₁₇H₁₈O₂S, m.cz. 286.39) (S5) [69]. (Wyd. 0,91 g, 58 %); t.t. = 81-83°C; R_f = 0,42 (heksan:octan etylu, 10:4). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C3'-**H**, C5'-**H**), 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, C2'-**H**, C6'-**H**), 7.04 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, Cvin'-**H**), 6.99 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, Cvin-**H**), 6.67 (s, 1H, C6-**H**), 6.66 (s, 1H, C2-**H**), 6.40 (s, 1H, C4-**H**), 3.83 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 2.51 (s, 3H, -SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 161.02 (**C3**, **C5**), 139.38 (**C4'**), 138.06 (**C1**), 134.09 (**C1'**), 128.58 (**Cvin**), 128.07

(**Cvin'**), 126.98 (**C2'**, **C6'**), 126.69 (**C3'**, **C5'**), 104.53 (**C2**, **C6**), 99.97 (**C4**), 55.39 (**C3-OCH₃**, **C5-OCH₃**), 15.80 (**-SCH₃**). FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3074 ($\nu=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 3013 ($\nu=\text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 2954 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$), 2837 ($\nu\text{O-CH}_3$), 1630 ($\nu\text{C}_{\text{vin}}=\text{C}_{\text{vin}}$), 1587 ($\nu\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1494 ($\nu\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1457 ($\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$), 1405 ($\delta_{\text{s}}\text{CH}_3$), 1207 ($\nu_{\text{as}}\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 1150 ($\nu\text{C-O-C}$), 1063 ($\nu_{\text{s}}\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 965 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 856 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 817 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 680 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$). LRMS (EI) m/z 286,1 ($[\text{M}]^+$, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{S}$: 286,10280. Znaleziono: 286,10258.

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,3,4-trimetoksyfenylo)eten ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}$, m.cz. 316.41) (**S6**). (Wyd. 1,21 g, 70 %); t.t. = 144-146°C; R_f = 0,51 (heksan:octan etylu, 10:4). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 7.44 (d, J = 8.30, 2H, **C2'-H**, **C6'-H**), 7.30 (d, J = 16.30, 1H, **Cvin-H**), 7.30 (d, J = 8.8, 1H, **C6-H**), 7.24 (d, J = 8.30, 2H, **C3'-H**, **C5'-H**), 6.99 (d, J = 16.50, 1H, **Cvin'-H**), 6.70 (d, J = 8.8, 1H, **C5-H**), 3.91 (s, 3H, **C3-OCH₃**), 3.91 (s, 3H, **C4-OCH₃**), 3.88 (s, 3H, **C2-OCH₃**), 2.50 (s, 3H, **C4'-SCH₃**). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 153.17 (**C2**), 151.64 (**C4**), 142.38 (**C3**), 137.26 (**C4'**), 134.93 (**C1'**), 127.21 (**C2'**, **C6'**), 126.72 (**Cvin**), 126.71 (**C3'**, **C5'**), 124.42 (**Cvin'**), 122.31 (**C6**), 120.56 (**C1**), 107.76 (**C5**), 61.26 (**C3-OCH₃**), 60.85 (**C2-OCH₃**), 55.99 (**C4-OCH₃**), 15.85 (**C4'-SCH₃**). FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3051 ($\nu=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 3010 ($\nu=\text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 2963 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$), 2834 ($\nu\text{O-CH}_3$), 1584 ($\nu\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1495 ($\nu\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1458 ($\delta_{\text{as}}\text{CH}_3$), 1253 ($\nu_{\text{as}}\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 1095 ($\nu\text{C-O-C}$), 1038 ($\nu_{\text{s}}\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 973 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 813 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 799 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$). LRMS (EI) m/z 316,1 ($[\text{M}]^+$, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}$: 316,11335. Znaleziono: 316,11356.

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}$, m.cz. 316.41) (**S7**). (Wyd. 1,3 g, 75 %); t.t. = 111-113°C (lit. 111-113°C [112]), R_f = 0,55 (heksan:octan etylu, 10:4). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 7.22 (d, J = 8.30, 2H, **C2'-H**, **C6'-H**), 7.14 (d, J = 8.30, 2H, **C3'-H**, **C5'-H**), 6.51 (d, J = 16.50, 1H, **Cvin-H**), 6.48 (d, J = 16.30, 1H, **Cvin'-H**), 6.48 (s, 2H, **C2-H**, **C6-H**), 3.84 (s, 3H, **C4-OCH₃**), 3.68 (s, 6H, **C3-OCH₃**, **C5-OCH₃**), 2.46 (s, 3H, **C4'-SCH₃**). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 152.91 (**C3**, **C5**), 137.36 (**C4**), 137.21 (**C4'**), 134.04 (**C1'**), 132.55 (**C1**), 129.88 (**Cvin**), 129.41 (**C2'**, **C6'**), 129.28 (**Cvin'**), 126.16 (**C3'**, **C5'**), 105.94 (**C2**, **C6**), 60.90 (**C4-OCH₃**), 55.89 (**C3-OCH₃**, **C5-OCH₃**), 15.74 (**C4'-SCH₃**). LRMS (EI) m/z 316,1 [M^+ , 100%]. FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3051 ($\nu=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 3031 ($\nu=\text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 2955 ($\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$), 2871 ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$), 2831 ($\nu\text{O-CH}_3$), 1577 ($\nu\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1502 ($\nu\text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$),

1458 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1244 ($\nu_{\text{as}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 1128 ($\nu \text{C-O-C}$), 981 ($\gamma^{\text{oop}} = \text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 830 ($\gamma^{\text{oop}} = \text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 804 ($\gamma^{\text{oop}} = \text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$). LRMS (EI) m/z 316,1 ($[\text{M}]^+$, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}$: 316,11335. Znaleziono: 316,11304.

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,4,5-trimetoksyfenylo)eten ($\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}$, m.cz. 316.41) (S8). (Wyd. 1,12 g, 65 %); t.t. = 113-115°C; R_f = 0,53 (heksan:octan etylu, 10:4). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 7.46 (d, J = 8.30, 2H, $\text{C}2'\text{-H}$, $\text{C}6'\text{-H}$), 7.40 (d, J = 16.50, 1H, $\text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 7.24 (d, J = 8.40, 2H, $\text{C}3'\text{-H}$, $\text{C}5'\text{-H}$), 7.13 (s, 1H, $\text{C}6\text{-H}$), 6.94 (d, J = 16.40, 1H, $\text{C}_{\text{vin}}'\text{-H}$), 6.55 (s, 1H, $\text{C}3\text{-H}$), 3.93 (s, 6H, $\text{C}4\text{-OCH}_3$, $\text{C}5\text{-OCH}_3$), 3.88 (s, 3H, $\text{C}2\text{-OCH}_3$), 2.51 (s, 3H, $\text{C}4'\text{-SCH}_3$). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 151.68 (**C2**), 149.59 (**C4**), 143.44 (**C5**), 136.93 (**C4'**), 135.19 (**C1'**), 126.79 (**C2'**, **C6'**), 126.67 (**C3'**, **C5**), 126.16 (**Cvin**), 122.41 (**Cvin'**), 118.24 (**C1**), 109.34 (**C6**), 97.71 (**C3**), 56.68 ($\text{C}4\text{-OCH}_3$), 56.53 ($\text{C}5\text{-OCH}_3$), 56.06 ($\text{C}2\text{-OCH}_3$), 15.93 ($\text{C}4'\text{-SCH}_3$). FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3049 ($\nu = \text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 3018 ($\nu = \text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 2954 ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$), 2855 ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_3$), 2832 ($\nu \text{O-CH}_3$), 1608 ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1519 ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1448 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1406 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$), 1211 ($\nu_{\text{as}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 1128 ($\nu \text{C-O-C}$), 1044 ($\nu_{\text{s}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 961 ($\gamma^{\text{oop}} = \text{C}_{\text{vin}}\text{-H}$), 852 ($\gamma^{\text{oop}} = \text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 805 ($\gamma^{\text{oop}} = \text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$). LRMS (EI) m/z 316,1 ($[\text{M}]^+$, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}$: 316,11335. Znaleziono: 316,11207.

4.4. Synteza CA-4

Synteza kwasu (E)-3-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-prop-2-enowego (CA4COOH) [138]

W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono (4,00 g, 17,68 mmola) kwasu 3,4,5-trimetoksyfenylooctowego **44**, (2,00 g, 17,68 mmoli) izowaniliny **ald 2**, 4 ml bezwodnika kwasu octowego oraz 2 ml trietyloaminy (1,45 g, 14,33 mmoli). Układ ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy, z wykorzystaniem łaźni olejowej w temperaturze 110°C, w atmosferze azotu przez 3 godziny. W trakcie trwania reakcji mieszanina reakcyjna zmieniła zabarwienie na ciemnobrązowy. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano kroplami 6 ml stężonego kwasu solnego a wytrącony osad odsączono na lejku ze szkła spiekane, przemyto wodą oraz przekrystalizowano z 50 ml 96% etanolu. Otrzymano (4,00 g, wyd. 62%) jasnożółtych kryształów **CA4COOH**; t.t.=228-230°C (lit. 237-239°C [138]), R_f =0,05 (heksan:EtOAc, 1:1).

Kwas (E)-3-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)prop-2-enowy ($C_{19}H_{20}O_7$, m.cz. 360.36) (**CA4COOH**). LRMS (EI) m/z 360,2 ($[M]^+$, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $C_{19}H_{20}O_7$: 360,12042. Znaleziono: 360,12405.

Synteza (Z)-1-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenu
(**CA-4**) [138]

Do kolby okrągłodennej o pojemności 25 ml wprowadzono (2,00 g, 5,55 mmola) pochodnej kwasu α -fenylocynamonowego **CA4COOH**, (1,84 g, 28,8 mmola) miedzi oraz 20 ml (21,90 g, 170 mmoli) chinoliny. Reakcję prowadzono w temperaturze 200°C w atmosferze azotu przez 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej oraz rozcieńczono 30 ml eteru dietylowego i odsączono miedź na lejku Büchnera, przemywając kolbkę i sączek eterem w celu minimalizacji strat. Warstwę organiczną przemyto 5% roztworem kwasu solnego (3x50ml). Fazy wodne połączono i przemyto trzema porcjami eteru dietylowego (3x50ml). Warstwy organiczne połączono i przemyto 50 ml nasyconego roztworu Na_2CO_3 , wodą destylowaną (2x50ml) solanką (3x50ml), następnie osuszono bezwodnym $MgSO_4$ i odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując oleistą brunatną ciecz. Następnie przeprowadzono chromatografię kolumnową (heksan:EtOAc, 7:3). Uzyskano (1,10 g, wyd. 68%) białego drobnokrystalicznego osadu **CA-4**; t.t.=114-115°C (lit. 117-118°C [138]), $R_f=0,42$ (heksan:EtOAc, 1:1).

(Z)-1-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten ($C_{18}H_{20}O_5$, m.cz. 316,35) (**CA-4**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 6.92 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, C2'-H), 6.80 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 1H, C6'-H), 6.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, C5'-H), 6.53 (s, 2H, C2-H, C6-H), 6.47 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, Cvin-H), 6.41 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, Cvin'-H), 5.49 (s, 1H, C3'-OH), 3.87 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.84 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.70 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): δ 152.89 (C3, C5), 145.76 (C3'), 145.26 (C4'), 137.25 (C4), 132.69 (C1), 130.69 (C1'), 129.48 (Cvin), 127.83 (Cvin'), 121.11 (C6'), 115.05 (C2'), 110.33 (C5'), 106.14 (C2, C6), 60.92 (C4-OCH₃), 55.96 (C3-OCH₃, C4'-OCH₃, C5-OCH₃). FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3382 (ν O-H), 3068 ($\nu=C_{Ar}-H$), 3041 ($\nu=C_{Ar}-H$), 3010 ($\nu=C_{vin}-H$), 2934 (ν CH₃), 2972 (ν_{as} CH₃), 2833 (ν O-CH₃), 1579 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1511 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1455 (δ_{as} CH₃), 1400 (δ_s CH₃), 1274 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1222 (ν C_{Ar}-OH), 1133 (ν C-O-C), 1036 (ν_s C_{Ar}-O-C), 975 (γ^{oop} =C_{vin}-H), 877 (γ^{oop} =C_{Ar}-H) 793 (γ^{oop} =C_{Ar}-H), 761 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 315,9

([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₈H₂₀O₅: 316,13097. Znaleziono: 316,13107.

4.5. Synteza tiopochodnych CA-4

4.5.1. Synteza bromobenzaldehydów

Synteza 3-bromo-4-hydroksy-5-metoksybenzaldehydu (5-bromowaniliny) (ald 4)

[163]

W kolbie trójszyjnej o pojemności 1000 ml umieszczonej na mieszadle magnetycznym i zaopatrzonej we wkraplacz i płuczkę rozpuszczono (70,03 g, 460,26 mmoli) 4-hydroksy-3-metoksybenzaldehydu (waniliny) **ald 3** w 500 ml metanolu a następnie mieszaninę oziębiono do 0°C. Po ustabilizowaniu temperatury mieszając wkraplano przez 30 minut (80,94 g, 506,35 mmoli) bromu intensywnie mieszając medium reakcyjne. Po wkropleniu doprowadzono mieszaninę do temperatury pokojowej i mieszano w tych warunkach przez 30 minut. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem (1500 ml) w celu wytrącenia produktu. Otrzymany osad przesączono przez sączek ze spiekem szklanym a następnie wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymano (105,88 g, wyd. 99%) kremowego krystalicznego produktu **ald 4**; t.t.=164-166°C (lit. 163-164°C, [163]) R_f=0,5 (heksan:EtOAc, 1:3).

Synteza 3-bromo-4,5-dimetoksybenzaldehydu (aldehydu 5-bromoweratrowego)

(ald 5) [164]

Do kolby dwuszyjnej o pojemności 500 ml umieszczonej na mieszadle magnetycznym i zaopatrzonej we wkraplacz wprowadzono (15,02 g, 65,00 mmoli) **ald 4**, 150 ml bezwodnego DMF oraz (13,62 g, 98,50 mmoli) bezwodnego K₂CO₃. Następnie intensywnie mieszając medium reakcyjne wkraplano w czasie 1 godziny (11,07 g, 78,00 mmoli) jodku metylu. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem (1500 ml) a uzyskany osad odsączono i wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymano (14,00 g, wyd. 88%) białego osadu **ald 5**; t.t.=62-64°C (lit. 61-62°C, [165]), R_f=0,65 (heksan:EtOAc, 1:3).

4.5.2. Synteza O-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów

Synteza O-(2-formylo-6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (ald 1a)

Do kolby trój szyjnej o pojemności 500 ml zaopatrzonej we wkraplacz i umieszczonej na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy wprowadzono rozpuszczony w 150 ml roztworu KOH (10,14 g, 180,74 mmoli) 2-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd (o-wanilinę) **ald 1** (25,00 g, 164,31 mmoli) a następnie schłodzono mieszaninę do temperatury 0-5°C. Do wkraplacza wprowadzono (20,31 g, 164,31 mmoli) chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73** rozpuszczonego w 50 ml bezwodnego THF. Wkraplanie prowadzono przez 30 minut kontrolując temperaturę reakcji aby nie przekroczyła 10°C. Zaobserwowano wytrącanie się produktu reakcji już po kilku minutach od momentu wkraplania chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73**. Po dodaniu całej jego ilości doprowadzono mieszaninę do temperatury pokojowej i mieszając prowadzono reakcję jeszcze przez 50 minut. Po zakończeniu reakcji uzyskaną zawiesinę wylano na wodę z lodem (1000 ml). Osad surowego produktu odsączono na lejku ze spiekim szklanym i przekryształizowano z 100 ml metanolu z dodatkiem węgla aktywnego. Otrzymano (27,56 g, wyd. 70%) białego krystalicznego osadu **ald 1a**; t.t.=118-120°C (lit. 113,5-114,5°C, [166]) $R_f=0,24$ (heksan:EtOAc, 1:1).

O-(2-formylo-6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian ($C_{11}H_{13}NO_3S$, m.cz. **239,2908**) (**ald 1a**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 10.08 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.32 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.42 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 188.72, 187.13, 151.98, 145.01, 130.25, 126.66, 119.88, 117.77, 56.33, 43.49, 38.89.

Synteza O-(5-formylo-2-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (ald 2a)

Do kolby trój szyjnej o pojemności 500 ml zaopatrzonej we wkraplacz i umieszczonej na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy wprowadzono rozpuszczony w 150 ml roztworu KOH (10,14 g, 180,74 mmoli) 3-hydroksy-4-metoksybenzaldehyd (izowanilinę) **ald 2** (25,00 g, 164,31 mmoli) a następnie schłodzono mieszaninę do temperatury 0-5°C. Do wkraplacza wprowadzono (20,31 g, 164,31 mmoli) chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73** rozpuszczonego w 50 ml bezwodnego THF. Wkraplanie prowadzono przez 30 minut kontrolując temperaturę reakcji aby nie przekroczyła 10°C. Zaobserwowano wytrącanie

się produktu reakcji już po kilku minutach od momentu wkraplania chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73**. Po dodaniu całej jego ilości doprowadzono mieszaninę do temperatury pokojowej i mieszając prowadzono reakcję jeszcze przez 30 minut. Po zakończeniu reakcji otrzymaną zawiesinę wylano na wodę z lodem (1000 ml). Otrzymany surowy produkt odsączono na lejku ze spiekem szklanym i przekrystalizowano z 200 ml metanolu z dodatkiem węgla aktywnego. Otrzymano (31,46 g, wyd. 80%) białego krystalicznego osadu **ald 2a**; t.t=114-115°C, R_f=0,28 (heksan:EtOAc, 1:1).

O-(5-formylo-2-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian (C₁₁H₁₃NO₃S, m.cz. 239,2908) (ald 2a). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 9.87 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.07 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 3.35 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 190.04, 187.11, 156.74, 143.15, 129.77, 129.70, 124.82, 112.14, 56.20, 43.39, 38.73.

Synteza O-(4-formylo-2-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (ald 3a)

Do kolby trój szyjnej o pojemności 500 ml zaopatrzonej we wkraplacz i umieszczonej na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy wprowadzono rozpuszczony w 150 ml roztworu KOH (10,14 g, 180,74 mmoli) 4-hydrokso-3-metoksybenzaldehyd (wanilinę) **ald 3** (25,00 g, 164,31 mmoli) a następnie schłodzono mieszaninę do temperatury 0-5°C. Do wkraplacza wprowadzono (20,31 g, 164,31 mmoli) chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73** rozpuszczonego w 50 ml bezwodnego THF. Wkraplanie prowadzono przez 30 minut kontrolując temperaturę reakcji aby nie przekroczyła 10°C. Zaobserwowano wytrącanie się produktu reakcji już po kilku minutach od momentu wkraplania chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73**. Po dodaniu całej jego ilości doprowadzono mieszaninę do temperatury pokojowej i mieszając prowadzono reakcję jeszcze przez 30 minut. Po zakończeniu reakcji uzyskaną zawiesinę wylano na wodę z lodem (1000 ml). Otrzymany surowy produkt odsączono na lejku ze spiekem szklanym i przekrystalizowano z 200 ml metanolu z dodatkiem węgla aktywnego. Otrzymano (28,00 g, wyd. 65%) białego krystalicznego osadu **ald 3a**; t.t=122-124°C (lit. 109-112°C, [167]), R_f=0,53 (heksan:EtOAc, 1:1).

O-(4-formylo-2-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian (C₁₁H₁₃NO₃S, m.cz. 239,2908) (ald 3a). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 9.95 (s, 1H), 7.52 – 7.47 (m,

2H), 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 3.37 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 191.05, 186.78, 152.43, 147.76, 135.07, 124.68, 124.52, 110.98, 56.12, 43.36, 38.85.

Synteza O-(4-formylo-2-bromo-6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (ald 4a)

Do kolby trójszyjnej o pojemności 500 ml zaopatrzonej we wkraplacz i umieszczonej na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy wprowadzono rozpuszczony w 200 ml roztworu KOH (9,32 g, 166,64 mmoli) bromopochodnej benzaldehydu **ald 4** (35,00 g, 151,49 mmoli) a następnie schłodzono mieszaninę do temperatury 0-5°C. Do wkraplacza wprowadzono (18,72 g, 151,49 mmoli) chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73** rozpuszczonego w 50 ml bezwodnego THF. Wkraplanie prowadzono przez 30 minut kontrolując temperaturę reakcji aby nie przekroczyła 10°C. Zaobserwowano wytrącanie się produktu reakcji już po kilku minutach od momentu wkraplania chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73**. Po dodaniu całej jego ilości doprowadzono mieszaninę do temperatury pokojowej i mieszając prowadzono reakcję jeszcze przez 60 minut. Po zakończeniu reakcji uzyskaną zawiesinę wylano na wodę z lodem (3000 ml). Otrzymany surowy produkt odsączono na lejku ze spiekem szklanym i przekryształizowano z 200 ml metanolu z dodatkiem węgla aktywnego. Otrzymano (30,50 g, wyd. 63%) białego krystalicznego osadu **ald 4a**; t.t.=163-164°C, $R_f=0,52$ (heksan:EtOAc, 1:1).

O-(4-formylo-2-bromo-6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian

($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrNO}_3\text{S}$, m.cz. 318,1869) (ald 4a). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 9.90 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.41 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 189.85, 184.93, 153.98, 145.57, 135.10, 127.84, 119.26, 110.14, 56.60, 43.58, 39.04.

Synteza O-(4-formylo-2,6-dimetoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (ald 5a)

Do kolby trójszyjnej o pojemności 500 ml zaopatrzonej we wkraplacz i umieszczonej na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy wprowadzono rozpuszczony w 300 ml r-ru KOH (16,94 g, 301,91 mmoli) 4-hydroksy-3,5-dimetoksybenzaldehyd **ald 5** (50,00 g, 274,50 mmoli) a następnie schłodzono mieszaninę do temperatury 0-5°C. Do wkraplacza wprowadzono (33,93 g, 274,50 mmoli) chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73** rozpuszczonego w 70 ml

bezwodnego THF. Wkraplanie prowadzono przez 30 minut kontrolując temperaturę reakcji aby nie przekroczyła 10°C. Zaobserwowano wytrącanie się produktu reakcji już po kilku minutach od momentu wkrapiania chlorku N,N-dimetylotiokarbamoilowego **73**. Po dodaniu całej jego ilości doprowadzono mieszaninę do temperatury pokojowej i mieszając prowadzono reakcję jeszcze przez 60 minut. Po zakończeniu reakcji uzyskaną zawiesinę produktu odsączono na lejku ze spiekem szklanym, przemyto wodą i wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymano (69,59 g, wyd. 94%) beżowego krystalicznego osadu **ald 5a**; t.t.=177-179°C (lit. 173-176°C, [168]), $R_f=0,54$ (heksan:EtOAc, 1:1).

O-(4-formylo-2,6-dimetoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian ($C_{12}H_{15}NO_4S$, m.cz. 269,3168) (**ald 5a**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 10.00 (s, 1H), 7.26 (s, 2H), 4.00 (s, 6H), 3.55 (s, 3H), 3.46 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 191.10, 186.64, 153.35, 136.89, 134.19, 106.32, 56.53, 43.55, 38.89.

4.5.3. Synteza S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów

Synteza S-(2-formylo-6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (**ald 1b**)

Reakcję przeprowadzono w czterech rzutach każdorazowo wychodząc z tej samej ilości substratów.

Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml wprowadzono (6,00 g, 25,07 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 1a** i (112,81 g, 662,76 mmoli) eteru difenyłowego. Następnie umieszczono kolbę na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy w łaźni olejowej rozgrzanej do 250°C i utrzymując stałą temperaturę (kontrola temperatury wewnątrz kolby reakcyjnej, 240°C), ciągle mieszając prowadzono reakcję przez 30 minut w atmosferze azotu. W czasie trwania reakcji początkowo bezbarwny roztwór ciemniał uzyskując ostatecznie barwę brunatną. Łącznie w reakcjach wykorzystano (24,00 g, 100,28 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 1a** oraz (451,24 g, 2651,04 mmoli) eteru difenyłowego. Po zakończeniu reakcji poszczególne partie połączono i oddestylowano eter do około 1/10 objętości pod pompą olejową w temperaturze 94-96°C i ciśnieniu 1,5 mm Hg. Otrzymany osad odsączono na sączku ze spiekem szklanym, przemyto heksanem i wysuszono. Następnie przekryształizowano z 30 ml eteru diizopropylowego z dodatkiem węgla aktywnego. Otrzymano (14,19 g, wyd. 59%) jasnobrązowego krystalicznego osadu **ald 1b**; t.t.=89-90°C (lit. 83-83,5°C, [166]), $R_f=0,23$ (heksan:EtOAc, 1:1).

S-(2-formylo-6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian ($C_{11}H_{13}NO_3S$, m.cz. **239,2908**) (**ald 1b**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 10.45 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.01 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 191.66, 164.74, 160.11, 139.13, 131.06, 120.68, 120.51, 116.22, 56.55, 37.20.

Synteza S-(5-formylo-2-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (**ald 2b**)

Reakcję przeprowadzono w dwóch rzutach każdorazowo wychodząc z tej samej ilości substratów.

Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml wprowadzono (14,67 g, 61,30 mmoli)

O-tiokarbaminianu **ald 2a** i (260,00 g, 1527,52 mmoli) eteru difenyłowego. Następnie umieszczono kolbę na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy w łaźni olejowej rozgrzanej do $250^\circ C$ i utrzymując stałą temperaturę (kontrola temperatury wewnątrz kolby reakcyjnej, $240^\circ C$), ciągle mieszając prowadzono reakcję przez 120 minut w atmosferze azotu. W czasie trwania reakcji początkowo bezbarwny roztwór ciemniał uzyskując ostatecznie barwę brunatną. Łącznie w reakcjach wykorzystano (29,34 g, 122,60 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 2a** oraz (520,00 g, 3055,04 mmoli) eteru difenyłowego. Po zakończeniu reakcji poszczególne partie połączono i oddestylowano eter do około 1/10 objętości pod pompą olejową w temperaturze $94-96^\circ C$ i ciśnieniu 1,5 mm Hg. Otrzymany osad odsączono na sączku ze spiekim szklanym i przekrystalizowano z 100 ml mieszaniny heksanu z octanem etylu w stosunku 1:1. Otrzymano (19,90 g, wyd. 54%) beżowego krystalicznego osadu **ald 2b**; t.t.= $126-128^\circ C$, $R_f=0,15$ (heksan:EtOAc, 1:1).

S-(5-formylo-2-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian ($C_{11}H_{13}NO_3S$, m.cz. **239,2908**) (**ald 2b**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 9.86 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.94 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 3.00 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 190.04, 165.33, 164.75, 140.19, 133.13, 129.92, 118.31, 111.43, 56.50, 36.97.

Synteza S-(4-formylo-2-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (**ald 3b**)

Reakcję przeprowadzono w dwóch rzutach każdorazowo wychodząc z tej samej ilości substratów.

Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml wprowadzono (11,5 g, 48,05 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 3a** i (200 g, 1175,02 mmoli) eteru difenyłowego. Następnie umieszczono kolbę na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy w łaźni olejowej rozgrzanej do 250°C i utrzymując stałą temperaturę (kontrola temperatury wewnątrz kolby reakcyjnej, 240°C), ciągle mieszając prowadzono reakcję przez 45 minut w atmosferze azotu. W czasie trwania reakcji początkowo bezbarwny roztwór ciemniał uzyskując ostatecznie barwę brunatną. Łącznie w reakcjach wykorzystano (23 g, 96,1 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 3a** oraz (400 g, 2350,04 mmoli) eteru difenyłowego. Po zakończeniu reakcji poszczególne partie połączono i oddestylowano eter do około 1/10 objętości pod pompą olejową w temperaturze 94-96°C i ciśnieniu 1,5 mm Hg. Otrzymany osad odsączono na sączku ze spiekim szklanym, przemyto heksanem i wysuszono. Otrzymano (19,87 g, wyd. 86%) beżowego krystalicznego osadu **ald 3b**; t.t.=108-110°C (lit. 106-109°C, [167]), $R_f=0,28$ (heksan:EtOAc, 1:1).

S-(4-formylo-2-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian ($C_{11}H_{13}NO_3S$, m.cz. **239,2908**) (**ald 3b**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 9.81 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.31 – 7.22 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.84 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 191.56, 164.87, 160.14, 138.44, 138.01, 125.03, 123.59, 109.48, 56.30, 37.02.

Synteza S-(4-formylo-2-bromo-6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (ald 4b)

Reakcję przeprowadzono w czterech rzutach każdorazowo wychodząc z tej samej ilości substratów.

Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml wprowadzono (6,00 g, 18,86 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 4a** i (112,81 g, 662,76 mmoli) eteru difenyłowego. Następnie umieszczono kolbę na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy w łaźni olejowej rozgrzanej do 250°C i utrzymując stałą temperaturę (kontrola temperatury wewnątrz kolby reakcyjnej, 240°C), ciągle mieszając prowadzono reakcję przez 15 minut w atmosferze azotu. W czasie trwania reakcji początkowo bezbarwny roztwór ciemniał uzyskując ostatecznie barwę brunatną. Łącznie w reakcjach wykorzystano (24,00 g, 75,44 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 4a** oraz (451,24 g, 2651,04 mmoli) eteru difenyłowego. Po zakończeniu reakcji

poszczególne partie połączono i oddestylowano eter do około 1/10 objętości pod pompą olejową w temperaturze 94-96°C i ciśnieniu 1,5 mm Hg. Otrzymany osad odsączono na sączku ze spiekem szklanym i przekrystalizowano z 100 ml mieszaniny heksanu z octanem etylu w stosunku 1:1. Otrzymano (22,69 g, wyd. 94%) beżowego krystalicznego osadu **ald 4b**; t.t.=170-173°C, $R_f=0,19$ (heksan:EtOAc, 1:1).

S-(4-formylo-2-bromo-6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian

($C_{11}H_{12}BrNO_3S$, m.cz. 318,1869) (**ald 4b**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 9.92 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 3.01 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 190.24, 163.53, 161.90, 138.57, 133.16, 127.66, 126.73, 108.60, 56.85, 37.26, 36.99.

Synteza S-(4-formylo-2,6-dimetoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminianu (ald 5b)

Reakcję przeprowadzono w sześciu rzutach.

I - pięć partii.

Do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml wprowadzono (13,00 g, 48,27 mmoli)

O-tiokarbaminianu **ald 5a** i (231,77 g, 1361,67 mmoli) eteru difenyłowego. Następnie umieszczono kolbę na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy w łaźni olejowej rozgrzanej do 250°C i utrzymując stałą temperaturę (kontrola temperatury wewnątrz kolby reakcyjnej, 240°C), ciągle mieszając prowadzono reakcję przez 15 minut w atmosferze azotu. W czasie trwania reakcji początkowo bezbarwny roztwór ciemniał uzyskując ostatecznie barwę brunatną.

II - jedna partia.

Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml wprowadzono (4,59 g, 17,04 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 5a** i (76,50 g, 449,44 mmoli) eteru difenyłowego. Następnie umieszczono kolbę na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy w łaźni olejowej rozgrzanej do 250°C i utrzymując stałą temperaturę (kontrola temperatury wewnątrz kolby reakcyjnej, 240°C), ciągle mieszając prowadzono reakcję przez 15 minut w atmosferze azotu. W czasie trwania reakcji początkowo bezbarwny roztwór ciemniał uzyskując ostatecznie barwę brunatną.

Łącznie w reakcjach wykorzystano (69,59 g, 258,40 mmoli) O-tiokarbaminianu **ald 5a** oraz (1235,35 g, 7257,79 mmoli) eteru difenyłowego. Po zakończeniu reakcji poszczególne partie połączono i oddestylowano eter do około 1/10 objętości pod pompą

olejową w temperaturze 94-96°C i ciśnieniu 1,5 mm Hg. Otrzymany osad odsączono na sączku ze spiekem szklanym i przekryształizowano z 500 ml THF. Otrzymano (57,42 g, wyd. 82%) białego krystalicznego osadu **ald 5b**; t.t.=191-194°C (lit. 183-186°C, [Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.168]), $R_f=0,17$ (heksan:EtOAc, 1:1).

S-(4-formylo-2,6-metoksyfenylo)-N,N-dimetylotiokarbaminian (C₁₂H₁₅NO₄S, m.cz. 269,3168) (ald 5b). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 9.96 (s, 1H), 7.11 (s, 2H), 3.93 (s, 6H), 3.18 (s, 3H), 2.99 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 191.52, 164.48, 161.68, 138.63, 112.58, 104.89, 56.62, 37.29, 36.95.

4.5.4. Synteza cyklicznych acetai (1,3-dioksolanów) wybranych S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów

Synteza S-[2-bromo-4-(1,3-dioksolano-2-ylo)-6-metoksyfenylo]-N,N-dimetylotiokarbaminianu (ald4bzab)

Do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml zaopatrzonej w aparat Deana-Starka, chłodnicę zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ umieszczoną na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy wprowadzono (14,99 g, 47,10 mmoli) S-tiokarbaminianu **ald4b**, (0,084 g, 0,40 mmoli) dihydratu kwasu p-toluenosulfonowego, (6,52 g, 105,00 mmoli) glikolu etylenowego **74** oraz 65 ml bezwodnego toluenu. Kolbę reakcyjną umieszczono w łaźni olejowej i reakcję prowadzono w temperaturze 145°C przez 2,5 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono i wytrząsano ze 70 ml 0,1M roztworu NaOH i 70 ml solanki. Fazę organiczną osuszono następnie bezwodnym MgSO₄, przesączono a toluen odparowano na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano (13,20 g, wyd. 77%) kremowego krystalicznego osadu **ald4bzab**; t.t.=106-107°C, $R_f=0,47$ (heksan:EtOAc, 1:3).

S-[2-bromo-4-(1,3-dioksolano-2-ylo)-6-metoksyfenylo]-N,N-dimetylotiokarbaminian (C₁₃H₁₆BrNO₄S, m.cz. 362,2394) (ald 4bzab). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.43 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.09 – 4.05 (m, 2H), 4.04 – 4.00 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.16 (s, 3H), 3.01 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 162.20, 159.21, 140.22, 130.32, 120.90, 117.26, 105.96, 99.92, 62.87, 54.37.

Synteza S-[4-(1,3-dioksolano-2-ylo)-2,6-dimetoksyfenylo]-N,N-dimetylotiokarbaminian (ald 5bzb)

Do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml zaopatrzonej w aparat Deana-Starka, chłodnicę zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym chlorkiem wapnia umieszczoną na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy wprowadzono (60,00 g, 222,80 mmoli) S-tiokarbaminianu **ald5b**, (0,34 g, 1,61 mmoli) dihydratu kwasu p-toluenosulfonowego, (30,73 g, 495,10 mmoli) glikolu etylenowego **74** oraz 310 ml bezwodnego toluenu. Kolbę reakcyjną umieszczono w łaźni olejowej i reakcję prowadzono w temperaturze 145°C przez 2,5 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono i wytrząsano ze 150 ml 0,1M roztworu NaOH i 150 ml solanki. Fazę organiczną osuszono następnie bezwodnym MgSO₄, przesączono a toluen odparowano na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano (65,80 g, wyd. 94%) kremowego krystalicznego osadu **ald5bzb**; t.t.= 121-123°C, R_f=0,24 (heksan:EtOAc, 1:3).

S-[4-(1,3-dioksolano-2-ylo)-2,6-dimetoksyfenylo]-N,N-dimetylotiokarbaminian (C₁₄H₁₉NO₅S, m.cz. 313,3694) (ald 5bzb). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 6.75 (s, 2H), 5.86 (s, 1H), 4.12 – 4.07 (m, 2H), 4.07 – 4.01 (m, 2H), 3.88 (s, 6H), 3.17 (s, 3H), 2.99 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 165.45, 161.30, 142.10, 105.36, 103.11, 102.10, 65.11, 56.44.

4.5.5. Synteza metylotiobenzaldehydów

Synteza 2-merkapto-3-metoksybenzaldehydu (ald 1c)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 100 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono (10 g, 41,79 mmoli) pochodnej S-tiokarbaminianowej **ald 1b** oraz 37,3 ml 10% metanolowego roztworu KOH (2,95 g, 52,50 mmoli), co stanowi 25% nadmiar molowy KOH w stosunku do **ald 1b**. Układ ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy, z wykorzystaniem łaźni olejowej w temperaturze 80°C, w atmosferze azotu przez 2 godziny. Zaobserwowano stopniową zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z jasnożółtej na pomarańczową. Następnie dodano około 10 ml wody destylowanej po czym doprowadzono do pH kwasowego za pomocą 5% roztworu kwasu solnego obserwując wyraźne zmętnienie roztworu. Fazę wodną ekstrahowano trzema porcjami octanu etylu (3x20ml). Warstwy organiczne połączono i trzykrotnie ekstrahowano roztworem solanki (3x10ml) osuszono

bezwodnym MgSO_4 , a następnie odparowano na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując (5,44 g, wyd. 77%) produktu **ald 1c** w postaci żółtego oleju, który skryształizował po ochłodzeniu; t.t.=55-57°C (lit. 41-42°C, [166]), $R_f=0,45$ (heksan:EtOAc, 10:4).

Synteza 3-metoksy-2-metylotiobenzaldehydu (**ald 1d**)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 100 ml umieszczono (5,32 g, 31,50 mmol) merkaptobenzaldehydu **ald 1c** oraz 80ml bezwodnego DMF ciągle mieszając na mieszadle magnetycznym w celu rozpuszczenia substratu. Następnie dodano bezwodny K_2CO_3 (6,54 g, 47,30 mmol). Do kolby podłączono wkraplacz do którego wprowadzono 2,4 ml jodku metylu (5,37 g, 37,86 mmol) co stanowi 20% nadmiar molowy w stosunku do **ald 1b**. Rozpoczęto powolne dodawanie reagenta w tempie 1kropla/s i zaobserwowano zmianę zabarwienia roztworu z pomarańczowego na żółty. Reakcję pozostawiono w temperaturze pokojowej na 22 godziny ciągle mieszając. Po zakończeniu reakcji zawiesinę wylano na 200 ml wody z lodem. Wytrącony osad surowego produktu odsączono, przemyto wodą oraz przekryształizowano z 25 ml 2-propanolu otrzymując (3,10 g, wyd. 58%) aldehydu **ald 1d**; t.t.=57-59°C (lit. 55,5-56,5°C, [169]), $R_f=0,68$ (heksan:EtOAc, 1:1).

3-metoksy-2-metylotiobenzaldehyd ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}$, m.cz. 182,24) (**ald 1d**). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 10.79 (s, 1H, C1-CHO), 7.52 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, C6-H), 7.40 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, C5-H), 7.12 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, C4-H), 3.97 (s, 3H, C3-OCH₃), 2.42 (s, 3H, C2-SCH₃). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 192.62 (C1-CHO), 160.36 (C3), 138.48 (C1), 129.33 (C5), 128.67 (C2), 120.20 (C6), 115.80 (C4), 56.23 (C3-OCH₃), 18.87 (C2-SCH₃). LRMS (EI) m/z 182 ($[\text{M}]^+$, 100%).

Synteza 4-metoksy-3-metylotiobenzaldehydu (**ald 2d**)

W kolbie dwuszyjnej o pojemności 250 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono (10,05 g, 42,00 mmoli) pochodnej S-tiokarbaminianowej **ald 2b** oraz 37,3 ml 10% metanolowego roztworu KOH (2,95 g, 52,50 mmoli), co stanowi 25% nadmiar molowy KOH w stosunku do **ald 2b**. Układ ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy, z wykorzystaniem łaźni olejowej w temperaturze 80°C, w atmosferze azotu przez 2,5 godziny. Zaobserwowano stopniową zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z jasnożółtej na intensywnie żółtą. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej do kolby podłączono

wkraplacz do którego wprowadzono 3,2 ml jodku metylu (7,17 g, 50,48 mmol) co stanowi 20% nadmiar molowy w stosunku do **ald 2b**. Rozpoczęto powolne dodawanie reagenta w tempie 1 kropla/s i zaobserwowano stopniowe odbarwienie roztworu. Reakcję pozostawiono w temperaturze pokojowej na 20 godzinę ciągle mieszając. Mieszaninę reakcyjną wylano następnie na 200 ml wody z lodem. Wytrącony osad surowego produktu odsączono, przemyto wodą i wysuszono. Przekrystalizowano z 100 ml heksanu otrzymując (7,25 g, wyd. 95%) aldehydu **ald 2d**; t.t.=47-49°C (lit. 38-39°C, [169], $R_f=0,61$ (heksan:EtOAc, 1:1)).

4-metoksy-3-metylotiobenzaldehyd (C₉H₁₀O₂S, m.cz. 182,24) (ald 2d). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 9.87 (s, 1H, C1-CHO), 7.66 (s, 1H, C2-H), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C6-H), 6.93 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, C5-H), 3.98 (s, 3H, C4-OCH₃), 2.49 (s, 3H, C3-SCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 190.58 (C1-CHO), 160.66 (C4), 130.27 (C1), 129.84 (C6), 129.43 (C3), 124.98 (C2), 109.35 (C5), 56.21 (C4-OCH₃), 14.23 (C3-SCH₃). LRMS (EI) m/z 182 ([M]⁺, 100%).

Synteza 3-metoksy-4-metylotiobenzaldehydu (ald 3d)

W kolbie dwuszyjnej o pojemności 250 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono (10,00 g, 41,79 mmoli) pochodnej S-tiokarbaminianowej **ald 3b** oraz 37,3 ml 10% metanolowego roztworu KOH (2,95 g, 52,50 mmoli), co stanowi 25% nadmiar molowy KOH w stosunku do **ald 3b**. Układ ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy, z wykorzystaniem łaźni olejowej w temperaturze 80°C, w atmosferze azotu przez 2,5 godziny. Zaobserwowano stopniową zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z jasnożółtej na jasnobrażową. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej do kolby podłączono wkraplacz do którego wprowadzono 3,2 ml jodku metylu (7,17 g, 50,48 mmol) co stanowi 20% nadmiar molowy w stosunku do **ald 3b**. Rozpoczęto powolne dodawanie reagenta w tempie 1 kropla/s i zaobserwowano stopniowe odbarwienie roztworu. Reakcję pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny ciągle mieszając. Mieszaninę reakcyjną wylano następnie na 200 ml wody z lodem. Wytrącony osad produktu odsączono, przemyto wodą i wysuszono. Otrzymano (7,50 g, wyd. 98%) aldehydu **ald 3d**; t.t.=44-46°C (lit. 41-43°C, [167]), $R_f=0,66$ (heksan:EtOAc, 1:1).

3-metoksy-4-metylotiobenzaldehyd (C₉H₁₀O₂S, m.cz. 182,24) (ald 3d). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 9.90 (s, 1H, C1-CHO), 7.44 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, C6-H),

7.31 (s, 1H, C2-**H**), 7.21 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, C5-**H**), 3.96 (s, 3H, C3-OCH₃), 2.48 (s, 3H, C4-SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 191.29 (C1-CHO), 155.87 (C3), 137.39 (C1), 133.83 (C4), 125.24 (C2), 123.70 (C6), 107.12 (C5), 56.02 (C3-OCH₃), 13.98 (C4-SCH₃). LRMS (EI) m/z 182 ([M]⁺, 100%).

Synteza 3-bromo-5-metoksy-4-metylotiobenzaldehydu (ald 4d)

W kolbie dwuszyjnej o pojemności 250 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono (12,00 g, 33,10 mmoli) pochodnej S-tiokarbaminianowej **ald 4bzb** oraz 120 ml 10% metanolowego roztworu KOH (9,49 g, 169,13 mmoli). Układ ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy, z wykorzystaniem łaźni olejowej w temperaturze 80°C, w atmosferze azotu przez 3 godziny. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej do kolby podłączono wkraplacz do którego wprowadzono 4,8 ml siarczanu dimetylu (6,37 g, 49,65 mmoli) co stanowi 50% nadmiar molowy w stosunku do **ald 4bzb**. Rozpoczęto powolne dodawanie reagenta w tempie 1 kropla/s. Po dodaniu całej ilości siarczanu dimetylu mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury 55°C. Reakcję prowadzono w tej temperaturze przez 1 godzinę po czym zakwaszono do pH około 3-4 (zmętnienie roztworu) i dalej prowadzono jeszcze przez 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną wylano następnie na 500 ml wody z lodem. Wytrącony osad produktu odsączono, przemyto wodą i wysuszono. Otrzymano (5,10 g, wyd. 50%) aldehydu **ald 4d**; t.t.=65-66°C, R_f=0,65 (heksan:EtOAc, 1:1).

5-bromo-3-metoksy-4-metylotiobenzaldehyd (C₉H₉BrO₂S, m.cz. 261,14) (ald 4d).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 9.88 (s, 1H, C1-CHO), 7.69 (s, 1H, C6-**H**), 7.31 (s, 1H, C2-**H**), 3.97 (s, 3H, C3-OCH₃), 2.50 (s, 3H, C4-SCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 190.08 (C1-CHO), 160.85 (C3), 136.64 (C5), 134.20 (C1), 129.27 (C4), 128.06 (C6), 107.96 (C2), 56.47 (C3-OCH₃), 18.14 (C4-SCH₃). LRMS (EI) m/z 260 ([M]⁺, 92%), 262 (100%)

Synteza 3,5-dimetoksy-4-metylotiobenzaldehydu (ald 5d)

W kolbie dwuszyjnej o pojemności 500 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono (65,70 g, 209,70 mmoli) pochodnej S-tiokarbaminianowej **ald 5bzb** oraz 186 ml 10% metanolowego roztworu KOH (14,71 g, 262,13 mmoli). Układ ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy, z wykorzystaniem łaźni olejowej w temperaturze 80°C, w atmosferze azotu przez 7

godzin. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej do kolby podłączono wkraplacz do którego wprowadzono 29,8 ml siarczanu dimetylu (39,68 g, 314,55 mmoli) co stanowi 50% nadmiar molowy w stosunku do **ald 5bzab**. Rozpoczęto powolne dodawanie reagenta w tempie 1kropla/s. Po dodaniu całej ilości siarczanu dimetylu mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury 55°C. Reakcję prowadzono w tej temperaturze przez 1 godzinę po czym zakwaszono do pH około 3-4 (zmętnienie roztworu) i dalej prowadzono jeszcze przez 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną wylano następnie na 500 ml wody z lodem. Wytrącony osad produktu odsączono, przemyto wodą i wysuszono. Otrzymano (21,50 g, wyd. 48%) aldehydu **ald 5d**; t.t.=50-52°C (lit. 55-56°C, [168]), $R_f=0,58$ (heksan:EtOAc, 1:1).

3,5-dimetoksy-4-metylotiobenzaldehyd (C₁₀H₁₂O₃S, m.cz. 212,27) (ald 5d). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 9.91 (s, 1H, C1-CHO), 7.05 (s, 2H, C2-H, C6-H), 3.96 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 2.45 (s, 3H, C4-SCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 191.32 (C1-CHO), 160.39 (C3, C5), 136.26 (C1), 120.76 (C4), 104.71 (C2, C6), 56.33 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 17.46 (C4-SCH₃). LRMS (EI) m/z 212 ([M]⁺, 100%).

4.5.6. Synteza pochodnych kwasu α-fenylocynamonowego (Kom-C)

Synteza kwasu (E)-3-(3-metoksy-2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-prop-2-enowego (Kom-C4)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono (0,71 g, 3,1 mmoli) kwasu 3,4,5-trimetoksyfenylooctowego **44**, (0,56 g, 3,1 mmoli) metylofio pochodnej benzaldehydu **ald 1d**, 2 ml bezwodnika kwasu octowego oraz 2 ml trietyloaminy (1,45 g, 14,33 mmoli). Układ ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy, z wykorzystaniem łaźni olejowej w temperaturze 115°C, w atmosferze azotu przez 3 godziny. W trakcie trwania reakcji mieszanina reakcyjna zmieniła zabarwienie na ciemnobrązowy. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano 30 ml 5% roztworu kwasu solnego a wytrącony osad odsączono na lejku ze szkła spiekanego, przemyto wodą oraz rozpuszczono w 50 ml 10% roztworu NaOH w temperaturze 40°C. Uzyskany roztwór ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone warstwy organiczne odrzucono a warstwę wodną zakwaszono 5% roztworem kwasu solnego. Uzyskany osad surowego produktu odsączono, przemyto wodą i przekryształizowano z

40 ml mieszaniny izopropanolu. Otrzymano (0,40 g, wyd. 33%) jasnożółtego krystalicznego produktu **Kom-C4**; t.t.=178-180°C, $R_f=0,44$ (CHCl₃:MeOH, 10:1).

Kwas (E)-3-(3-metoksy-2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)prop-2-enowy (C₂₀H₂₂O₆S, m.cz. 390,45) (Kom-C4). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 8.46 (s, 1H, C_{vin}'-H), 6.99 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, C₅'-H), 6.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, C₆'-H), 6.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C₄'-H), 6.38 (s, 2H, C₂-H, C₆-H), 3.91 (s, 3H, C₄-OCH₃), 3.83 (s, 3H, C₃'-OCH₃), 3.69 (s, 6H, C₃-OCH₃, C₅-OCH₃), 2.42 (s, 3H, C₂'-SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 172.36 (COOH), 159.75 (C₃'), 152.95 (C₃, C₅), 141.97 (C_{vin}'), 139.48 (C₄), 137.71 (C₁'), 132.30 (C_{vin}), 129.88 (C₂'), 128.52 (C₅'), 125.12 (C₁), 122.56 (C₆'), 110.82 (C₄'), 107.52 (C₂, C₆), 60.87 (C₄-OCH₃), 56.04 (C₃-OCH₃, C₅-OCH₃), 55.93 (C₃'-OCH₃), 18.41 (C₂'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3068 (ν=C_{Ar}-H), 2958 (ν_{as} CH₃), 2932 (bs ν O-H), 2851 (ν_s CH₃), 2832 (ν O-CH₃), 1682 (ν C=O), 1578 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1506 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1454 (δ_{as} CH₃), 1407 (δ_s CH₃), 1265 (ν C-O), 1237 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1125 (ν C-O-C), 1065 (ν_s C_{Ar}-O-C), 967 (γ^{oop}=C_{vin}-H), 795 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 741 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 724 (γ^{oop}=C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 390,1 ([M]⁺, 58,5%), 325,1 (100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₂₀H₂₂O₆S: 390,11316. Znaleziono: 390,11490.

Synteza kwasu (E)-2-(2-metylotiofenylo)-3-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-prop-2-enowego (Kom-C6)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono (1,15 g, 4,40 mmoli) kwasu 3,4,5-trimetoksyfenylooctowego **44**, (0,67 g, 4,40 mmoli) 2-metylotiobenzaldehydu **75**, 2 ml bezwodnika kwasu octowego oraz 2 ml trietyloaminy (1,45 g, 14,33 mmoli). Układ ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy, z wykorzystaniem łaźni olejowej w temperaturze 115°C, w atmosferze azotu przez 5 godziny. W trakcie trwania reakcji mieszanina reakcyjna zmieniła zabarwienie na ciemnobrązowy. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano kroplami 3 ml stężonego kwasu solnego a wytrącony osad odsączono na lejku ze szkła spiekanego, przemyto 80% etanolem i przekryształizowano z 40 ml mieszaniny izopropanolu i wody w stosunku 1:1. Otrzymano (0,43 g, wyd. 26%) jasnożółtego krystalicznego produktu **Kom-C6**; t.t.=190-192°C, $R_f=0,43$ (CHCl₃:MeOH, 10:1).

Kwas (E)-3-(2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)prop-2-enowy ($C_{19}H_{20}O_5S$, m.cz. 360,42) (**Kom-C6**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 8.23 (s, 1H, Cvin'-**H**), 7.26 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, C3'-**H**), 7.20 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, C4'-**H**), 6.87 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, C5'-**H**), 6.79 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, C6'-**H**), 6.40 (s, 2H, C2-**H**, C6-**H**), 3.84 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.69 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 2.53 (s, 3H, C2'-SCH₃). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 172.22 (COOH), 153.02 (C3, C5), 140.00 (C2'), 139.45 (Cvin'), 137.81 (C4), 133.69 (Cvin), 132.83 (C1'), 129.89 (C3'), 129.78 (C1), 129.25 (C6'), 125.96 (C4'), 124.76 (C5'), 107.41 (C2, C6), 60.87 (C4-OCH₃), 56.04 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 16.32 (C2'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3062 ($\nu =C_{Ar}-H$), 2965 ($\nu_{as} CH_3$), 2924 (bs $\nu O-H$), 2829 ($\nu O-CH_3$), 1684 ($\nu C=O$), 1582 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1507 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1454 ($\delta_{as} CH_3$), 1409 ($\delta_s CH_3$), 1261 ($\nu C-O$), 1238 ($\nu_{as} C_{Ar}-O-C$), 1125 ($\nu C-O-C$), 1066 ($\nu_s C_{Ar}-O-C$), 898 ($\gamma^{oop} =C_{Ar}-H$), 834 ($\gamma^{oop} =C_{Ar}-H$), 740 ($\gamma^{oop} =C_{Ar}-H$). LRMS (EI) m/z 360,1 ($[M]^+$, 100%), 295,1 (93,3%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $C_{19}H_{20}O_5S$: 360,10260. Znaleziono: 360,10550.

4.5.7. Synteza pochodnych (Z)-stilbenu (Kom)

Synteza (Z)-1-(3-metoksy-2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenu (Kom4)

Do kolby okrągłodennej o pojemności 50 ml wprowadzono (0,31 g, 0,77 mmoli) pochodnej kwasu α -fenylocynamonowego **Kom-C4**, (0,41 g, 6,40 mmoli) miedzi oraz (3,18 g, 24 mmoli) chinoliny. Reakcję prowadzono w temperaturze 200°C w atmosferze azotu przez 2,5 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej oraz rozcieńczono 30 ml octanu etylu i odsączono miedź na lejku Büchnera, przemywając kolbkę i sączonek octanem etylu w celu minimalizacji strat. Warstwę organiczną przemyto 5% roztworem kwasu solnego (3x20ml). Fazy wodne połączono i przemyto trzema porcjami octanu etylu (3x10ml). Warstwy organiczne połączono i przemyto solanką (3x20ml), następnie osuszono bezwodnym $MgSO_4$ i odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując oleistą brunatną ciecz. Następnie przeprowadzono chromatografię kolumnową (heksan:EtOAc, 10:1). Uzyskano (0,11 g, wyd. 39%) białego osadu **Kom4**; t.t.=78-80°C, $R_f=0,67$ (heksan:EtOAc, 10:1).

(Z)-1-(3-metoksy-2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten ($C_{19}H_{22}O_4S$, m.cz. 346,44) (**Kom4**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 7.14 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H,

C5'-**H**), 6.90 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, C6'-**H**), 6.87 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, Cvin'-**H**), 6.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, C4'-**H**), 6.54 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H, Cvin-**H**), 6.37 (s, 2H, C2-**H**, C6-**H**), 3.92 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.80 (s, 3H, C3'-OCH₃), 3.60 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 2.36 (s, 3H, C2'-SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 160.01 (C3'), 152.63 (C3, C5), 142.98 (C4), 137.14 (C1'), 132.11 (C2'), 129.96 (Cvin), 129.41 (Cvin'), 128.68 (C5'), 123.45 (C1), 122.49 (C6'), 109.58 (C4'), 106.22 (C2, C6), 60.84 (C4-OCH₃), 55.95 (C3'-OCH₃), 55.71 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 18.17 (C2'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3117 (ν=C_{Ar}-H), 3055 (ν=C_{Ar}-H), 3010 (ν=C_{vin}-H), 2967 (ν_{as} CH₃), 2942 (ν CH₃), 2825 (ν O-CH₃), 1581 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1507 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1467 (δ_{as} CH₃), 1396 (δ_s CH₃), 1252 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1119 (ν C-O-C), 1064 (ν_s C_{Ar}-O-C), 964 (γ^{oop}=C_{vin}-H), 838 (γ^{oop}=C_{Ar}-H) 780 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 722 (γ^{oop}=C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 346,1 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₉H₂₀O₅S: 346,12333. Znaleziono: 346,12108.

Synteza (Z)-1-(2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)etenu (Kom6)

Do kolby okrągłodennej o pojemności 50 ml wprowadzono (0,30 g, 0,83 mmoli) pochodnej kwasu α-fenylocynamonowego **Kom-C6**, (0,45 g, 6,90 mmoli) miedzi oraz (3,26 g, 25,19 mmoli) chinoliny. Reakcję prowadzono w temperaturze 200°C w atmosferze azotu przez 2,5 godziny. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej oraz rozcieńczono 30 ml octanu etylu i odsączono miedź na lejku Büchnera, przemywając kolbkę i sącdek octanem etylu w celu minimalizacji strat. Warstwę organiczną przemyto 5% roztworem kwasu solnego (3x20ml). Fazy wodne połączono i przemyto trzema porcjami octanu etylu (3x10ml). Warstwy organiczne połączono i przemyto solanką (3x20ml), następnie osuszono bezwodnym MgSO₄ i odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując oleistą brunatną ciecz. Następnie przeprowadzono chromatografię kolumnową (heksan:EtOAc, 10:1). Uzyskano (0,10 g, wyd. 37%) białego osadu **Kom6**, t.t.=73-75°C, R_f=0,68 (heksan:EtOAc, 10:1).

(Z)-1-(2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten (3,4,5-trimetoksy-2'-metylotio-*cis*-stilben) (C₁₈H₂₀O₃S, m.cz. 316,41) (**Kom6**). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.26 – 7.18 (m, 3H, C3'-**H**, C4'-**H**, C6'-**H**), 7.08 – 7.02 (m, 1H, C5'-**H**), 6.64 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, Cvin'-**H**), 6.56 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, Cvin-**H**), 6.37 (s, 2H, C2-**H**, C6-**H**), 3.80 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.59 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 2.47 (s, 3H, C2'-SCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 152.66 (C3, C5), 137.68 (C2'),

137.27 (**C4**), 136.54 (**C1'**), 131.92 (**C1**), 131.29 (**C3'**), 129.48 (**Cvin**), 127.85 (**C6'**), 127.66 (**Cvin'**), 125.26 (**C4'**), 124.69 (**C5'**), 106.15 (**C2**, **C6**), 60.83 (C4-OCH₃), 55.70 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 15.61 (C2'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3076 (ν=C_{Ar}-H), 3056 (ν=C_{Ar}-H), 3010 (ν=C_{vin}-H), 2959 (ν_{as} CH₃), 2936 (ν CH₃), 2836 (ν O-CH₃), 1580 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1506 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1450 (δ_{as} CH₃), 1399 (δ_s CH₃), 1236 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1126 (ν C-O-C), 1013 (ν_s C_{Ar}-O-C), 961 (γ^{oop}=C_{vin}-H), 868 (γ^{oop}=C_{Ar}-H) 852 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 745 (γ^{oop}=C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 316,1 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₉H₂₀O₅S: 316,11277. Znaleziono: 316,11370.

4.5.8. Synteza oksazolowych pochodnych CA-4 (KomOx)

Synteza kwasu 4-toluenosulfinowego (**77**) [95]

W kolbie okrągłodennej o pojemności 500 ml umieszczono (21,38 g, 120 mmoli) soli sodowej kwasu 4-toluenosulfinowego **76** oraz 90 ml wody destylowanej. Układ ogrzewano w temperaturze 40°C intensywnie mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego do momentu rozpuszczenia substratu. Następnie do uzyskanego roztworu dodano 60 ml eteru t-butylo-metylowego. Podłączono wkraplacz i dodawano w tempie 1 kropla/s 11,1 ml (13,13 g, 360 mmoli) stężonego kwasu solnego intensywnie mieszając medium reakcyjne. Reakcję prowadzono około 10 minut. Warstwę wodną oddzielono od warstwy organicznej i ekstrahowano trzykrotnie eterem t-butylo-metylowym (3x30ml). Warstwy eterowe połączono i osuszono bezwodnym MgSO₄, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydzielony osad produktu przemyto heksanem, odsączono na lejku ze szkła spiekanego oraz wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymano (15,60 g, wyd. 83%) produktu w postaci białych kryształów **77**; t.t.=82-84°C, R_f=0,05 (heksan:EtOAc, 1:1).

Synteza pochodnych tosylometyloformamidu (TosMF)

Synteza N-[(tolueno-4-sulfonyl)-(3,4,5-trimetoksyfenyl)metylo] formamidu (TosMF1)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (4,60 g, 23,44 mmoli) 3,4,5-trimetoksybenzaldehydu **71**, (3,01 g, 19,29 mmoli) pochodnej sulfinowej **77**, (0,11 g, 0,47 mmoli) kwasu kamforosulfonowego oraz 10 ml (11,35 g, 252 mmoli) formamidu i ogrzewano w temperaturze 65°C intensywnie mieszając na mieszadle

magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy przez 20 godzin. Po około 30 minutach od początku reakcji zaczął wytrącać się osad produktu. Uzyskaną zawiesinę po ochłodzeniu do temperatury pokojowej odsączono na lejku ze szkła spiekanego i przemyto metanolem. Otrzymano (4,37 g, wyd. 59%) białego krystalicznego osadu **TosMF1**; t.t.=155-157°C, $R_f=0,32$ (heksan:EtOAc, 1:3).

N-[(tolueno-4-sulfonylo)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)metylo]formamid ($C_{18}H_{21}NO_6S$, m.cz. **379,43**) (**TosMF1**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 8.14 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.61 (s, 2H), 6.42 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 2.44 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 159.35, 153.44, 145.63, 136.48, 133.10, 130.18, 129.83, 129.34, 106.05, 70.53, 60.88, 56.20, 21.73.

Synteza N-[(tolueno-4-sulfonylo)-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)metylo]-formamidu (TosMF2)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (3,69 g, 17,4 mmoli) metylo-tiopocho-dnej benzaldehydu **ald 5d**, (2,99 g, 19,1 mmoli) pochodnej sulfinowej **77**, (0,1 g, 0,45 mmoli) kwasu kamforosulfonowego oraz 8,7 ml (9,85 g, 218,8 mmoli) formamidu i ogrzewano w temperaturze 65°C intensywnie mieszając na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy przez 20 godzin. Po około 30 minutach od początku reakcji zaczął wytrącać się osad produktu. Uzyskaną zawiesinę po ochłodzeniu do temperatury pokojowej odsączono na lejku ze szkła spiekanego i przemyto metanolem. Otrzymano (4,99 g, wyd. 72%) białego krystalicznego osadu **TosMF2**; t.t.=157-158°C, $R_f=0,35$ (heksan:EtOAc, 1:3).

N-[(tolueno-4-sulfonylo)-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)metylo]formamid ($C_{18}H_{21}NO_5S_2$, m.cz. **395,49**) (**TosMF2**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 8.16 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.58 (s, 2H), 6.38 (s, 1H), 6.28 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 3.84 (s, 6H), 2.44 (s, 3H), 2.36 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 160.47, 159.65, 145.81, 132.97, 130.90, 129.90, 129.40, 114.61, 104.73, 70.76, 56.31, 21.76, 17.62.

Synteza N-[(tolueno-4-sulfonylo)-(3-bromo-4,5-dimetoksyfenylo)metylo]-formamidu (TosMF3)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (5,74 g, 23,44 mmoli) bromopochodnej benzaldehydu **ald 6**, (3,01 g, 19,29 mmoli) pochodnej sulfinowej **77**,

(0,11 g, 0,47 mmoli) kwasu kamforosulfonowego oraz 10 ml (11,35 g, 252 mmoli) formamidu i ogrzewano w temperaturze 65°C intensywnie mieszając na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy przez 20 godzin. Po około 30 minutach od początku reakcji zaczął wytrącać się osad produktu. Uzyskaną zawiesinę po ochłodzeniu do temperatury pokojowej odsączono na lejku ze szkła spiekanego i przemyto metanolem. Otrzymano (4,74 g, wyd. 57%) białego krystalicznego osadu **TosMF3**; t.t.=162-163°C, (lit. 162-163°C, [170]), $R_f=0,40$ (heksan:EtOAc, 1:3).

Synteza pochodnych tosylometylo izocyjanków (**TosMIC**)

Synteza 3,4,5-trimetoksyfenylo(tosylo)metylo izocyjanku (**TosMIC1**)

W kolbie trójszyjnej o pojemności 250 ml zawieszono (4,17 g, 11 mmoli) **TosMF1** w 100 ml bezwodnego dimetoksyetanu. Następnie układ umieszczono w reaktorze z płaszczem chłodzącym i chłodzono do temperatury -10°C w czasie 20min. Do kolby podłączono wkraplacz i dodawano z szybkością 1 kropla\s 3,1 ml (5,06 g, 33 mmoli) tlenochlorku fosforu (trzykrotny nadmiar molowy w stosunku do **TosMF1**). Następnie po dodaniu całej ilości tlenochlorku fosforu przez kolejny wkraplacz dodawano 7,7 ml (5,57 g, 55 mmoli) trietyloaminy (pięciokrotny nadmiar molowy w stosunku do **TosMF1**) rozpuszczonej w 10 ml dimetoksyetanu w czasie 20 min. Roztwór mieszano w temperaturze -5°C przez 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną wylano na 250 ml wody z lodem i ekstrahowano octanem etylu (3x80ml), następnie warstwę organiczną przemyto 100 ml 10% roztworu NaHCO₃ oraz 100 ml solanki. Następnie osuszono bezwodnym MgSO₄, przesączono, odparowano do sucha i przekrystalizowano z 50 ml octanu etylu otrzymując (3,00 g, wyd. 75%) jasnożółtego krystalicznego osadu **TosMIC1**; t.t.=104-105°C, $R_f=0,38$ (heksan:EtOAc, 1:1).

3,4,5-trimetoksyfenylo(tosylo)metylo izocyjanek (C₁₈H₁₉NO₅S, m.cz. 361,41) (TosMIC1**).** ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.48 (s, 2H), 5.52 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.77 (s, 6H), 2.46 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 166.07, 153.26, 146.59, 139.89, 130.56, 130.17, 129.74, 121.68, 105.62, 60.94, 56.17, 21.75. LRMS (EI) m/z 206,1 ([M-tosyl]⁺, 100%).

Synteza 3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo(tosylo)metylo izocyjanku (TosMIC2)

W kolbie trójzszyjnej o pojemności 250 ml zawieszono (4,88 g, 12,3 mmoli) **TosMF2** w 100 ml bezwodnego dimetoksyetanu. Następnie układ umieszczono w reaktorze z płaszczem chłodzącym i chłodzono do temperatury -10°C w czasie 20min. Do kolby podłączono wkraplacz i dodawano z szybkością 1 kropla/s 3,4 ml (5,66 g, 36,9 mmoli) tlenochlorku fosforu (trzykrotny nadmiar molowy w stosunku do **TosMF2**). Następnie po dodaniu całej ilości tlenochlorku fosforu przez kolejny wkraplacz dodawano 8,6 ml (6,22 g, 61,5 mmoli) trietyloaminy (pięciokrotny nadmiar molowy w stosunku do **TosMF2**) rozpuszczonej w 10 ml dimetoksyetanu w czasie 20 min. Roztwór mieszano w temperaturze -5°C przez 3 godziny. Mieszaninę reakcyjną wylano na 250 ml wody z lodem i ekstrahowano octanem etylu (3x80ml), następnie warstwę organiczną przemyto 100 ml 10% roztworu NaHCO_3 oraz 100 ml solanki. Następnie osuszono bezwodnym MgSO_4 , przesączono, odparowano do sucha i przekrystalizowano z 50 ml octanu etylu otrzymując (3,25 g, wyd. 70%) jasnożółtego krystalicznego osadu **TosMIC2**; t.t.=101-103°C, $R_f=0,59$ (heksan:EtOAc, 1:1).

3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo(tosylo)metylo izocyjanek ($\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{S}$, m.cz. 377,48) (TosMIC2). ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ppm (δ): 7.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 6.86 (s, 2H), 6.43 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.77 (s, 6H), 2.39 (s, 3H), 2.26 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ppm (δ): 160.27, 159.45, 144.81, 133.41, 131.40, 129.54, 129.21, 112.96, 105.82, 70.60, 56.13, 39.92, 39.71, 39.50, 39.29, 39.08, 21.09, 16.91. LRMS (EI) m/z 222,1 [$\text{M}-\text{tosyl}$] $^+$, 100%].

Synteza 3-bromo-4,5-dimetoksyfenylo(tosylo)metylo izocyjanku (TosMIC3)

W kolbie trójzszyjnej o pojemności 250 ml zawieszono (4,44 g, 10,4 mmoli) **TosMF3** w 100 ml bezwodnego dimetoksyetanu. Następnie układ umieszczono w reaktorze z płaszczem chłodzącym i chłodzono do temperatury -10 w czasie 20min. Do kolby podłączono wkraplacz i dodawano z szybkością 1 kropla/s 3°C , 1 ml (5,06 g, 33 mmole) tlenochlorku fosforu (trzykrotny nadmiar molowy w stosunku do **TosMF3**). Następnie po dodaniu całej ilości tlenochlorku fosforu przez kolejny wkraplacz dodawano 7,7 ml (5,57 g, 55 mmoli) trietyloaminy (pięciokrotny nadmiar molowy w stosunku do **TosMF3**) rozpuszczonej w 10 ml dimetoksyetanu w czasie 20 min. Roztwór mieszano w temperaturze -5°C przez 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną wylano na 250 ml wody z lodem i ekstrahowano octanem etylu (3x80ml), następnie warstwę

organiczną przemyto 100 ml 10% roztworu NaHCO₃ oraz 100 ml solanki. Następnie osuszono bezwodnym MgSO₄, przesączono, odparowano do sucha i przekryształowano z 50 ml octanu etylu otrzymując (3,37 g, wyd. 79%) jasnożółtego krystalicznego osadu **TosMIC3**; t.t.=114-115°C (lit. 109-110°C [170]), R_f=0,64 (heksan:EtOAc, 1:3).

3-bromo-4,5-dimetoksyfenylo(tosylo)metylo izocyjanek (C₁₇H₁₆BrNO₄S, m.cz. 410,28) (TosMIC3). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.48 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 2.49 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 166.75, 153.69, 148.57, 146.93, 130.53, 130.04, 129.91, 125.04, 123.24, 117.80, 111.56, 75.60, 60.74, 56.24, 21.80. LRMS (EI) m/z 254 [M-155 (CH₃PhSO₂ - tosyl), 74,6%], 155 ([CH₃PhSO₂]⁺, 54,1%), 91 ([CH₃Ph]⁺, 100%)

Synteza 4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(2-metylotiofenylo)oksazolu (KomOx1)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono pochodną tosylometylo izocyjaneku **TosMIC1** (0,433 g, 1,2 mmoli), 2-metylotiobenzaldehyd **75** (0,152 g, 1 mmol), bezwodny K₂CO₃ (0,33 g, 2,4 mmoli) oraz 13 ml mieszaniny bezwodnego dimetoksyetanu i metanolu w stosunku objętościowym 3:10. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i trzykrotnie ekstrahowano 30 ml octanu etylu. Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100 ml solanki, wysuszono bezwodnym MgSO₄ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując oleistą żółtą ciecz. Następnie przeprowadzono chromatografię kolumnową (heksan:EtOAc, 1:1). Otrzymano (0,158 g, wyd. 44%) jasnożółtego krystalicznego osadu **KomOx1**; t.t.=87-89°C, R_f=0,5 (heksan:EtOAc, 1:1).

4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(2-metylotiofenylo)oksazol (C₁₉H₁₉NO₄S, m.cz. 357,42) (KomOx1). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 8.00 (s, 1H, C_{2ox}-H), 7.49 – 7.43 (m, 1H, C_{4'}-H), 7.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, C_{6'}-H), 7.35 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, C_{3'}-H), 7.23 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, C_{5'}-H), 6.80 (s, 2H, C₂-H, C₆-H), 3.82 (s, 3H, C₄-OCH₃), 3.66 (s, 6H, C₃-OCH₃, C₅-OCH₃), 2.40 (s, 3H, C_{2'}-SCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 153.09 (C₃, C₅), 150.17 (C_{2ox}), 143.75 (C_{5ox}), 140.98 (C₄), 137.57(C_{4ox}), 135.88 (C_{2'}), 131.54 (C_{4'}), 130.61 (C_{6'}), 127.68 (C₁), 126.61 (C_{1'}), 125.57 (C_{3'}), 124.85 (C_{5'}), 103.35 (C₂, C₆), 60.80 (C₄-OCH₃), 55.69 (C₃-OCH₃, C₅-OCH₃), 15.61

(C2'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3109 (ν N=C_{Ar}-H), 3067 (ν =C_{Ar}-H), 2998 (ν CH₃), 2955 (ν_{as} CH₃), 2933 (ν CH₃), 2837 (ν O-CH₃), 1622 (ν C_{Ar}=N), 1586 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1519 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1459 (δ_{as} CH₃), 1372 (δ_s CH₃), 1241 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1125 (ν C-O-C), 1049 (ν_s C_{Ar}-O-C), 845 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 759 (γ^{oop}=C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 357,3 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₉H₁₉NO₄S: 357,10293. Znaleziono: 357,10400.

Synteza 4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotiokarbamoilofenylo)oksazolu (KomOx2pr)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (0,433 g, 1,2 mmoli), pochodnej tosylometylo izocyjanku **TosMIC1**, pochodnej S-tiokrabaminianowej **ald 2b** (0,24 g, 1 mmol), bezwodnego K₂CO₃ (0,33 g, 2,4 mmoli) oraz 13 ml mieszaniny bezwodnego dimetoksyetanu i metanolu w stosunku objętościowym 3:10. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ przez 1,5 godziny w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100 ml solanki, wysuszono bezwodnym MgSO₄ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany surowy produkt przekrystalizowano z 15 ml izopropanolu i wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymano (0,163 g, wyd. 45%) białego krystalicznego osadu **KomOx2pr**; t.t.=123-124°C, R_f=0,39 (heksan:EtOAc, 1:3).

4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotiokarbamoilofenylo)oksazol (C₂₂H₂₄N₂O₆S, m.cz. 444,50) (KomOx2pr). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.90 (s, 1H, C2_{ox}-H), 7.81 (d, J = 2.3 Hz, 1H, C2'-H), 7.70 (dd, J = 8.7, 2.3 Hz, 1H, C6'-H), 6.99 (d, J = 8.7 Hz, 1H, C5'-H), 6.93 (s, 2H, C2-H, C6-H), 3.91 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.88 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.80 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 3.11 (s, 3H, C8'-H₃), 2.99 (s, 3H, C9'-H₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 165.49 (C7'), 160.48 (C4'), 153.35 (C3, C5), 149.31 (C2_{ox}), 144.73 (C5_{ox}), 137.85 (C4), 136.46 (C2'), 133.78 (C4_{ox}), 130.18 (C6'), 127.50 (C1), 121.57 (C1'), 117.59 (C3'), 111.48 (C5'), 104.71 (C2, C6), 60.92 (C4-OCH₃), 56.28 (C4'-OCH₃), 56.13, (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 36.97 (C8', C9'). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3121 (ν N=C_{Ar}-H), 3009 (ν =C_{Ar}-H), 2968 (ν_{as} CH₃), 2935 (ν CH₃), 2836 (ν O-CH₃), 1670 (ν C=O), 1580 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1507 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1461 (δ_{as} CH₃), 1366 (δ_s CH₃), 1270 (ν C-N), 1238 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1126 (ν

C-O-C), 1067 (ν_s C_{Ar}-O-C), 821 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 728 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$). LRMS (EI) m/z 444,1 ([M]⁺, 100%), 72,1 ([[(CH₃)₂NCO]⁺, 97,4%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₂₂H₂₄N₂O₆S: 444.13496. Znaleziono: 444,13378.

Synteza 4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-merkaptto-4-metoksyfenylo)oksazolu (KomOx2)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml umieszczono (0,145 g, 0,32 mmoli) pochodnej **KomOx2pr**, oraz 3 ml 10% metanolowego roztworu KOH (0,24 g, 4,28 mmoli). Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy pod chłodnicą zwrotną w atmosferze azotu przez 1,5 godziny w temperaturze 80°C. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 10 ml wody destylowanej i zakwaszono 5% roztworem kwasu solnego do pH 2-3 i przeniesiono do rozdzielacza. Ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100 ml solanki, wysuszono bezwodnym MgSO₄, przemyto i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany surowy produkt przekrystalizowano z 15 ml heksanu i wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymano (0,033 g, wyd. 29%) żółtego krystalicznego osadu **KomOx2**; t.t.=133-135°C, R_f=0,37 (heksan:EtOAc, 1:1).

4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-merkaptto-4-metoksyfenylo)oksazol (C₁₉H₁₉NO₅S, m.c. 373,42) (**KomOx2**). ¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.93 (s, 1H, C2_{ox}-H), 7.63 (d, J = 2.2 Hz, 1H, C2'-H), 7.43 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H, C6'-H), 6.95 (s, 2H, C2-H, C6-H), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 1H, C5'-H), 3.96 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.92 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.89 (s, 1H, C3'-SH), 3.83 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃). ¹³C NMR (176 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 155.14 (C4'), 153.36 (C3, C5), 149.37 (C2_{ox}), 144.95 (C5_{ox}), 137.98 (C4), 133.77 (C4_{ox}), 127.68 (C2'), 127.42 (C1), 125.47 (C6'), 121.75 (C1'), 121.53 (C3'), 110.46 (C5'), 104.72 (C2, C6), 60.98 (C4-OCH₃), 56.14 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 56.09 (C4'-OCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3134 (ν N=C_{Ar}-H), 3064 (ν =C_{Ar}-H), 2999 (ν CH₃), 2964 (ν_{as} CH₃), 2930 (ν CH₃), 2837 (ν O-CH₃), 1620 (ν C_{Ar}=N), 1583 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1512 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1451 (δ_{as} CH₃), 1374 (δ_s CH₃), 1277 (ν C-N), 1235 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1121 (ν C-O-C), 1069 (ν_s C_{Ar}-O-C), 829 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 813 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 813 (γ^{oop}=C_{Ar}-H), 760 (γ^{oop}=C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 373,0 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₉H₁₉NO₅S: 373,09784. Znaleziono: 373,09876.

Synteza 4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotiokarbamoilooksofenylo)oksazolu (KomOx3pr)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (0,68 g, 1,8 mmoli), pochodnej tosylometylo izocyjanku **TosMIC2**, pochodnej O-tiokarbaminianowej **ald 2a** (0,36 g, 1,8 mmoli), bezwodnego K_2CO_3 (0,50 g, 3,6 mmoli) oraz 13 ml mieszaniny bezwodnego dimetoksyetanu i metanolu w stosunku objętościowym 3:10. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym $CaCl_2$ przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100 ml solanki, wysuszono bezwodnym $MgSO_4$ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną żółtą oleistą ciecz oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w układzie (heksan:EtOAc, 7:3). Otrzymano (0,63 g, wyd. 74%) białego krystalicznego osadu **KomOx3pr**; t.t.=130-132°C, $R_f=0,35$ (heksan:EtOAc, 1:1).

4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotiokarbamoilooksofenylo)oksazolu ($C_{22}H_{24}N_2O_5S_2$, m.c.z. 460,57) (**KomOx3pr**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 7.92 (s, 1H, C2_{ox}-H), 7.53 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H, C6'-H), 7.35 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, C2'-H), 7.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, C5'-H), 6.92 (s, 2H, C2-H, C6-H), 3.86 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.85 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 3.44 (s, 3H, C8'H₃), 3.34 (s, 3H, C9'H₃), 2.40 (s, 3H, C4-SCH₃). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 187.30 (C7'), 160.54 (C3, C5), 152.30 (C4'), 149.41 (C2_{ox}), 145.38 (C5_{ox}), 142.90 (C3'), 133.80 (C4_{ox}), 132.99 (C1), 125.89 (C6'), 122.80 (C2'), 121.10 (C1'), 112.57 (C5'), 111.96 (C4), 103.61 (C2, C6), 56.34 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 56.08 (C4'-OCH₃), 43.44 (C8'), 38.75 (C9'), 17.82 (C4-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3105 (ν N=C_{Ar}-H), 3024 (ν =C_{Ar}-H), 2994 (ν CH₃), 2951 (ν_{as} CH₃), 2926 (ν CH₃), 2855 (ν O-CH₃), 1559 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1510 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1463 (δ_{as} CH₃), 1406 (δ_s CH₃), 1270 (ν C-N), 1236 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1124 (ν C-O-C), 1025 (ν_s C_{Ar}-O-C), 832 (γ^{oop} =C_{Ar}-H), 772 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 460,1 ($[M]^+$, 58%), 88 ($[(CH_3)NCS]^+$, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $C_{22}H_{24}N_2O_5S_2$: 460,11211. Znaleziono: 460,11401.

Synteza 4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-oksazolu (**KomOx3**)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 ml umieszczono (0,36 g, 0,78 mmola) pochodnej **KomOx3pr**, oraz 9 ml 10% metanolowego roztworu KOH (0,712 g, 12,69 mmola). Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy pod chłodnicą zwrotną w atmosferze azotu przez 2 godziny w temperaturze 80°C. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 10 ml wody destylowanej i zakwaszono 5% roztworem kwasu solnego do pH 2-3 i przeniesiono do rozdzielacza. Ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100 ml solanki, wysuszono bezwodnym MgSO₄, przemyto i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany surowy produkt przekryształizowano z 10 ml izopropanolu i wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymano (0,16 g, wyd. 55%) białego krystalicznego osadu **KomOx3**; t.t.=161-162°C, R_f=0, (CHCl₃:MeOH, 10:1).

4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)oksazol (C₁₉H₁₉NO₅S, m.cz. 373,42) (**KomOx3**). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.89 (s, 1H, C2_{ox}-H), 7.24 (s, 1H, C2'-H), 7.14 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H, C6'-H), 6.91 (s, 2H, C2-H, C6-H), 6.84 (d, J = 8.3 Hz, 1H, C5'-H), 5.68 (s, 1H, C3'-OH), 3.91 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.80 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 2.37 (s, 3H, C4-SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 160.47 (C3, C5), 149.34 (C2_{ox}), 147.25 (C4'), 146.09 (C5_{ox}), 145.70 (C3'), 133.48 (C1), 133.02 (C4_{ox}), 121.82 (C1'), 119.69 (C6'), 113.52 (C2'), 111.91 (C4), 110.52 (C5'), 103.54 (C2, C6), 56.19 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 56.00 (C4'-OCH₃), 17.84 (C4-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3433 (ν O-H), 3120 (ν N=C_{Ar}-H), 3013 (ν =C_{Ar}-H), 2926 (ν CH₃), 2845 (ν O-CH₃), 1578 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1507 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1463 (δ_{as} CH₃), 1374 (δ_s CH₃), 1235 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1122 (ν C-O-C), 1012 (ν_s C_{Ar}-O-C), 846 (γ^{oop} =C_{Ar}-H), 809 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 373,0 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₉H₁₉NO₅S: 373,09784. Znaleziono: 373,10020.

Synteza 4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)oksazolu (**KomOx4**)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (0,433 g, 1,20 mmola), pochodnej tosylometylo izocyjanku **TosMIC1**, (0,182 g, 1 mmol) metylo-tiobenzaldehydu **ald 3d**, (0,330 g, 2,39 mmola) bezwodnego K₂CO₃ oraz 13 ml

mieszaniny bezwodnego dimetoksyetanu i metanolu w stosunku objętościowym 3:10. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ przez 1 godzinę w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100 ml solanki, wysuszono bezwodnym MgSO₄ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt przekrystalizowano z 15 ml izopropanolu. Otrzymano (0,232 g, wyd. 60%) żółtego krystalicznego osadu **KomOx4**; t.t.=114-116°C, R_f=0,39 (heksan:EtOAc, 1:1).

4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)oksazol (C₂₀H₂₁NO₅S, m.cz. 387,45) (**KomOx4**). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.93 (s, 1H, C2_{ox}-H), 7.28 (dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 1H, C6'-H), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, C5'-H), 7.09 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, C2'-H), 6.92 (s, 2H, C2-H, C6-H), 3.88 (s, 3H, C3'-OCH₃), 3.83 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.80 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 2.45 (s, 3H, C4'-SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 155.89 (C3'), 153.33 (C3, C5), 149.36 (C2_{ox}), 145.40 (C5_{ox}), 138.07 (C4), 134.38 (C4_{ox}), 128.69 (C1), 127.55 (C4'), 125.84 (C1'), 125.17 (C5'), 119.72 (C6'), 108.08 (C2'), 105.12 (C2, C6), 60.94 (C4-OCH₃), 56.14 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 55.84 (C3'-OCH₃), 14.38 (C4'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3106 (ν N=C_{Ar}-H), 3004 (ν =C_{Ar}-H), 2952 (ν_{as} CH₃), 2934 (ν CH₃), 2837 (ν O-CH₃), 1577 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1515 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1463 (δ_{as} CH₃), 1369 (δ_s CH₃), 1234 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1130 (ν C-O-C), 1060 (ν_s C_{Ar}-O-C), 835 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 387,1 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₂₀H₂₁NO₅S: 387,11349. Znaleziono: 387,11550.

Synteza 4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-bromo-5-metoksy-4metylotiofenylo)-oksazolu (**KomOx5**)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (0,433 g; 1,20 mmola), pochodnej tosylometylo izocyjanku **TosMIC1**, (0,261 g; 1 mmol) metylotiobenzaldehydu **ald 4d**, (0,330 g, 2,39 mmola) bezwodnego K₂CO₃ oraz 13 ml mieszaniny bezwodnego dimetoksyetanu i metanolu w stosunku objętościowym 3:10. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100

ml solanki, wysuszono bezwodnym MgSO_4 i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt przekrystalizowano z 5 ml izopropanolu z dodatkiem węgla aktywnego. Otrzymano (0,232 g, wyd. 49%) bladeżółtych kryształów **KomOx5**; t.t.=112-114°C, $R_f=0,37$ (heksan:EtOAc, 1:1).

4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(5-bromo-3-metoksy-4-metylotiofenylo)oksazol

($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrNO}_5\text{S}$, m.cz. 466,35) (**KomOx5**). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 7.95 (s, 1H, $\text{C}_{2\text{ox}}\text{-H}$), 7.64 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, $\text{C}_{6'}\text{-H}$), 7.10 (d, $J = 1.7$ Hz, $\text{C}_{2'}\text{-H}$), 6.92 (s, 2H, $\text{C}_2\text{-H}$, $\text{C}_6\text{-H}$), 3.89 (s, 3H, $\text{C}_{3'}\text{-OCH}_3$), 3.83 (s, 6H, $\text{C}_3\text{-OCH}_3$, $\text{C}_5\text{-OCH}_3$), 3.82 (s, 3H, $\text{C}_4\text{-OCH}_3$), 2.43 (s, 3H, $\text{C}_{4'}\text{-SCH}_3$). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 160.69 ($\text{C}_{3'}$), 153.45 (C_3 , C_5), 149.88 ($\text{C}_{2\text{ox}}$), 143.64 ($\text{C}_{5\text{ox}}$), 138.50 (C_4), 135.99 ($\text{C}_{5'}$), 130.27 ($\text{C}_{4\text{ox}}$), 129.96 (C_1), 126.90 ($\text{C}_{4'}$), 126.56 ($\text{C}_{1'}$), 122.97 ($\text{C}_{6'}$), 108.01 ($\text{C}_{2'}$), 105.26 (C_2 , C_6), 60.97 ($\text{C}_4\text{-OCH}_3$), 56.32 ($\text{C}_{3'}\text{-OCH}_3$), 56.22 ($\text{C}_3\text{-OCH}_3$, $\text{C}_5\text{-OCH}_3$), 18.24 ($\text{C}_{4'}\text{-SCH}_3$). FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3109 ($\nu \text{N}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 3010 ($\nu =\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 2980 ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_3$), 2924 (νCH_3), 2825 ($\nu \text{O-CH}_3$), 1586 ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1528 ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1469 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1391 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$), 1245 ($\nu_{\text{as}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 1124 ($\nu \text{C-O-C}$), 1029 ($\nu_{\text{s}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 828 ($\gamma^{\text{oop}} =\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 731 ($\gamma^{\text{oop}} =\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$). LRMS (EI) m/z 465,1 ($[\text{M}]^+$, 100%), 467,1 ($\text{M}^+ + 2$), 93,6%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrNO}_5\text{S}$: 465,02400. Znalezione: 465,02493.

Synteza 4-(3-bromo-4,5-dimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)oksazolu (**KomOx6**)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (0,492 g; 1,20 mmola), pochodnej tosylometylo izocyjanku **TosMIC3**, (0,182 g; 1 mmol) metylo-tiobenzaldehydu **ald 3d**, (0,330 g, 2,39 mmola) bezwodnego K_2CO_3 oraz 13 ml mieszaniny bezwodnego dimetoksyetanu i metanolu w stosunku objętościowym 3:10. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl_2 przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100 ml solanki, wysuszono bezwodnym MgSO_4 i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt przekrystalizowano z 5 ml izopropanolu z dodatkiem węgla aktywnego. Otrzymano (0,272 g, wyd. 52%) bladeżółtych kryształów **KomOx5**; t.t.=102-105°C, $R_f=0,53$ (heksan:EtOAc, 1:1).

4-(5-bromo-3,4-dimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)oksazol

($C_{19}H_{18}BrNO_4S$, m.cz. 436,32) (**KomOx6**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 7.93 (s, 1H, C_{2ox-H}), 7.50 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, C_6-H), 7.24 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, $C_{2'-H}$), 7.21 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, C_2-H), 7.14 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $C_{5'-H}$), 7.09 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, $C_{6'-H}$), 3.89 (s, 3H, C_3-OCH_3), 3.84 (s, 3H, $C_{3'-OCH_3}$), 3.83 (s, 3H, C_4-OCH_3), 2.47 (s, 3H, $C_{4'-SCH_3}$). ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 155.93 (**C3**), 153.71 (**C3'**), 149.49 (**C2ox**), 146.37 (**C5ox**), 145.86 (**C4**), 132.90 (**C4ox**), 129.25 (**C1**), 129.12 (**C4'**), 125.42 (**C1'**), 125.30 (**C6**), 124.02 (**C5'**), 119.63 (**C6'**), 117.66 (**C5**), 111.45 (**C2**), 107.88 (**C2'**), 60.68 (C_4-OCH_3), 56.13 ($C_{3'-OCH_3}$), 55.90 (C_3-OCH_3), 14.34 ($C_{4'-SCH_3}$). FTIR ATR (KBr) cm^{-1} : 3131 ($\nu N=C_{Ar-H}$), 3002 ($\nu =C_{Ar-H}$), 2959 ($\nu_{as} CH_3$), 2932 (νCH_3), 2830 ($\nu O-CH_3$), 1562 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1513 ($\nu C_{Ar}=C_{Ar}$), 1461 ($\delta_{as} CH_3$), 1361 ($\delta_s CH_3$), 1262 ($\nu_{as} C_{Ar}-O-C$), 1043 ($\nu_s C_{Ar}-O-C$), 850 ($\gamma^{oop} =C_{Ar-H}$). LRMS (EI) m/z 435,1 ($[M]^+$, 97,1%), 437,0 ($[M^+ + 2]$, 100%) HRMS (EI) m/z obliczone dla $C_{19}H_{18}BrNO_4S$: 435,01343. Znaleziono: 435,01552.

Synteza 4-(3-bromo-4,5-dimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-metylotiofenylo)oksazolu (KomOx7**)**

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono (0,492 g; 1,20 mmola), pochodnej tosylometylo izocyjanku **TosMIC3**, (0,182 g; 1 mmol) metylo-tiobenzaldehydu **ald 2d**, (0,330 g, 2,39 mmola) bezwodnego K_2CO_3 oraz 13 ml mieszaniny bezwodnego dimetoksyetanu i metanolu w stosunku objętościowym 3:10. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym $CaCl_2$ przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto 100 ml solanki, wysuszono bezwodnym $MgSO_4$ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt przekryształizowano z 5 ml izopropanolu z dodatkiem węgla aktywnego. Otrzymano (0,247 g, wyd. 47%) bladeżółtych kryształów **KomOx7**; t.t.=102-105°C, $R_f=0,53$ (heksan:EtOAc, 1:1).

4-(5-bromo-3,4-dimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-metylotiofenylo)oksazol

($C_{19}H_{18}BrNO_4S$, m.cz. 436,32) (**KomOx7**). 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) ppm (δ): 7.91 (s, 1H, C_{2ox-H}), 7.48 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, C_6-H), 7.41 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, $C_{6'-H}$), 7.38 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, $C_{2'-H}$), 7.19 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, C_2-H), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz,

^1H , C5'-**H**), 3.94 (s, 3H, C3-OCH₃), 3.88 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.81 (s, 3H, C4'-OCH₃), 2.33 (s, 3H, C3'-SCH₃). ^{13}C NMR (126 MHz, ppm (δ): 156.59 (**C3**), 153.66 (**C4'**), 149.36 (**C2ox**), 146.27 (**C5ox**), 145.90 (**C4**), 132.25 (**C4ox**), 129.34 (**C1**), 128.12 (**C1'**), 124.57 (**C6**), 123.91 (**C5'**), 123.89 (**C6'**), 121.41 (**C3'**), 117.74 (**C5**), 111.27 (**C2**), 109.96 (**C2'**), 60.67 (C4-OCH₃), 56.10 (C4'-OCH₃), 55.98 (C3-OCH₃), 14.37 (C3'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3112 (ν N=C_{Ar}-H), 3008 (ν =C_{Ar}-H), 2997 (ν CH₃), 2942 (ν CH₃), 2836 (ν O-CH₃), 1565 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1523 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1495 (δ_{as} CH₃), 1357 (δ_{s} CH₃), 1248 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1045 (ν_{s} C_{Ar}-O-C), 848 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 435,1 ([M]⁺, 98%), 437,0 ([M⁺ + 2], 100%) HRMS (EI) m/z obliczone dla C₁₉H₁₈BrNO₄S: 435,01342. Znaleziono: 435,01204.

4.5.9. Synteza N-metyloimidazolowych pochodnych CA-4 (KomNMeI)

Synteza 1-metylo-4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(2-metylotiofenylo)imidazolu (KomNMeI1)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono 2-metylotiobenzaldehyd **75** (0,152 g; 1mmol), 33% roztwór metyloaminy w etanolu (0,470 g; 5 mmoli), 15 ml bezwodnego etanolu i 0,3 ml lodowatego kwasu octowego. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury pokojowej, a następnie dodano pochodną tosylometylo izocyjanku **TosMIC1** (0,49 g, 1,5 mmola), bezwodny K₂CO₃ (0,552 g; 4 mmole) oraz 5 ml bezwodnego dimetoksyetanu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny w temperaturze wrzenia. Po osiągnięciu przez mieszaninę temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i trzykrotnie przemywano 30 ml octanu etylu. Połączone ekstrakty organiczne wysuszono bezwodnym MgSO₄ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano żółtobrunatną oleistą ciecz, którą oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w układzie (CHCl₃:MeOH, 10:1). Uzyskano (0,336 g, wyd. 98%) bladeżółtych kryształów **KomNMeI1**; t.t.=156-158°C, Rf=0,53 (CHCl₃:MeOH, 10:1).

1-metylo-4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(2-metylotiofenylo)imidazol (C₂₀H₂₂N₂O₃S, m.cz. **370,47**) (**KomNMeI1**). ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (s, 1H, C2im-**H**), 7.49 – 7.43 (m, 1H, C5'-**H**), 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 1H, C6'-**H**), 7.28 – 7.22 (m, 2H, C3'-**H**,

C4'-H), 6.76 (s, 2H, C2-H, C6-H), 3.79 (s, 3H, N1im-CH₃), 3.62 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 3.43 (s, 3H, C4-OCH₃), 2.38 (s, 3H, C2'-SCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 152.87 (C3, C5), 141.79 (C2im), 138.21 (C4), 137.22 (C4'), 136.33 (C2'), 132.04 (C6'), 130.01 (C4im, C5im), 128.98 (C1'), 126.34 (C1), 124.97 (C5'), 124.47 (C3'), 102.40 (C2, C6), 60.75 (C4-OCH₃), 55.52 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 31.67 (N1im-CH₃), 14.82 (C2'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3098 (ν N=C_{Ar}-H), 2995 (ν CH₃), 2954 (ν_{as} CH₃), 2934 (ν CH₃), 2829 (ν O-CH₃), 1582 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1508 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1415 (δ_{as} CH₃), 1330 (δ_s CH₃), 1237 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1125 (ν C-O-C), 848 (γ^{oop} =C_{Ar}-H), 778 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 370,2 ([M]⁺, 100%), 355,2 ([M-CH₃]⁺, 69,1%) HRMS (EI) m/z obliczone dla C₂₀H₂₂N₂O₃S: 370,13456. Znaleziono: 370,13390.

Synteza 1-metylo-4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotiokarbamoilooksofenylo)imidazolu (KomNMeI2pr)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono S-tiokarbaminianową pochodną **ald 2a** (0,239 g; 1mmol), 33% roztwór metyloaminy w etanolu (0,470 g; 5 mmoli), 15 ml bezwodnego etanolu i 0,3 ml lodowatego kwasu octowego. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury pokojowej, a następnie dodano pochodną tosylometyloizocyjanku **TosMIC2** (0,566 g, 1,5 mmola), bezwodny K₂CO₃ (0,552 g; 4 mmole) oraz 5 ml bezwodnego dimetoksyetanu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny w temperaturze wrzenia. Po osiągnięciu przez mieszaninę temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i trzykrotnie przemywano 30 ml octanu etylu. Połączone ekstrakty organiczne wysuszono bezwodnym MgSO₄ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano żółtobrunatną oleistą ciecz, którą oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w układzie (CHCl₃:MeOH, 10:1). Uzyskano (0,237 g, wyd. 50%) bladeżółtych kryształów **KomNMeI2pr**; t.t.=192-194°C, R_f=0,45 (CHCl₃:MeOH, 10:1).

1-metylo-4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotiokarbamoilooksofenylo)imidazol (C₂₃H₂₇N₃O₄S₂, m.cz. 473,61) (KomNMeI2pr).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.61 (s, 1H, C2im-H), 7.20 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1H, C6'-H), 7.07 (d, J = 2.1 Hz, 1H, C2'-H), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 1H, C5'-H), 6.83 (s, 2H, C2-H, C6-H), 3.87 (s, 3H, N1im-CH₃), 3.73 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 3.52 (s, 3H, C4'-OCH₃), 3.45 (s, 3H, C8'H₃), 3.37 (s, 3H, C9'H₃), 2.33 (s, 3H, C4-SCH₃). ¹³C

NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 187.50 (C7'), 160.31 (C3, C5), 152.18 (C4'), 143.18 (C3'), 137.52 (C1'), 137.13 (C2im), 129.67 (C6'), 128.47 (C2'), 126.66 (C4im, C5im), 122.34 (C1), 112.91 (C5'), 109.65 (C4), 102.32 (C2, C6), 56.15 (C4'-OCH₃), 56.07 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 43.47 (C8'), 38.78 (C9'), 32.30 (N1im-CH₃), 17.92 (C4-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3110 (ν N=C_{Ar}-H), 3003 (ν =C_{Ar}-H), 2957 (ν_{as} CH₃), 2933 (ν CH₃), 2835 (ν O-CH₃), 1551 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1510 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1443 (δ_{as} CH₃), 1408 (δ_s CH₃), 1270 (ν C-N), 1234 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1110 (ν C-O-C), 1024 (ν_s C_{Ar}-O-C), 846 (γ^{oop} =C_{Ar}-H), 817 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 473,3 ([M]⁺, 100%), 88,0 ([[(CH₃)NCS]⁺, 77,6%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₂₃H₂₇N₃O₄S₂: 473,14375. Znaleziono: 473,14655.

Synteza 1-metylo-4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(3-hydroksy-4-metoksy-fenylo)imidazol (KomNMeI2)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 10 ml umieszczono (0,142 g, 0,30 mmola) pochodnej **KomNMeI2pr** oraz 3 ml 10% metanolowego roztworu KOH (0,240 g, 4,28 mmola). Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano na mieszadle magnetycznym wyposażonym w elektroniczny termometr kontaktowy pod chłodnicą zwrotną w atmosferze azotu przez 5,5 godziny w temperaturze 80°C. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej zakwaszono ją lodowatym kwasem octowym do pH 4-5 a wytrącony osad surowego produktu odsączono na lejku ze szkła spiekanego. Uzyskany surowy produkt przekrystalizowano z 5 ml izopropanolu z dodatkiem węgla aktywnego i wysuszono w eksykatorze próżniowym. Otrzymano (0,039 g, wyd. 33%) białych kryształów **KomNMeI2**; t.t.=123-125°C, R_f=0,38 (CHCl₃:MeOH, 10:1).

1-metylo-4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-imidazol (C₂₀H₂₂N₂O₄S, m.cz. 386,46) (KomNMeI2). ¹H NMR (500 MHz, ppm (δ): 7.61 (s, 1H, C2im-H), 6.97 – 6.92 (m, 2H, C2'-H, C6'-H), 6.85 (dd, J = 8.2, 2.1 Hz, 1H, C5'-H), 6.81 (s, 2H, C2-H, C6-H), 5.87 (s, 1H, C3'-OH), 3.95 (s, 3H, N1im-CH₃), 3.69 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 3.49 (s, 3H, C4'-OCH₃), 2.32 (s, 3H, C4-SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 160.26 (C3, C5), 147.23 (C4'), 147.12 (C3'), 146.13 (C2im), 137.18 (C4im), 136.82 (C1'), 129.25 (C1), 123.27 (C5im), 123.00 (C6'), 116.78 (C2'), 111.03 (C5'), 109.65 (C4), 102.20 (C2, C6), 56.10 (C4'-OCH₃), 55.87 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 32.19 (N1im-CH₃), 17.92 (C4-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3433 (ν O-H), 3119 (ν N=C_{Ar}-H), 2950 (ν_{as} CH₃), 2935 (ν CH₃), 2836 (ν O-CH₃), 1596

(ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1513 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1452 (δ_{as} CH₃), 1363 (δ_s CH₃), 1252 (ν C-N), 1241 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1114 (ν C-O-C), 1023 (ν_s C_{Ar}-O-C), 838 (γ^{oop} =C_{Ar}-H), 815 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 386,2 ([M]⁺, 100%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₂₀H₂₂N₂O₄S: 386,12948. Znaleziono: 386,13041.

Synteza 1-metylo-4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-bromo-5-metoksy-4-metylotiofenylo)imidazolu (KomNMeI5)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono metylotiobenzaldehyd **ald 4d** (0,261 g; 1mmol), 33% roztwór metyloaminy w etanolu (0,470 g; 5 mmoli), 15 ml bezwodnego etanolu i 0,3 ml lodowatego kwasu octowego. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury pokojowej, a następnie dodano pochodną tosylometylo izocyjanku **TosMIC1** (0,490 g, 1,5 mmola), bezwodny K₂CO₃ (0,552 g; 4 mmole) oraz 5 ml bezwodnego dimetoksyetanu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny w temperaturze wrzenia. Po osiągnięciu przez mieszaninę temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i trzykrotnie przemywano 30 ml octanu etylu. Połączone ekstrakty organiczne wysuszono bezwodnym MgSO₄ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany osad surowego produktu przekrystalizowano z 20 mieszaniny heksanu i octan etylu w stosunku objętościowym 1:1 z dodatkiem węgla aktywnego. Uzyskano (0,138 g, wyd. 19%) białych kryształów **KomNMeI5**; t.t.=126-130°C, Rf=0,53 (CHCl₃:MeOH, 10:1).

1-metylo-4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(5-bromo-3-metoksy-4-metylotiofenylo)-imidazol (C₂₁H₂₃BrN₂O₄S, m.cz. 479,39) (KomNMeI5). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.56 (s, 1H, C2im-H), 7.33 (d, J = 1.2 Hz, 1H, C6'-H), 6.80 (d, J = 1.3 Hz, 1H, C2'-H), 6.77 (s, 2H, C2-H, C6-H), 3.82 (s, 3H, N1im-CH₃), 3.81 (s, 3H, C3'-OCH₃), 3.67 (s, 6H, C3-OCH₃, C5-OCH₃), 3.55 (s, 3H, C4-OCH₃), 2.43 (s, 3H, C4'-SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 160.94 (C3'), 152.99 (C3, C5), 138.64 (C4), 137.64 (C2im), 136.85 (C5'), 132.55 (C4im), 130.55 (C5im), 129.60 (C4'), 127.15 (C1), 126.66 (C6'), 126.65 (C1'), 112.54 (C2'), 103.49 (C2, C6), 60.87 (C4-OCH₃), 56.52 (C3'-OCH₃), 55.74 (C3-OCH₃, C5-OCH₃), 32.35 (N1im-CH₃), 18.16 (C4'-SCH₃). FTIR ATR (KBr) cm⁻¹: 3101 (ν N=C_{Ar}-H), 3065 (ν =C_{Ar}-H), 2963 (ν_{as} CH₃), 2924 (ν CH₃), 2829 (ν O-CH₃), 1584 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1510 (ν C_{Ar}=C_{Ar}), 1463 (δ_{as}

CH₃), 1397 (δ_s CH₃), 1235 (ν_{as} C_{Ar}-O-C), 1125 (ν C-O-C), 1028 (ν_s C_{Ar}-O-C), 839 (γ^{oop} =C_{Ar}-H), 780 (γ^{oop} =C_{Ar}-H). LRMS (EI) m/z 480,1 ([M⁺ + 2], 58,6%), 478,0 ([M]⁺, 55,8%), 465,1 ([M⁺ + 2 - CH₃], 45,1%), 463,0 ([M-CH₃]⁺, 43,7%), 414,1 (100%), 399,1 ([M-Br]⁺, 73,4%). HRMS (EI) m/z obliczone dla C₂₁H₂₃BrN₂O₄S: 478,05563. Znaleziono: 478,06102.

Synteza 1-metylo-4-(3-bromo-4,5-dimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)imidazolu (KomNMeI6)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono metylo-tiobenzaldehyd **ald 3d** (0,182 g; 1mmol), 33% roztwór metyloaminy w etanolu (0,470 g; 5 mmoli), 15 ml bezwodnego etanolu i 0,3 ml lodowatego kwasu octowego. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl₂ przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury pokojowej, a następnie dodano pochodną tosylometylo izocyjanku **TosMIC3** (0,615 g, 1,5 mmola), bezwodny K₂CO₃ (0,552 g; 4 mmole) oraz 5 ml bezwodnego dimetoksyetanu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny w temperaturze wrzenia. Po osiągnięciu przez mieszaninę temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i trzykrotnie przemywano 30 ml octanu etylu. Połączone ekstrakty organiczne wysuszono bezwodnym MgSO₄ i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskaną brudną oleistą ciecz oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując chloroform jako eluent. Uzyskano (0,120 g, wyd. 17%) żółtego krystalicznego osadu **KomNMeI6**; t.t.=130-135°C, Rf=0,61 (CHCl₃:MeOH, 10:1).

1-metylo-4-(5-bromo-3,4-dimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)imidazol (C₂₀H₂₁BrN₂O₃S, m.cz. 449,36) (KomNMeI6). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 7.54 (s, 1H, C2im-H), 7.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, C6-H), 7.23 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, C5'-H), 7.04 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, C2-H), 6.95 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, C6'-H), 6.76 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, C2'-H), 3.84 (s, 3H, N1im-CH₃), 3.80 (s, 3H, C3-OCH₃), 3.64 (s, 3H, C4-OCH₃), 3.49 (s, 3H, C3'-OCH₃), 2.48 (s, 3H, C4'-SCH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) ppm (δ): 156.31 (C3'), 153.15 (C3), 144.79 (C4), 137.34 (C2im), 136.53 (C4im), 131.75 (C5im), 128.74 (C1'), 128.69 (C1), 127.28 (C4'), 125.78 (C6), 123.37 (C5'), 122.41 (C6'), 117.40 (C5), 111.97 (C2), 109.80 (C2'), 60.54 (C4-OCH₃), 56.04 (C3'-OCH₃), 55.69 (C3-OCH₃), 32.19 (N1im-CH₃), 14.42 (C4'-SCH₃). FTIR ATR

(KBr) cm^{-1} : 3101 ($\nu \text{N}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 2933 (νCH_3), 2829 ($\nu \text{O-CH}_3$), 1557 ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1506 ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1463 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1402 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$), 1231 ($\nu_{\text{as}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 1043 ($\nu_{\text{s}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 853 ($\gamma^{\text{oop}}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$). LRMS (EI) m/z 450,1 ($[\text{M}^+ + 2]$, 100%), 448,0 ($[\text{M}]^+$, 94,7%), 435,1 ($[\text{M}^+ + 2 - \text{CH}_3]$, 42,5%), 433,0 ($[\text{M-CH}_3]^+$, 40,7%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$: 448,04507. Znaleziono: 448,05190.

Synteza 1-metylo-4-(3-bromo-4,5-dimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-metylotiofenylo)imidazolu (KomNMeI7)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszczono metylo-tiobenzaldehyd **ald 2d** (0,182 g; 1mmol), 33% roztwór metyloaminy w etanolu (0,470 g; 5 mmoli), 15 ml bezwodnego etanolu i 0,3 ml lodowatego kwasu octowego. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną zabezpieczoną rurką z bezwodnym CaCl_2 przez 2 godziny w temperaturze wrzenia. Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury pokojowej, a następnie dodano pochodną tosylometylo izocyjanku **TosMIC3** (0,615 g, 1,5 mmola), bezwodny K_2CO_3 (0,552 g; 4 mmole) oraz 5 ml bezwodnego dimetoksyetanu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny w temperaturze wrzenia. Po osiągnięciu przez mieszaninę temperatury pokojowej dodano 30 ml wody destylowanej i trzykrotnie przemywano 30 ml octanu etylu. Połączone ekstrakty organiczne wysuszono bezwodnym MgSO_4 i zagęszczono na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskaną brudną oleistą ciecz oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując chloroform jako eluent. Uzyskano (0,17 g, wyd. 25%) żółtego krystalicznego osadu **KomNMeI7**; t.t.=130-135°C, Rf=0,69 (CHCl_3 :MeOH, 10:1).

1-metylo-4-(5-bromo-3,4-dimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-metylotiofenylo)-imidazol ($\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$, m.cz. 449,36) (KomNMeI7). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 7.54 (s, 1H, C2im-H), 7.32 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, C2'-H), 7.11 (dd, $J = 6.5, 1.7$ Hz, 1H, C6'-H), 7.09 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, C6-H), 7.05 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, C2-H), 6.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, C5'-H), 3.96 (s, 3H, N1im- CH_3), 3.80 (s, 3H, C3-O CH_3), 3.65 (s, 3H, C4-O CH_3), 3.48 (s, 3H, C4'-O CH_3), 2.36 (s, 3H, C3'-S CH_3). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) ppm (δ): 156.55 (C3), 153.17 (C4'), 144.76 (C4), 137.22 (C2im), 136.53 (C4im), 131.87 (C5im), 128.71 (C1'), 128.38 (C1), 128.14 (C2'), 127.86 (C6), 122.90 (C3'), 122.37 (C6'), 117.43 (C5), 110.28 (C5'), 109.70 (C2), 60.56 (C4-O CH_3), 56.01 (C4'-O CH_3), 55.71 (C3-O CH_3), 32.16 (N1im- CH_3), 14.70 (C3'-S CH_3). FTIR ATR

(KBr) cm^{-1} : 3097 ($\nu \text{N}=\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 3005 ($\nu =\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$), 2930 (νCH_3), 2832 ($\nu \text{O-CH}_3$), 1562 ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1523 ($\nu \text{C}_{\text{Ar}}=\text{C}_{\text{Ar}}$), 1437 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1382 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$), 1249 ($\nu_{\text{as}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 1044 ($\nu_{\text{s}} \text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-C}$), 877 ($\gamma^{\text{oop}} =\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H}$). LRMS (EI) m/z 450,1 ($[\text{M}^+ + 2]$, 100%), 448,0 ($[\text{M}]^+$, 96,4%), 435,1 ($[\text{M}^+ + 2 - \text{CH}_3]$, 44,3%), 433,0 ($[\text{M-CH}_3]^+$, 43,3%). HRMS (EI) m/z obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$: 448,04507. Znaleziono: 448,04442.

4.6. Badania biologiczne

4.6.1. Badanie wpływu wybranych tiopochodnych RSV i CA-4 na proces polimeryzacji tubuliny *in vitro*

Badania wykonano we współpracy z Panią dr Renatą Mikstacką w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

4.6.1.1. Materiały i odczynniki

Do prowadzenia badań biologicznych wykorzystano zestaw HTS-Tubulin Polymerization Assay Kit [171] zawierający tubulinę wyizolowaną z mózgów wieprzowych o czystości ponad 97%. Powyższy zestaw składał się z:

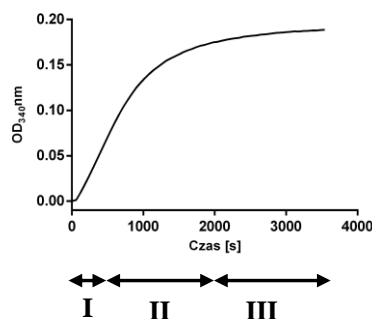
- HTS tubulin protein – zawierający 4.0mg tubuliny/fiolkę,
- GTP – guanozyno-5'-trifosforan (ang. *Guanosine Triphosphate*),
- GTB – bufor dla tubuliny (ang. *General Tubulin Buffer*) zawierający 80 mM PIPES, 2 mM MgCl_2 , 0,5 mM EGTA, pH 6,9,
- TGB – bufor glicerolowy dla tubuliny (ang. *Tubulin Glycerol Buffer*) zawierający 80 mM PIPES, 2 mM MgCl_2 , 0,5 mM EGTA, 60% v/v glicerol, pH 6,9,
- DMSO – dimetylosulfotlenek,
- Paklitaksel jako związek referencyjny.

Poza paklitaksellem jako związki referencyjne wykorzystywano uzyskaną na drodze syntezy kombretastatynę A-4 (**CA-4**).

4.6.1.2. Zasada metody

Oznaczenie procesu polimeryzacji tubuliny opiera się na zaadaptowanej oryginalnej metodzie opisanej w pracach Shelanskiego i wsp. [172] oraz Li i wsp. [173] mówiącej o zależności między rozproszeniem światła przez próbkę z tubuliną, które jest

proporcjonalne do ilości powstałego w trakcie polimeryzacji polimeru (mikrotubuli). Wyznaczona w ten sposób krzywa polimeryzacji tubuliny posiada trzy główne fazy: nukleację, wzrost i stan stacjonarny (Rysunek 26). Oznaczenie wpływu badanych związków na proces polimeryzacji tubuliny prowadzi się zatem turbidymetrycznie mierząc zmiany zmętnienia analizowanych próbek jako funkcję absorbancji (gęstości optycznej, OD – ang. *optical density*) w jednostce czasu. Zgodnie z informacjami podanymi przez producenta zestawu przyjmuje się, że zmętnienie jest proporcjonalne do masy polimeru, w przybliżeniu OD = 0,1 oznacza 1 mg masy polimeru na ml roztworu. Można więc powiedzieć, że pod wpływem badanego związku masa polimeru (wartość maksymalna) maleje lub rośnie.



Rysunek 26. Standardowa reakcja polimeryzacji wg producenta zestawu. Numerami rzymskim zaznaczono trzy fazy polimeryzacji: I (nukleację), II (wzrost), III (stabilizację)

4.6.1.3. Metodyka

Ocena wpływu otrzymanych związków na proces polimeryzacji tubuliny prowadzona była wobec związków referencyjnych: paklitakselu jako związku stymulującego polimeryzację tubuliny oraz CA-4 jako inhibitora polimeryzacji tubuliny oraz kontroli. Ocenie poddano:

- najbardziej cytotoksyczne tiopochodne RSV a więc związki **S7** i **S8** wobec paklitakselu,
- wszystkie otrzymane tiopochodne CA-4.

Ogólne warunki prowadzenia oznaczeń

- | | |
|-----------------------------|-------------------|
| a. Temperatura | 36,5-37,5°C |
| b. Czas prowadzenia badania | 60 minut |
| c. Interwał czasowy | 60 sekund |
| d. Detekcja/Długość fali | Absorbancja/340nm |

Pomiary wykonywano przy użyciu spektrofotometru Infinite M200 firmy TECAN.

Oznaczenie wpływu badanych związków na proces polimeryzacji tubuliny dokonywano każdorazowo wobec kontroli oraz związku referencyjnego. Dla każdego stężenia wykonano 2 powtórzenia próby.

Z uwagi, iż podstawowymi parametrami opisującymi proces polimeryzacji tubuliny są wartość maksymalna OD_{340nm} , czas jej osiągnięcia oraz szybkość zachodzenia procesu, w celu porównania aktywności badanych pochodnych posługiwano się wartościami szybkości polimeryzacji wyznaczonymi jako iloraz zmiany gęstości optycznej [ΔOD_{340nm}] w jednostce czasu [min] dla prostoliniowego odcinka fazy wzrostu. Wyrażono je jako procent wartości kontrolnej. Wykresy prezentujące przebieg krzywych polimeryzacji tubuliny jako zależność gęstości optycznej OD w funkcji czasu oraz wartości IC_{50} dla wybranych związków uzyskano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism [174].

4.6.2. Badanie cytotoksyczności tiopochodnych RSV i CA-4 (test żywotności komórek – MTT) *in vitro*

Badania wykonane zostały dzięki współpracy z Panem dr hab. Markiem Muriasem w Katedrze Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz dr Michałem Cichockim w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Badania cytotoksyczności pochodnych RSV przeprowadzono na wybranych liniach komórkowych:

1. Nowotworowych:

- A439 – raka skóry,
- MCF7 – raka piersi linii estrogenozależnej,
- MDA-MB-231 – raka piersi linii estrogenoniezależnej.

2. Prawidłowych:

- HaCaT – keratynocytów.

Badania cytotoksyczności pochodnych CA-4 przeprowadzono na następujących liniach komórkowych:

1. Nowotworowych:

- A431 – raka skóry,
- MCF7 – raka piersi linii estrogenozależnej,
- MDA-MB-231 – raka piersi linii estrogenoniezależnej,
- HeLa – raka szyjki macicy,

- A549 – raka płuc,
- SKOV3 – raka jajnika.

2. Prawidłowych:

- HaCaT – keratynocytów,
- CCD39Lu – fibroblastów płuc.

4.6.2.1. Materiały i odczynniki

Komórki nowotworowe i prawidłowe w zależności od linii komórkowej zostały zakupione:

Komórki nowotworowe linii:

- A431 (Cell Lines Service, Niemcy),
- MCF7 (DMSZ, Niemcy),
- MDA-MB-231 (DMSZ, Niemcy),
- HeLa (The European Collection of Cell Cultures – ECACC, Sigma-Aldrich),
- A549 (The European Collection of Cell Cultures – ECACC, Sigma-Aldrich).

Komórki prawidłowe:

- HaCaT (Cell Lines Service, Niemcy),
- CCD39Lu (The European Collection of Cell Cultures – ECACC, Sigma-Aldrich).

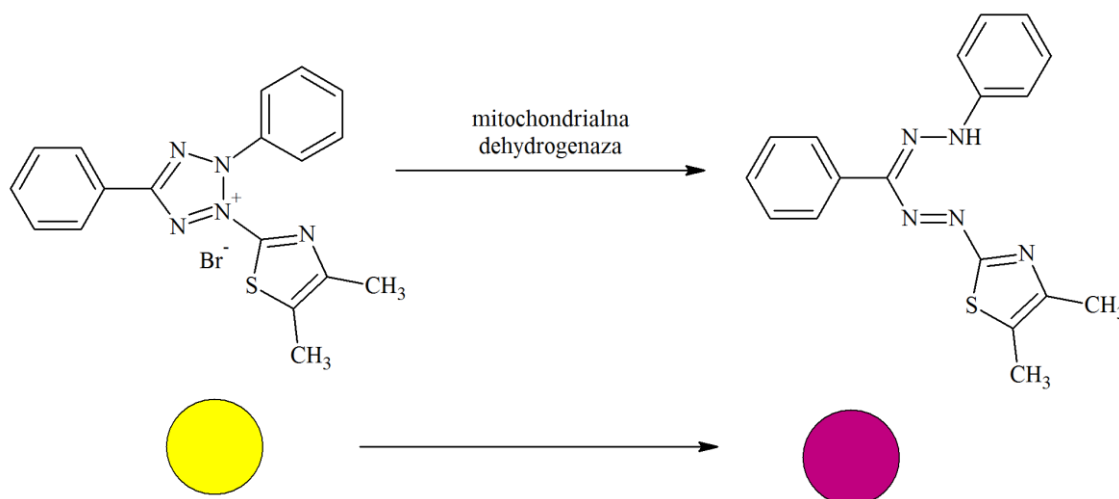
Odczynniki:

- roztwór 0,25% trypsyny,
- PBS,
- pożywka DMEM z dodatkiem 10% FBS i 1% mieszaniny antybiotyków (streptomycyna, penicylina i amfoterycyna B),
- PBS z dodatkiem 0.1% EDTA,
- MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy),
- izopropanol zakwaszony stężonym HCl,
- DMSO.

Odczynniki oraz RSV jako związek referencyjny zakupiono w firmie Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA).

4.6.2.2. Zasada metody MTT

Metoda MTT oparta jest na założeniu, że do przeprowadzenia obserwowanej w niej reakcji zdolne są tylko żywe komórki. W wyniku działania obecnej w komórkach mitochondrialnej dehydrogenazy, żółta rozpuszczalna w wodzie sól błękitu tetrazolowego (MTT) przekształcana jest do purpurowych, nierozpuszczalnych w wodzie kryształów formazanu (Rysunek 27). Po zmianie środowiska i rozpuszczeniu kryształów w izopropanolu lub DMSO powstaje barwny roztwór. Mierzona spektrofotometrycznie intensywność zabarwienia roztworu jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego produktu. Z pomiarów absorbancji oblicza się procent przeżywalności komórek w obecności badanych związków w stosunku do komórek kontrolnych.



Rysunek 27. Konwersja soli błękitu tetrazolowego (MTT) do formazanu

4.6.2.3. Metodyka

Hodowla komórek badanych linii

Komórki hodowano w pożywce płynnej na bazie DMEM (medium Eagle'a w modyfikacji Dulbecco) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz antybiotyków. Hodowlę prowadzono w inkubatorze, w warunkach standardowych (37°C, 5% CO₂), wymieniając medium co 2-3 dni. Komórki linii HaCaT wymagały stosowania roztworu PBS z dodatkiem 0.1% EDTA i dodatkowej inkubacji komórek przy wymianie medium przez 10 minut w PBS z EDTA, celem obniżenia stężenia wolnych jonów wapnia. Wszystkie zabiegi na komórkach wykonywano pod lożą z nawiewem laminarnym, z zachowaniem atmosfery sterylnej. Po uzyskaniu ciągłej, pojedynczej warstwy komórek, medium usuwano, a następnie komórki przemywano

dwukrotnie PBS, w celu wypłukania pożywki i usunięcia martwych komórek. Zawiesinę komórek otrzymywano w wyniku nadtrawiania ich w inkubatorze przez 5-7 minut roztworem trypsyny inaktywowanym przez dodatek medium. Zawiesinę wirowano w probówce typu Falcon w temperaturze pokojowej przy 500 g w czasie 10 minut. Komórki zostały zliczone przy użyciu hemocytometru pod odwróconym mikroskopem. Supernatant usuwano, a zawiesinę komórek uzupełniano medium do otrzymania pożądanej liczby CFU (jednostek tworzących kolonię, ang. *colony forming unit*) w 1 ml, po czym przenoszono do butelek hodowlanych lub na płytki 96-cio dołkowe określonej objętości uzyskanej zawiesiny.

Badanie cytotoksyczności pochodnych RSV i CA-4 za pośrednictwem testu MTT

Komórki wysiewano na 96-studzienkowe płytki w liczbie 10000 CFU na każdą studzienkę. Inkubowano 24-godziny, po czym odciągano pożywkę (200 μ l) i dodawano badane związki w stężeniach w zakresie 0-200 μ M (w przypadku tiopochodnych RSV) lub w zakresie 0-20 μ M (w przypadku tiopochodnych CA-4). Po 48-mio godzinnej (w przypadku tiopochodnych CA-4) lub 72 godzinnej (w przypadku tiopochodnych RSV) inkubacji studzienki przemyto trzykrotnie buforem PBS (200 μ l, temp. 37°C), a następnie dodano roztwór MTT (0,5 mg/ml). Próby poddano kolejnej 4-godzinnej inkubacji, po czym usunięto pożywkę i dodano po 150 μ l DMSO w celu rozpuszczenia powstałych kryształków formazanu. Następnie płytki wytrząsano przez 20 minut. Pomiar absorbancji wykonano przy użyciu spektrofotometru Tecan Infinite M200 (długość fali $\lambda = 570$ nm, długość fali odniesienia $\lambda = 690$ nm). Wyniki podano jako procent grupy kontrolnej (komórki inkubowane bez badanych związków) wobec związków referencyjnych RSV, CA-4 lub nokodazolu. Dla każdego stężenia wykonano 3 powtórzenia próby, a każda inkubacja wykonywana była w trzech niezależnych eksperymentach. Wykresy prezentujące wyniki testu MTT oraz wartości IC_{50} uzyskano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism [174].

5. WYNIKI I DYSKUSJA

W rozdziale zaprezentowana została procedura otrzymywania tiopochodnych RSV i CA-4 wraz z wynikami ich aktywności przeciwnowotworowej opartej o testy cytotoksyczności oraz wpływ na proces polimeryzacji tubuliny *in vitro*. Przedstawiono również protokół VCL-VS, narzędzia do tworzenia i skriningu wirtualnych bibliotek kombinatorycznych dla nowych tiopochodnych CA-4.

5.1. Synteza tiopochodnych RSV

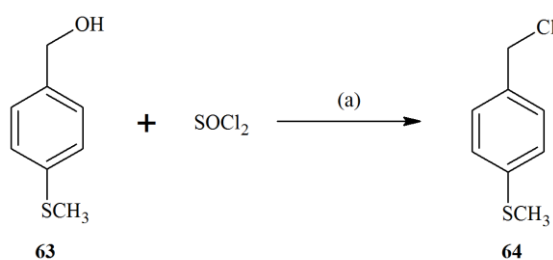
Wysoka aktywność cytotoksyczna i chemoprewencyjna metoksy pochodnych RSV oraz doniesienia naukowe [72, 73, 74] mówiące, iż jednym z mechanizmów działania przeciwnowotworowego jest ich wpływ na proces polimeryzacji tubuliny stanowią podstawę do dalszych badań w tym zakresie. Przesłanką przy wyborze tiopochodnych RSV, które zostały otrzymane i przebadane w niniejszej rozprawie doktorskiej są intensywne badania nad tą grupą związków prowadzone w naszej Katedrze pod kątem ich aktywności chemoprewencyjnej. Udowodniły one, iż tiopochodne RSV wykazują silniejszy od RSV efekt hamowania w stosunku do izoenzymów CYP1A1, CYP1A2 oraz CYP1B1 [18, 69]. Brak jest jednocześnie badań, co do aktywności cytotoksycznej tych związków. Ponadto badania naukowe prowadzone przez Yanga i wsp. [100] dowodzą, iż modyfikacje strukturalne RSV polegające na wymianie grupy hydroksylowej w pozycji 4' na podstawnik metylotiolowy prowadzą do obniżenia toksyczności uzyskanych pochodnych w stosunku do zdrowych komórek nerki ludzkiego embrionu (HEK 293).

Biorąc pod uwagę powyższe informacje przeprowadzono modyfikacje strukturalne RSV, w których grupa hydroksylowa w pierścieniu B została podstawiona grupą metylotiolową a pierścień A został podstawiony grupami metoksyłowymi w różnej ilości i konfiguracji. W celu otrzymania tiopochodnych RSV będących dokładnie rzecz biorąc pochodnymi (E)-4'-metylotiostilbenu posłużono się metodą HWE (rozdz. 2.4.3, str. 64). Wybór tej metody podyktowany był jej wysoką stereoselektywnością w kierunku izomerów (E)-stilbenu, stosunkowo wysoką wydajnością, jak również dostępnością niezbędnych odczynników.

5.1.1. Synteza 4-metylotiobenzylfosfonianu dietylu (Fos1)

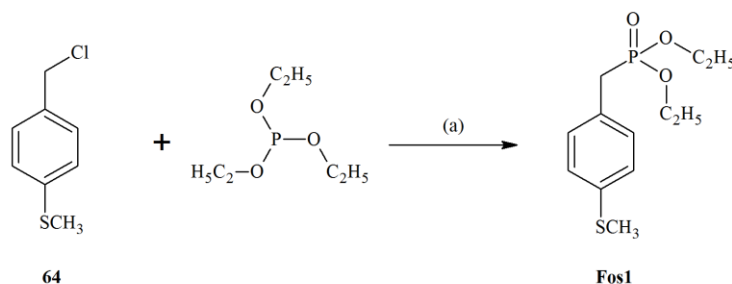
Pierwszy etap syntezy tiopochodnych RSV wymagał zgodnie z metodyką reakcji HWE otrzymania odpowiednio podstawionej pochodnej halogenku benzyłowego, który następnie w reakcji Michaelisa-Arbuzova z trietylofosforynem przekształcany był do pochodnej benzylofosfonianowej.

Związkiem wyjściowym był chlorek 4-metylotiobenzylowy **64**, który otrzymano wykorzystując komercyjnie dostępny alkohol 4-metylotiobenzylowy **63** oraz chlorek tionylu (Schemat 18) zgodnie z procedurą syntetyczną przedstawioną przez Ranatunge i wsp. [161]. Podczas wkraplania chlorku tionylu obserwowano stopniową zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej z bezbarwnej do intensywnie żółtej oraz wydzielanie chlorowodoru. Surowy produkt oczyszczono na drodze destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem co pozwoliło na otrzymanie czystego chromatograficznie (TLC) oleistego produktu **64**, który skryształizował po ochłodzeniu z wysoką wydajnością wynoszącą 83%.



Schemat 18. Synteza chlorku 4-metylotiobenzylowego **64**. Reagenty i warunki reakcji: (a) toluen, 30 minut, temp. pok., wyd. 83%

W kolejnym etapie uzyskany chlorek 4-metylotiobenzylowy **63** poddano reakcji z trietylofosforynem zgodnie z procedurą opisaną przez Ulmana i wsp. [162]. Surowy produkt podobnie jak w poprzednim przypadku oczyszczano na drodze destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując czystą chromatograficznie (TLC) opalizującą oleistą ciecz 4-metylotiobenzylfosfonianu dietylu **Fos1** z 80% wydajnością (Schemat 19). Uzyskany produkt scharakteryzowano za pomocą widm ¹H i ¹³C NMR oraz EI MS. W widmie masowym poza pikiem jonu molekularnego przy m/z = 274 zaobserwowano pik jonu fragmentacyjnego m/z = 136,9 pochodzącego od ugrupowania 4-metylotiobenzylowego [CH₃SPhCH₂]⁺.

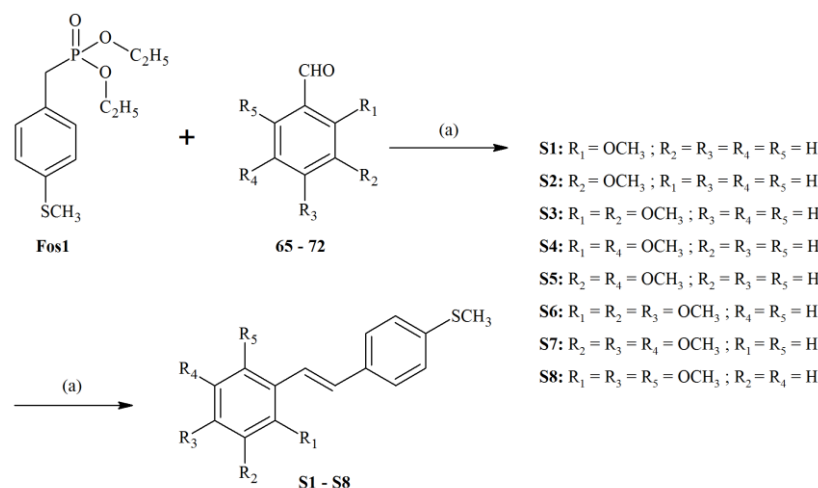


Schemat 19. Synteza 4-metylotiobenzylfosfonianu dietylu **Fos1**. Warunki reakcji: (a) 2 godziny, temp. 170°C, wyd. 80%

5.1.2. Generalna procedura syntezy tiopochodnych RSV (S1-S8)

Końcowym etapem syntezy tiopochodnych RSV była reakcja kondensacji pochodnej fosfonianowej **Fos1** z handlowo dostępnymi aldehydami benzoowymi a mianowicie:

2-metoksybenzaldehydem **65** w przypadku związku **S1**, 3-metoksybenzaldehydem **66** dla **S2**, 2,3-dimetoksybenzaldehydem **67** dla **S3**, 2,5-dimetoksybenzaldehydem **68** dla **S4**, 3,5-dimetoksybenzaldehydem **69** dla **S5**, 2,3,4-dimetoksybenzaldehydem **70** dla **S6**, 3,4,5-trimetoksybenzaldehydem **71** dla **S7** oraz 2,4,5-trimetoksybenzaldehydem **72** w przypadku związku **S8**. Zoptymalizowana, generalna reakcja syntezy tiopochodnych RSV prowadzona była w bezwodnym DMF w obecności zasady - wodoru sodowego (Schemat 20). Najpierw do zawiesiny wodoru sodu w DMF w temperaturze 0 do -5°C wkroplono roztwór **Fos1** w DMF, co pozwoliło na generowanie *in situ* reaktywnego karboanionu fosforylowego. Reakcję prowadzono przez 30 minut. Następnie utrzymując temperaturę w tym samym zakresie wkraplano roztwór odpowiedniego benzaldehydu w DMF i dalej reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1,5 godziny. Otrzymane surowe tiopochodne RSV każdorazowo oczyszczano przez krystalizację z 96% etanolu. Wydajność w zależności od uzyskanej pochodnej wahała się w granicach 50-75%.



Schemat 20. Synteza tiopochodnych RSV **S1-S8**. Reagenty i warunki reakcji: (a) NaH, DMF, 2 godz., temp. 0 – 25°C, wyd. 50-75%

Uzyskane tiopochodne RSV (**S1-S8**) wraz z wydajnościami reakcji oraz temperaturami topnienia zestawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Otrzymane tiopochodne RSV **S1-S8**

Symbol	Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Wydajność [%]	Temperatura topnienia [°C]
S1	(E)-2-metoksy-4'-metylotiostilben	(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2-metoksyfenylo)eten	60	87-89
S2	(E)-3-metoksy-4'-metylotiostilben	(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3-metoksyfenylo)eten	55	92-94
S3	(E)-2,3-dimetoksy-4'-metylotiostilben	(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,3-dimetoksyfenylo)eten	50	83-85
S4	(E)-2,5-dimetoksy-4'-metylotiostilben	(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,5-dimetoksyfenylo)eten	62	58-60
S5	(E)-3,5-dimetoksy-4'-metylotiostilben	(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3,5-dimetoksyfenylo)eten	58	81-83
S6	(E)-2,3,4-trimetoksy-4'-metylotiostilben	(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,3,4-trimetoksyfenylo)eten	70	144-146
S7	(E)-3,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben	(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten	75	111-113
S8	(E)-2,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben	(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,4,5-trimetoksyfenylo)eten	65	113-115

Wszystkie związki scharakteryzowano za pomocą widm ^1H NMR i ^{13}C NMR, widm IR, nisko- i wysokorozdzielczych widm masowych oraz współczynnika R_f . W przypadku wysokorozdzielczych widm masowych uzyskane wartości zmierzonych mas jonu molekularnego badanych związków były w pełni zgodne z ich wartościami teoretycznymi. Na widmach ^1H NMR zaobserwowano m.in. charakterystyczną stałą sprzężenia protonów winylowych dla układu (E)-stilbenu w zakresie 16,3-16,5 Hz.

Badanie monokryształów otrzymanych tiopochodnych RSV

Uzyskane związki krystalizowano ponownie z 96% etanolu w celu osiągnięcia kryształów nadających się do pomiarów rentgenostrukturalnych. Dla związków **S1**, **S2**, **S3**, **S4**, **S6**, **S7** i **S8** uzyskano monokryształy o odpowiedniej jakości. Zostały one przekazane do badań rentgenostrukturalnych Pani mgr Agnieszce Gielarze-Korzańskiej przy współpracy z Panem mgr Arturem Korzańskim, które wykonano z wykorzystaniem dyfraktometru Excalibur z detektorem Atlas w Zakładzie Kryystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Dane kryystalograficzne zaprezentowano w tabelach 6-12. Potwierdziły one otrzymanie układu (E)-stilbenowego, w każdym z analizowanych związków, o czym świadczy konfiguracja obu pierścieni fenyłowych w stosunku do grupy winylowej. Struktury kryystalograficzne badanych związków oraz ich upakowania wzdłuż wybranego kierunku zaprezentowano na rysunkach 28-41.

Tabela 6. Dane krystalograficzne dla związku **S1**

Wzór cząsteczkowy	$C_{16}H_{16}OS$	
Masa cząsteczkowa	256,35	
Temperatura	100(10) K	
Układ krystalograficzny	Rombowy	
Grupa przestrzenna	$P2_12_12_1$	
Parametry komórki elementarnej	$a = 5.4596(4) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 9.6038(6) \text{ \AA}$	$\beta = 90^\circ$
	$c = 25.023(2) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Objętość	$1312.02(16) \text{ \AA}^3$	
Z	4	
Gęstość obliczona	1.298 Mg/m^3	
Współczynnik absorpcji	0.231 mm^{-1}	
Liczba refleksów zmierzona/użyta	3233/2170	

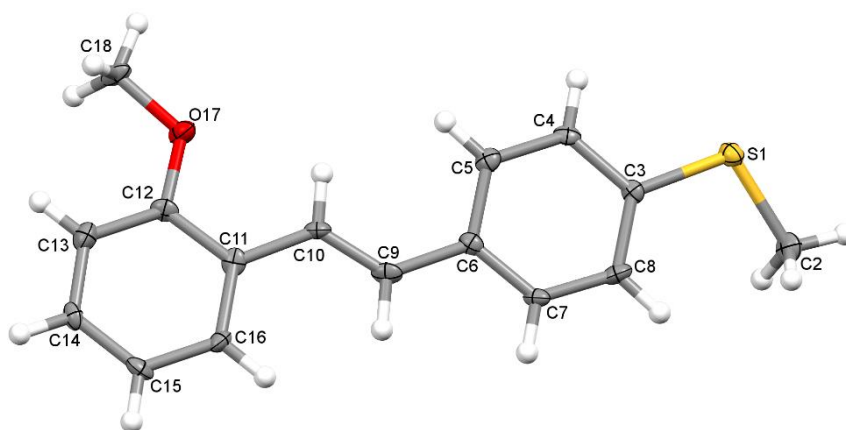
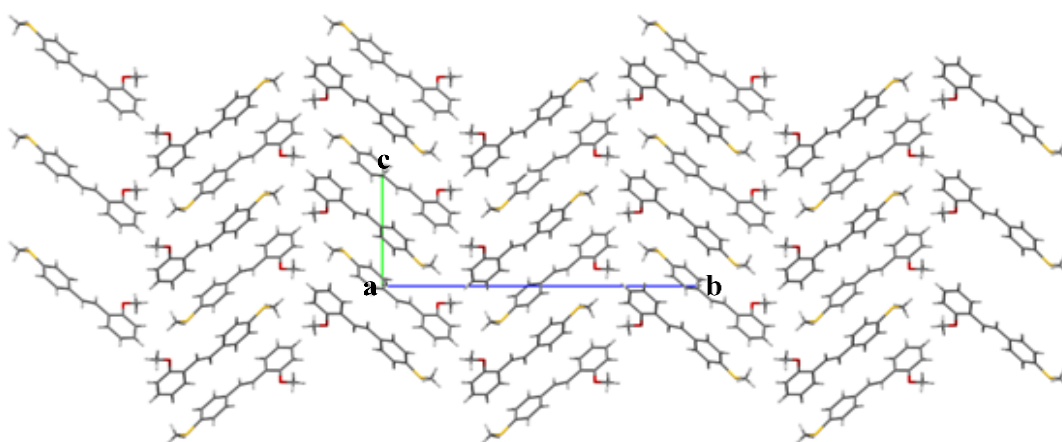
**Rysunek 28.** Struktura krystalograficzna związku **S1****Rysunek 29.** Upakowanie cząsteczek związku **S1** wzdłuż kierunku [100]

Tabela 7. Dane krystalograficzne dla związku **S2**

Wzór cząsteczkowy	$C_{16}H_{16}OS$	
Masa cząsteczkowa	256,37	
Temperatura	100,02(10) K	
Układ krystalograficzny	Rombowy	
Grupa przestrzenna	$P2_12_12_1$	
Parametry komórki elementarnej	$a = 5.1304(4) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 9.0986(6) \text{ \AA}$	$\beta = 90^\circ$
	$c = 28.326(2) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Objętość	$1322,2(16) \text{ \AA}^3$	
Z	4	
Gęstość obliczona	1.288 Mg/m^3	
Współczynnik absorpcji	0.229 mm^{-1}	
Liczba refleksów zmierzona/użyta	3418/2559	

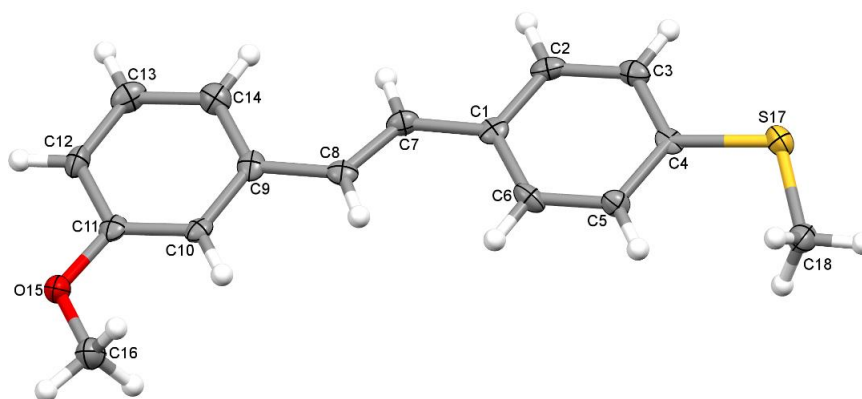
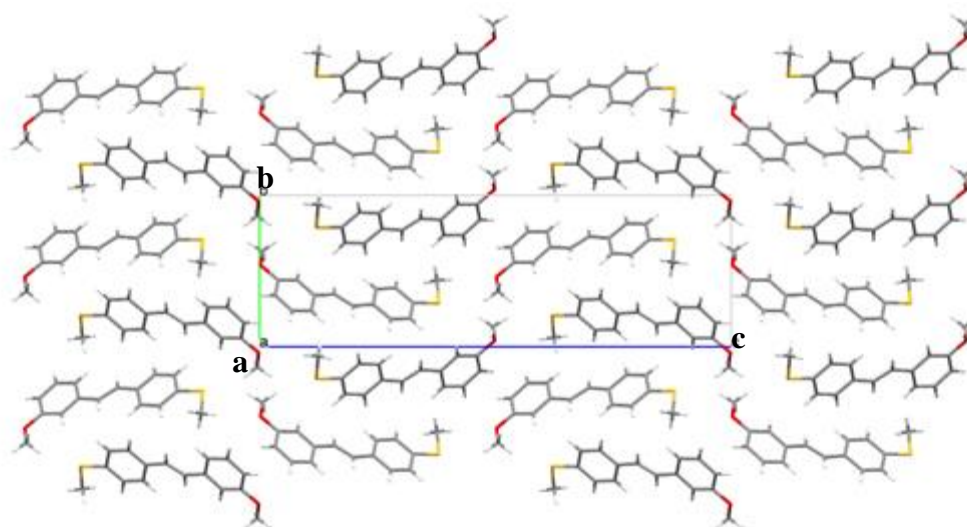
**Rysunek 30.** Struktura krystalograficzna związku **S2****Rysunek 31.** Upakowanie cząsteczek związku **S2** wzdłuż kierunku [100]

Tabela 8. Dane krystalograficzne dla związku **S3**

Wzór cząsteczkowy	$C_{17}H_{18}O_2S$	
Masa cząsteczkowa	286,37	
Temperatura	100(1) K	
Układ krystalograficzny	Jednoskośny	
Grupa przestrzenna	$P2_1/n$	
Parametry komórki elementarnej	$a = 14,083 \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 7,749 \text{ \AA}$	$\beta = 90^\circ$
	$c = 14,642 \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Objętość	$1432,1 \text{ \AA}^3$	
Z	4	
Gęstość obliczona	1.328 Mg/m^3	
Współczynnik absorpcji	0.224 mm^{-1}	
Liczba refleksów zmierzona/użyta	5075/2518	

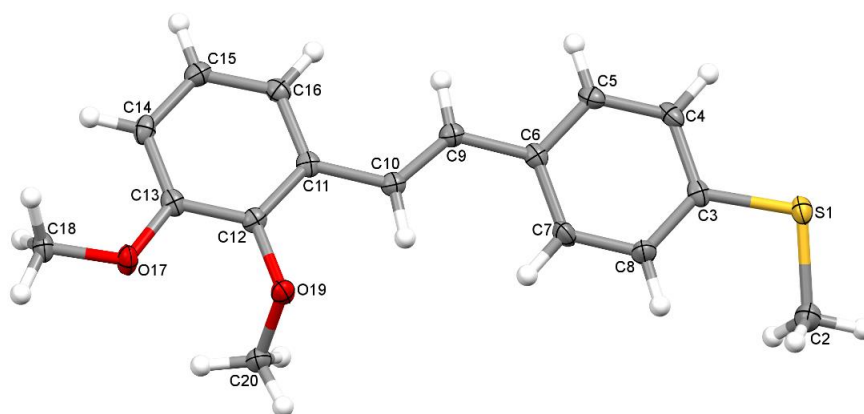
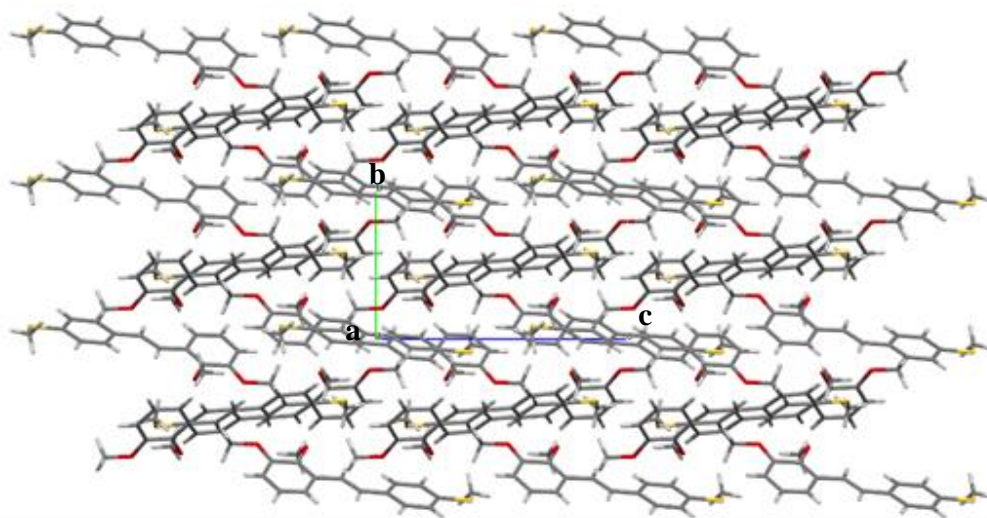
**Rysunek 32.** Struktura krystalograficzna związku **S3****Rysunek 33.** Upakowanie cząsteczek związku **S3** wzdłuż kierunku [100]

Tabela 9. Dane krystalograficzne dla związku **S4**

Wzór cząsteczkowy	$C_{17}H_{18}O_2S$
Masa cząsteczkowa	286,37
Temperatura	100(1) K
Układ krystalograficzny	Rombowy
Grupa przestrzenna	$Pna2_1$
Parametry komórki elementarnej	$a = 18,4069(4) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$
	$b = 10,9192(2) \text{ \AA}$ $\beta = 116,33^\circ$
	$c = 7,3882(2) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$
Objętość	$1484,94(6) \text{ \AA}^3$
Z	4
Gęstość obliczona	$1,281 \text{ Mg/m}^3$
Współczynnik absorpcji	$0,217 \text{ mm}^{-1}$
Liczba refleksów zmierzona/użyta	9478/2590

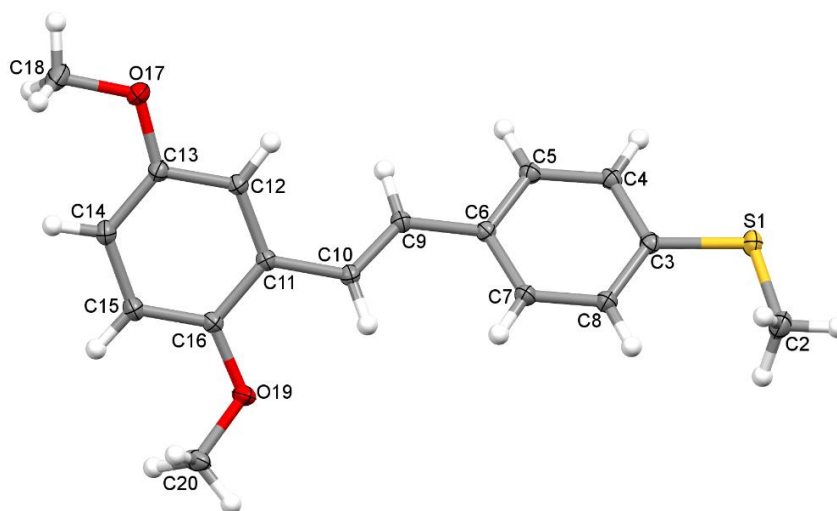
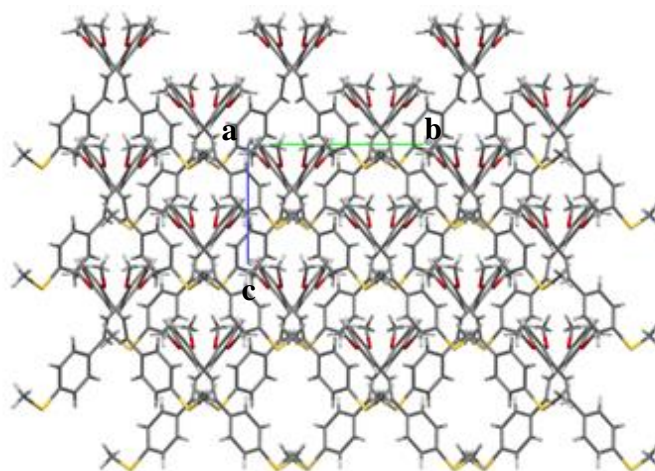
**Rysunek 34.** Struktura krystalograficzna związku **S4****Rysunek 35.** Upakowanie cząsteczek związku **S4** wzdłuż kierunku [100]

Tabela 10. Dane krystalograficzne dla związku **S6**

Wzór cząsteczkowy	$C_{18}H_{20}O_3S$
Masa cząsteczkowa	316,40
Temperatura	293(2) K
Układ krystalograficzny	Jednoskośny
Grupa przestrzenna	$P2_1/c$
Parametry komórki elementarnej	$a = 13,9633(4) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$
	$b = 7,7094(2) \text{ \AA}$ $\beta = 90,705(3)^\circ$
	$c = 15,1518(4) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$
Objętość	$1630,95(8) \text{ \AA}^3$
Z	4
Gęstość obliczona	$1,289 \text{ Mg/m}^3$
Współczynnik absorpcji	$0,208 \text{ mm}^{-1}$
Liczba refleksów zmierzona/użyta	8931/2862

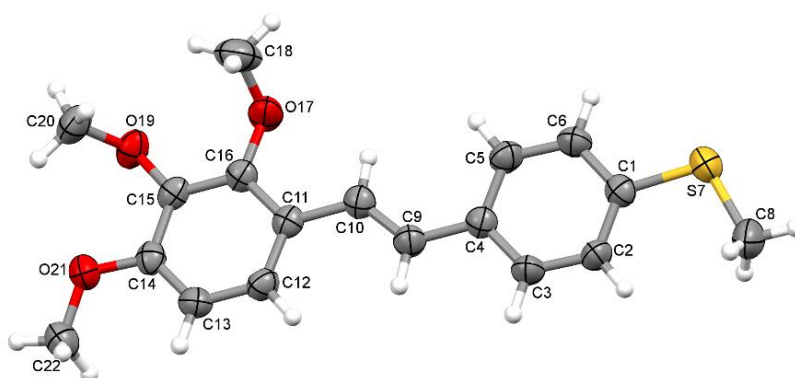
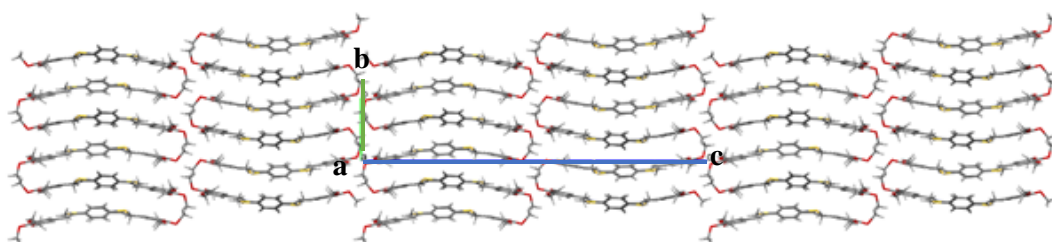
**Rysunek 36.** Struktura krystalograficzna związku **S6****Rysunek 37.** Upakowanie cząsteczek związku **S6** wzdłuż kierunku [001]

Tabela 11. Dane krystalograficzne dla związku **S7**

Wzór cząsteczkowy	$C_{18}H_{20}O_3S$	
Masa cząsteczkowa	316,40	
Temperatura	100(1) K	
Układ krystalograficzny	Jednoskośny	
Grupa przestrzenna	$P2_1/n$	
Parametry komórki elementarnej	$a = 10,9246(4) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 7,2696(3) \text{ \AA}$	$\beta = 93,111(4)^\circ$
	$c = 40,2909(17) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Objętość	$3195,1(2) \text{ \AA}^3$	
Z	8	
Gęstość obliczona	$1,316 \text{ Mg/m}^3$	
Współczynnik absorpcji	$0,213 \text{ mm}^{-1}$	
Liczba refleksów zmierzona/użyta	12159/5629	

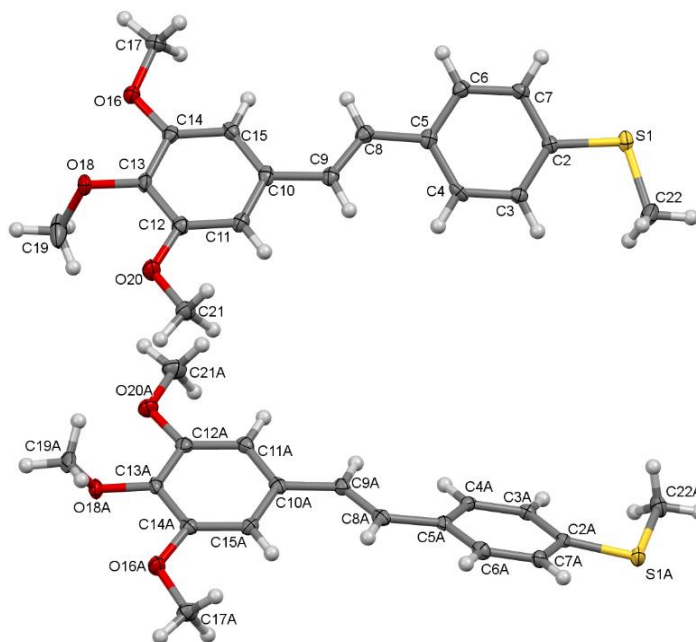
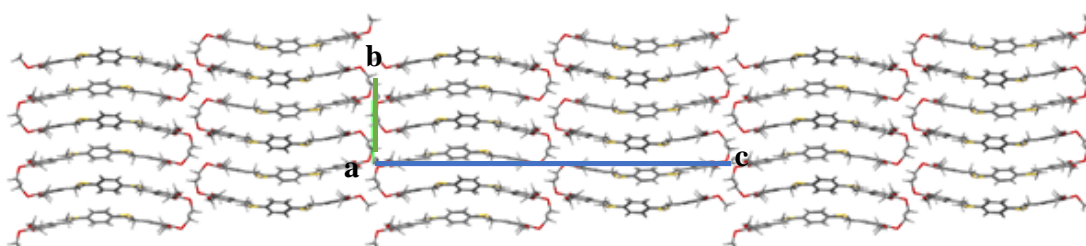
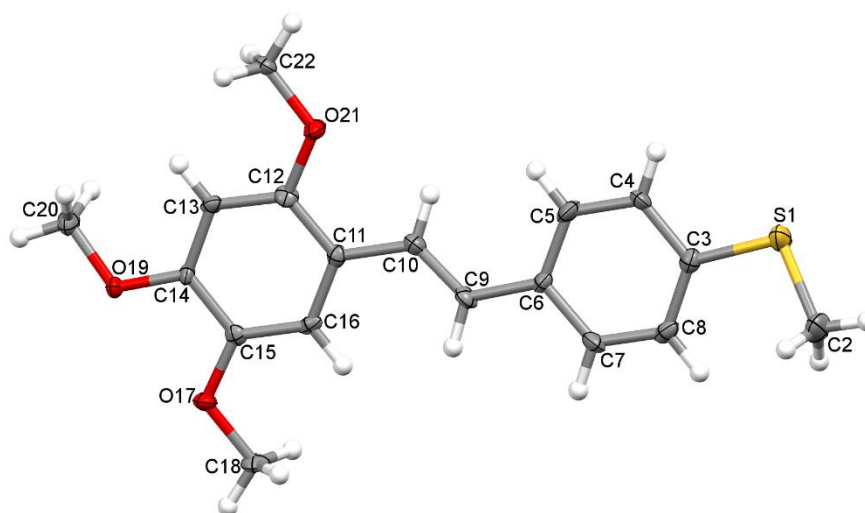
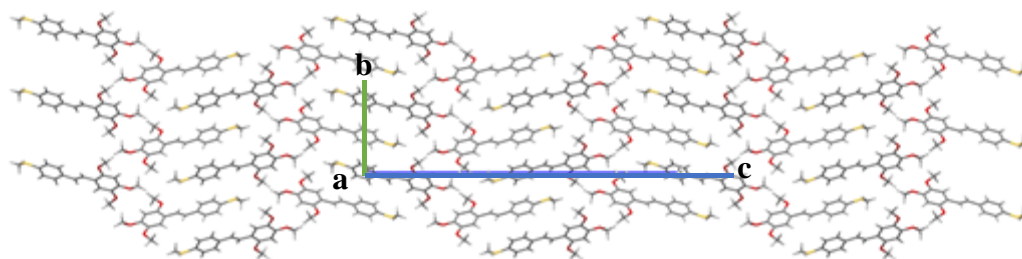
**Rysunek 38.** Struktura krystalograficzna związku **S7****Rysunek 39.** Upakowanie cząsteczek związku **S7** wzdłuż kierunku [100]

Tabela 12. Dane krystalograficzne dla związku **S8**

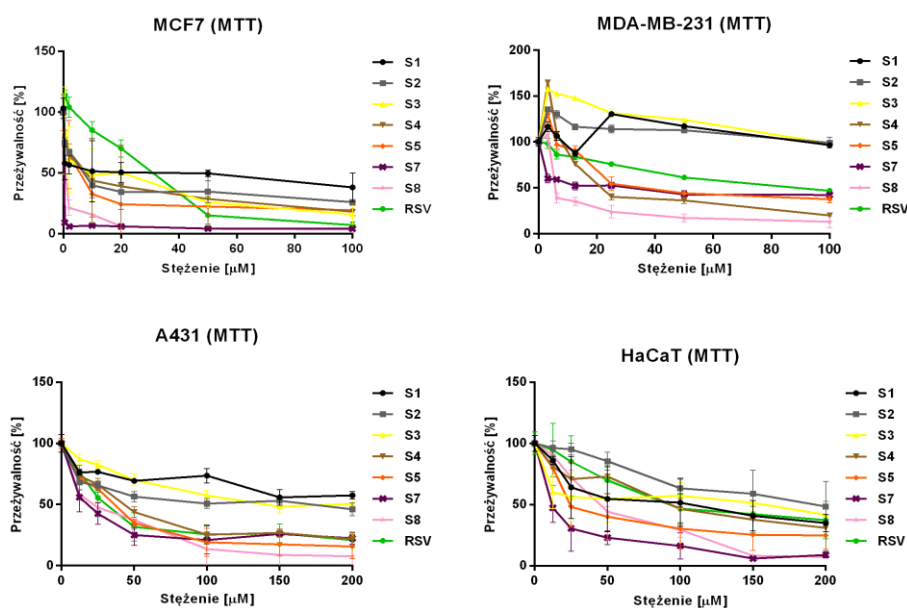
Wzór cząsteczkowy	$C_{18}H_{20}O_3S$	
Masa cząsteczkowa	316,40	
Temperatura	100(1) K	
Układ krystalograficzny	Rombowy	
Grupa przestrzenna	$P2_12_12_1$	
Parametry komórki elementarnej	$a = 5,3187(3) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 8,3866(7) \text{ \AA}$	$\beta = 90^\circ$
	$c = 36,019(2) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Objętość	$1606,67(19) \text{ \AA}^3$	
Z	4	
Gęstość obliczona	$1,308 \text{ Mg/m}^3$	
Współczynnik absorpcji	$0,211 \text{ mm}^{-1}$	
Liczba refleksów zmierzona/użyta	8566/2813	

**Rysunek 40.** Struktura krystalograficzna związku **S8****Rysunek 41.** Upakowanie cząsteczek związku **S8** wzdłuż kierunku [100]

5.2. Badania biologiczne tiopochodnych RSV

Badanie cytotoksyczności *in vitro* (test żywności komórek – MTT)

Otrzymane tiopochodne RSV zostały następnie przebadane pod kątem ich aktywności cytotoksycznej na wybranych liniach komórek nowotworowych: MCF7, MDA-MB-231 oraz A439 i prawidłowych HaCaT. Przebadano wszystkie związki z wyjątkiem pochodnej **S6**, co wynikało z problemów z jej bardzo słabą rozpuszczalnością w DMSO używanym jako medium do przygotowywania roztworów badanych prób związków. W tym celu posłużono się testem MTT, który pozwala określić procent przeżywalności komórek w stosunku do kontroli w funkcji stężenia badanych związków (zasada metody została opisana w rozdziale 4.6.2.2, str. 122). Przeprowadzenie prób testów MTT dla poszczególnych linii komórkowych pozwoliło określić odpowiedni zakres stężeń związków badanych i związku referencyjnego (RSV) a mianowicie: dla linii MCF7 oraz MDA-MB-231 wyniósł on od 0-100 μM a dla linii A439 oraz HaCaT od 0-200 μM . Inkubacja związków badanych oraz związku referencyjnego w każdym teście wynosiła 72 godziny. Dla każdego stężenia wykonano 3 powtórzenia próby, a każda inkubacja wykonywana była w trzech niezależnych eksperymentach. Wyniki testów MTT pokazujących wpływ badanych związków na procent przeżywających komórek (100% przyjęto dla grupy kontrolnej, w której stężenie badanego związku wynosiło 0 μM) przedstawiono na rysunku 42.



Rysunek 42. Wpływ tiopochodnych RSV na przeżywalność komórek badanych linii (test MTT, 72 godz.)

Na podstawie wyników testu MTT wyznaczono wartości IC_{50} (spadek przeżywalności komórek o 50% w stosunku do kontroli) a ich wyniki zestawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Wyznaczone wartości IC_{50} tiopochodnych RSV

Związek	Linia, $IC_{50} \pm SD$ [μM]			
	MCF7	MDA-MB-231	A431	HaCaT
RSV	24.59 \pm 3.82	46.12 \pm 14.90	49.44 \pm 3.76	85.23 \pm 29.17
S1	27.30 \pm 12.42	> 100	241.28 \pm 9.95	106.38 \pm 93.02
S2	6.60 \pm 3.68	> 100	141.28 \pm 2.80	182.66 \pm 38.71
S3	10.60 \pm 6.14	> 100	157.28 \pm 3.01	51.75 \pm 7.27
S4	10.18 \pm 6.55	32.44 \pm 14.34	47.05 \pm 9.03	65.00 \pm 24.45
S5	4.78 \pm 3.36	39.50 \pm 13.13	45.47 \pm 7.24	25.38 \pm 13.87
S7	2.07 \pm 0.39	12.61 \pm 1.58	19.29 \pm 5.51	9.87 \pm 4.64
S8	5.08 \pm 1.41	10.44 \pm 3.58	22.58 \pm 7.18	50.91 \pm 13.32

Uzyskane wyniki aktywności antyproliferacyjnej przebadanych tiopochodnych RSV świadczą o zależności pomiędzy liczbą podstawników metoksyowych a ich cytotoksycznością: najniższa jest dla monometoksyowych tiopochodnych RSV (**S1** i **S2**) a największa dla trimetoksyowych pochodnych (**S7** i **S8**). Ponadto związki najbardziej aktywne **S7** ((E)-3,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben) oraz **S8** ((E)-2,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben) wykazują kilkakrotnie wyższą aktywność w stosunku do RSV. Największą aktywność spośród wszystkich badanych linii komórkowych związki wykazywały w stosunku do linii estrogenozależnej MCF7, co może wynikać z ich strukturalnego podobieństwa do dietylostilbestrolem (DES) **28**, syntetycznego odpowiednika żeńskiego hormonu płciowego – estradiolu **27**. Aktywność trimetoksyowych pochodnych (E)-4'-metylotiostilbenu koreluje z podobnymi aktywnościami metoksypochodnych RSV, które zostały opisane w literaturze, jak prace Mazue i wsp., Cushman i wsp. [76, 112]. Jakkolwiek pochodna **S7** będąca tioanalogiem opisanego w części literaturowej związku **DMU-212** ((E)-3,4,4',5-tetrametoksystilben) (rozdział 2.3.5.1, str. 48) charakteryzuje się wyższą od niego aktywnością w stosunku do linii komórek MCF7 i MDA-MB-231 a mianowicie $IC_{50}(MCF7) = 2,07 \mu M$ vs $9,9 \mu M$ oraz $IC_{50}(MDA-MB-231) = 5,08 \mu M$ vs $50 \mu M$ [**Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.**]. W odniesieniu do aktywności badanych związków w stosunku do linii komórek prawidłowych keratynocytów HaCaT najniższą cytotoksyczność wykazują związki **S1** i **S2**, które jednocześnie wykazują również słabą aktywność na badanych

liniach komórek nowotworowych. Również pozostałe związki nie wykazują wyraźnego selektywnego działania na komórki nowotworowe. Jedynie związek **S8** wykazuje dziesięciokrotnie wyższą aktywność cytotoksyczną na linii MCF-7 w odniesieniu do komórek prawidłowych HaCaT.

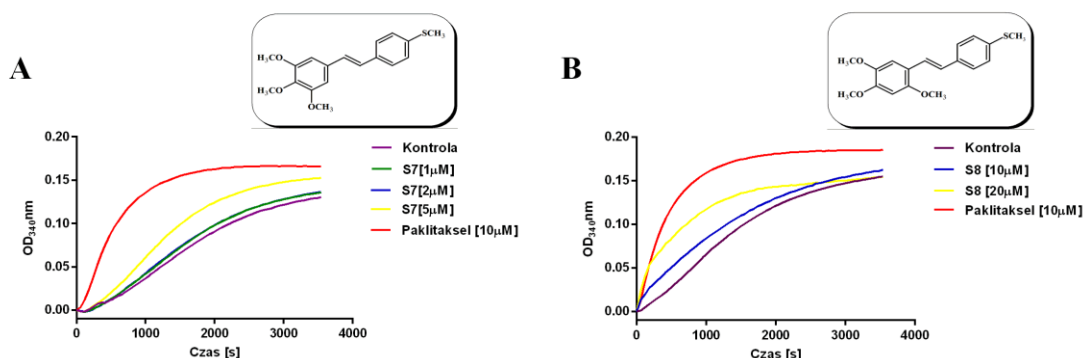
Głównym czynnikiem determinującym aktywność cytotoksyczną badanych tiopochodnych RSV jest jak widać odpowiednia konfiguracja i ilość grup metoksyowych w pierścieniu A prezentowanych związków. Związek **S7** posiadający ugrupowanie 3,4,5-trimetoksyfenylowe okazał się być najbardziej aktywny. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi [76], iż obecność podstawników metoksyowych w tych właśnie pozycjach odpowiada w zasadniczej mierze za wysoką aktywność przeciwnowotworową takiej cząsteczki.

Z uwagi na wysoką aktywność cytotoksyczną związków **S7** i **S8** oraz ich potencjalne działanie chemioterapeutyczne związki te przebadano w teście skrinigowym oceniającym ich wpływ na proces polimeryzacji tubuliny, celem określenia jednego z potencjalnych mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej.

Badanie wpływu związków na proces polimeryzacji tubuliny *in vitro*

Ocenę wpływu związków **S7** i **S8** na proces polimeryzacji tubuliny *in vitro* przeprowadzono w niezależnych eksperymentach. Jako związek referencyjny zastosowano paklitaksel, który jest zalecany przez producenta zestawu szczególnie przy oznaczaniu związków wykazujących stabilizujący wpływ na polimeryzację tubuliny.

Przebieg reakcji polimeryzacji obejmujący trzy fazy: nukleację, wzrost oraz stabilizację analizowano na podstawie krzywej polimeryzacji stanowiącej zależność gęstości optycznej mierzonej przy długości fali 340nm w czasie 60 minut. Wyniki przedstawiono na rysunku 43.



Rysunek 43. Wpływ związków **S7** (A) i **S8** (B) na proces polimeryzacji tubuliny wobec paklitakselu

Dla związku **S7** oznaczenie wykonano przy trzech stężeniach 1, 2 i 5 μM . Z przebiegu krzywych polimeryzacyjnych można wnioskować, iż związek **S7** przy stężeniu 1 i 2 μM nie wykazuje wpływu na proces polimeryzacji tubuliny w badanym teście. Przy stężeniu 5 μM obserwuje się zwiększenie szybkości fazy wzrostu przy jednoczesnym ustaleniu się fazy stabilizacji na wyższym poziomie w stosunku do kontroli (wyższa wartość OD). W przypadku związku **S8** oznaczenie wykonano przy wyższych stężeniach a mianowicie 10 i 20 μM . Przy stężeniu 10 μM związek **S8** powodował zwiększenie szybkości reakcji polimeryzacji tubuliny w fazie wzrostu, przy czym maksymalna wartość OD była porównywalna do kontroli. Z kolei przy wyższym stężeniu widoczny jest całkowity zanik fazy nukleacji i wzrost szybkości polimeryzacji w fazie wzrostu. Maksymalna wartość OD była podobnie jak przy stężeniu 10 μM porównywalna do kontroli.

Wpływ paklitakselu w obu przypadkach był porównywalny zarówno z danymi podanymi przez producenta zestawu wykorzystanego przy oznaczeniach, jak i z doniesieniami literaturowymi [74].

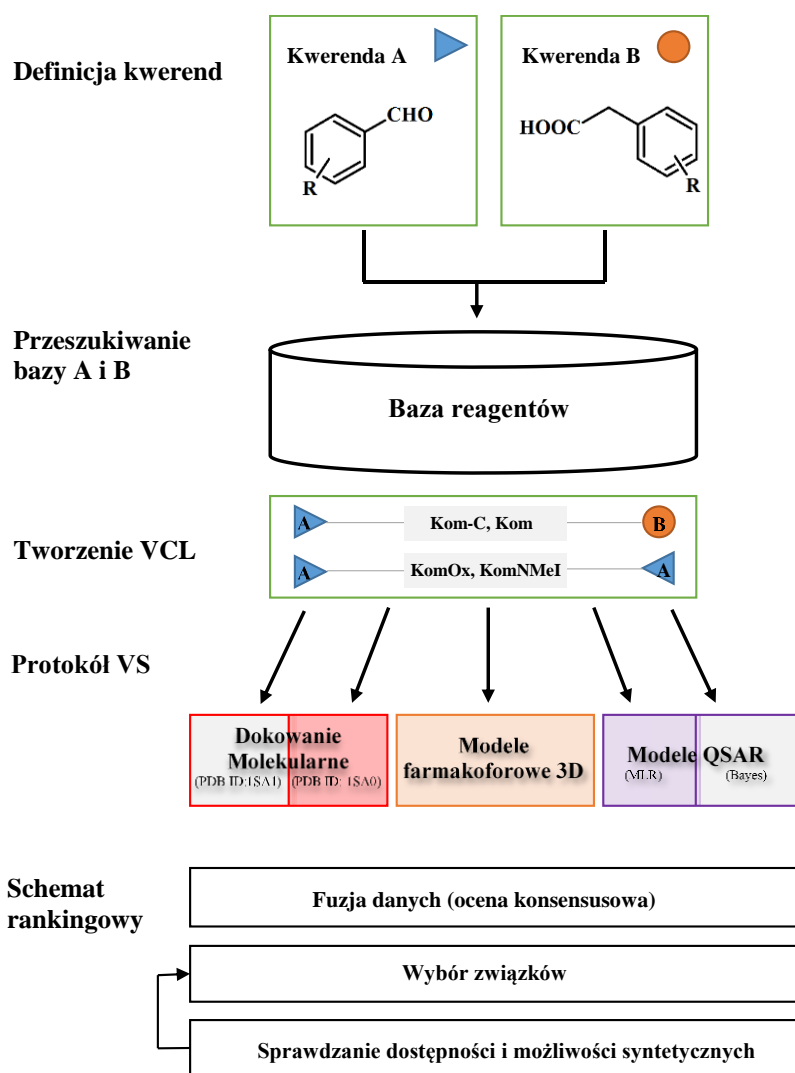
Wpływ stabilizujący badanych związków **S7** i **S8** na polimeryzację tubuliny może być jednym z czynników warunkujących antymitotyczne właściwości tych związków.

5.3. Komputerowo wspomagane projektowanie tiopochodnych CA-4

Strategia badań CADD pomocna w selekcji nowych tiopochodnych CA-4 do syntezy a następnie ocenie ich aktywności biologicznej obejmowała implementację protokołu VCL-VS, narzędzia do tworzenia i analizy wirtualnych bibliotek kombinatorycznych.

Opracowana metodologia składa się z szeregu etapów (Rysunek 44):

- dostosowanie algorytmu generowania bibliotek kombinatorycznych (zdefiniowanie struktury ogólnej reagentów, określenie rdzeni molekularnych) do schematu syntezy organicznej,
- zbudowanie biblioteki dostępnych reagentów,
- utworzenie biblioteki kombinatorycznej,
- wirtualny skrining biblioteki VCL.



Rysunek 44. Schematyczna ilustracja zastosowanego protokołu do generowania i analizy wirtualnych bibliotek kombinatorycznych (VCL-VS)

Definicja kwerend

Na podstawie szlaków syntezy tiopochodnych CA-4 (Schemat 21 i 22) uwzględniających występowanie czterech podstawowych rdzeni molekularnych:

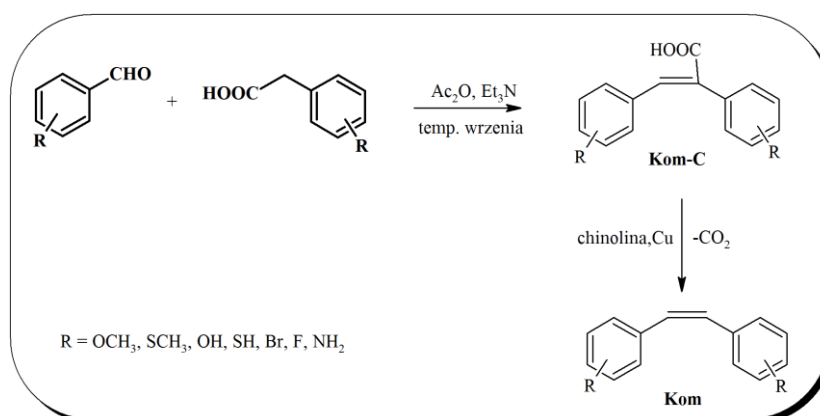
- układ kwasu (E)-1,2-difenylopropenowego (kwasu α -fenylocynamonowego) **Kom-C**,
- układ 1,2-difenyloetenu ((Z)-stilbenu) **Kom**,
- układ 1,2-difenylooksazolu **KomOx**,
- oraz N-metylo-1,2-difenyloimidazolu **KomNMeI**.

wyodrębniono dwa rodzaje kwerend dla reagentów (znaczone linią pogrubioną). Pierwsza z nich opisuje szablon dla różnie podstawionych pochodnych benzaldehydów

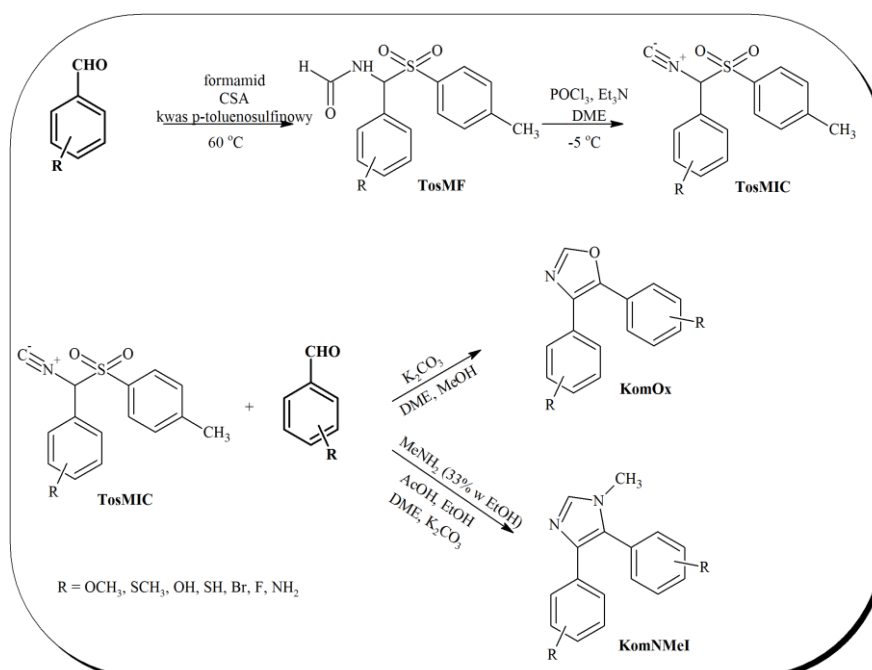
(kwerenda A) a druga dla różnie podstawionych pochodnych kwasów fenylloctowych (kwerenda B).

Wirtualna biblioteka kombinatoryczna (VCL)

Biorąc pod uwagę dostępne handlowo oraz otrzymane samodzielnie związki z obu kwerend zbudowana została biblioteka reagentów, która posłużyła dalej do utworzenia wirtualnej biblioteki kombinatorycznej VCL poprzez proste kombinacje reagentów z danej kwerendy: dla pochodnych Kom-C i Kom z kwerendy A i B a dla pochodnych KomOx i KomNMeI z kwerendy A. Do jej utworzenia wykorzystano algorytm CombiGlide z pakietu Schrödinger [175]. Zbudowana w ten sposób biblioteka zawierała około 2000 związków – pochodnych CA-4



Schemat 21. Ogólny schemat syntezy tiopochodnych CA-4 zawierających rdzeń **Kom-C** oraz **Kom**



Schemat 22. Ogólny schemat syntezy tiopochodnych CA-4 zawierających rdzeń **KomOx** oraz **KomNMeI**

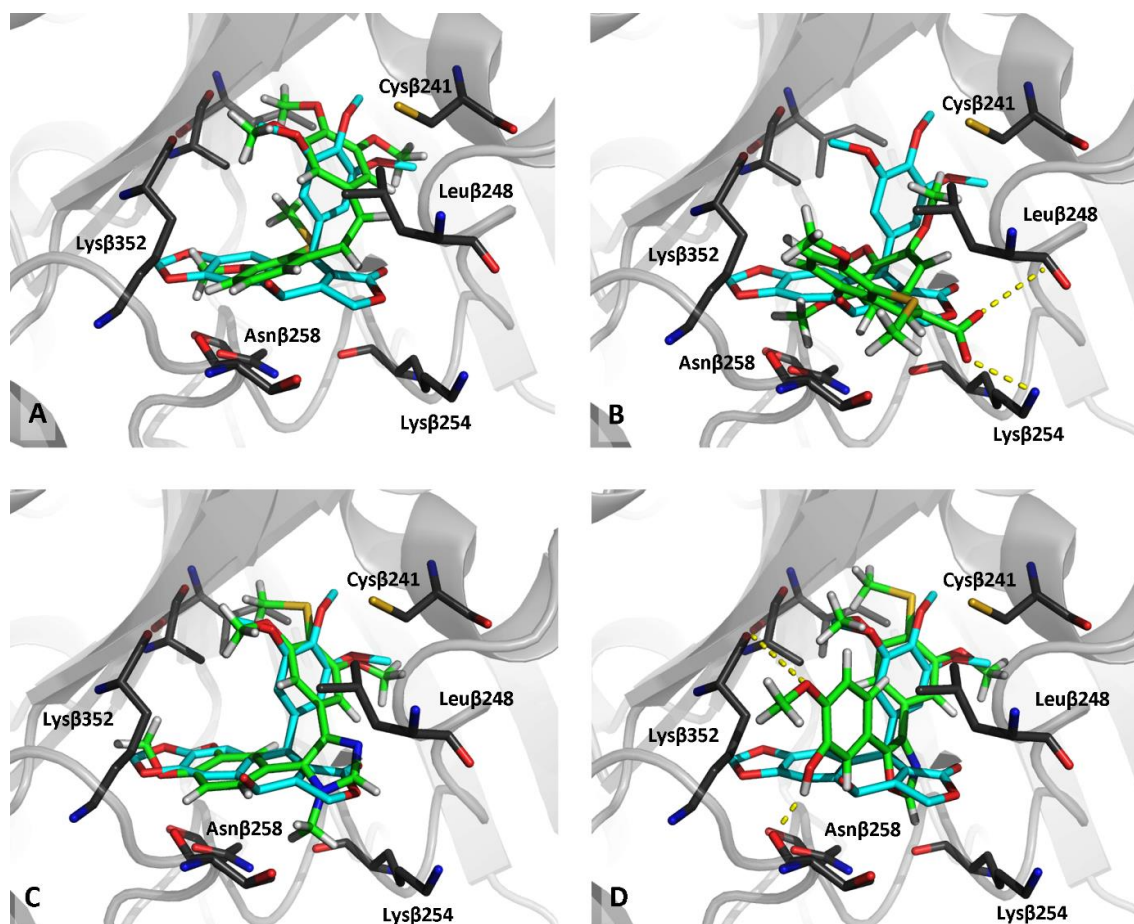
Wirtualny skrining (VS)

Główna idea protokołu wirtualnego skriningu polegała na zastosowaniu szeregu filtrów, utworzonych na podstawie danych o znanych ligandach i strukturze receptora kolchicynowego, do zawężenia uprzednio utworzonej biblioteki VCL. Wykorzystano procedurę skriningu równoległego stosując pięć niezależnych filtrów, a mianowicie:

- ocenę wyników dokowania do dwóch struktur krystalograficznych znanych ligandów z tubuliną (PDB ID: 1SA0 – z DAMA-kolchicyną) i (PDB ID: 1SA1 – z podofilotoksyną),
- ocenę wyniku mapowania na wygenerowane modele farmakoforowe,
- ocenę wyników mapowania związków z bazy VCL na dwa modele QSAR.

Dokowanie molekularne

Dokowanie do struktur 3D (PDB ID: 1SA1 i 1SA0) kolchicynowej domeny wiążącej wykonano przy pomocy algorytmu Glide z pakietu Schrödinger na poziomie precyzji SP (ang. *standard precision*). W trakcie dokowania nie włączane były żadne więzy na oddziaływanie. Wszystkie ligandy przed dokowaniem przygotowane zostały (konformacja 3D, przypisanie stanów protonacyjnych oraz ładunków) za pomocą algorytmu LigPrep z pakietu Schrödinger. Następnie każdy kompleks ligand-receptor został zakodowany do postaci wektora binarnego przy użyciu implementacji metody fingerprintów oddziaływania (SIFt) i kolejno porównany z konformacją liganda natywnego za pomocą skryptów z biblioteki MayaChemTool, przy użyciu których obliczano współczynniki podobieństwa Tanimoto. Na rysunku 45 przedstawiono zadokowane do struktury 3D (PDB ID: 1SA1) reprezentatywne cząsteczki charakteryzujące każdy rdzeń molekularny.



Rysunek 45. Miejsce wiążące domeny kolcycynowej (PDB ID: 1SA1) z zadokowanymi reprezentantami poszczególnych rdzeni molekularnych: A – Kom4; B – KomC4; C – KomNMeI2 oraz D – KomOx3. Kolorem niebieskim wyróżniono strukturę liganda natywnego (podofilotoksyny) natomiast kolorem zielonym struktury tiopochodnych CA-4. Aminokwasy uczestniczące w oddziaływaniach zaznaczona na czarno. Żółtą linią przerywaną oznaczono oddziaływania wodorowe.

Filtr farmakoforowy 3D

Modele farmakoforowe 3D zostały wygenerowane w oparciu o protokół 3D QSAR Pharmacophore Generation zaimplementowany w pakiecie Discovery Studio 3.5. Do generowania przestrzeni konformacyjnej związków referencyjnych zastosowano algorytm BEST, który zapewnia najlepsze pokrycie przestrzeni konformacyjnej i jest zalecany w przypadku generowania trójwymiarowych farmakoforów. Maksymalna liczba generowanych konformacji dla każdego liganda wynosiła 255. Odrzucano konformacje, które już zostały znalezione (duplikaty) i zachowywano konformacje o energii nie wyższej niż 20 kcal/mol względem dotychczas znalezionej najkorzystniejszej energetycznie konformacji danego liganda. W modelu farmakoforowym mogło się znaleźć od zera do pięciu wystąpień każdej z następujących cech: akceptor wiązania wodorowego (HBA), donor wiązania wodorowego (HBD),

grupa hydrofobowa (HY) i aromatyczna grupa hydrofobowa (HYA). Minimalną odległość pomiędzy cechami ustalono na 2,5 Å i zachowywano dziesięć najlepszych modeli.

Modele farmakoforowe tworzone były w oparciu o literaturowy model farmakoforu opisany jako Hypo1 na podstawie 21 struktur pokrewnych związków o znanej aktywności (ang. *training set*) [176].

Spośród otrzymanych dziesięciu modeli farmakoforowych najbliższym wzorcowemu był model trzeci (Rysunek 46), Model ten zawierał następujące cechy: HBA, HBD, dwie HY (HY1 i HY2) oraz HYA

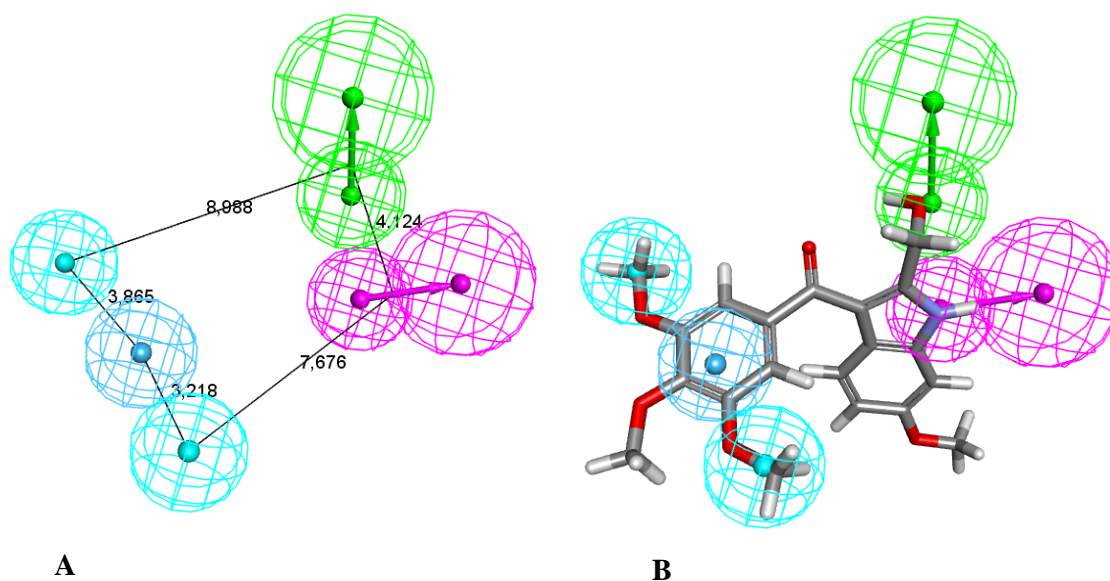
Najlepszy model identyfikowano na podstawie wartości funkcji „*FitValue*” (*FV*), oceniającej globalne dopasowanie modelu do struktury przestrzennej ligandów użytych do jego budowy.

Modele QSAR

Modele QSAR wykonano przy pomocy pakietu Discovery Studio 3.5. Na podstawie danych (wartości IC₅₀ aktywności antyproliferacyjnej w stosunku do komórek nowotworowych linii MDA-MB-435) związków zaczerpniętych z pracy Chenxiao et al. [177] zbudowane zostały dwa modele QSAR. Przy ich tworzeniu wykorzystano bazę 48 związków treningowych (ang. *training set*) a ich weryfikacja odbywała się w oparciu o bazę 35 związków testowych (ang. *test set*).

Pierwszy model otrzymano w oparciu o protokół „*Create bayesian model*” korzystając z następujących deskryptorów i fingerprintów molekularnych:

- AlogP,
- ECFP_6 (fingerprint molekularny składający się z 2048 deskryptorów),
- MW (masa cząsteczkowa),
- liczba pierścieni aromatycznych,
- liczba akceptorów wiązania wodorowego,
- liczba donorów wiązania wodorowego,
- liczba pierścieni, liczba rotowanych wiązań,
- PSA (ang. *polar surface area*).



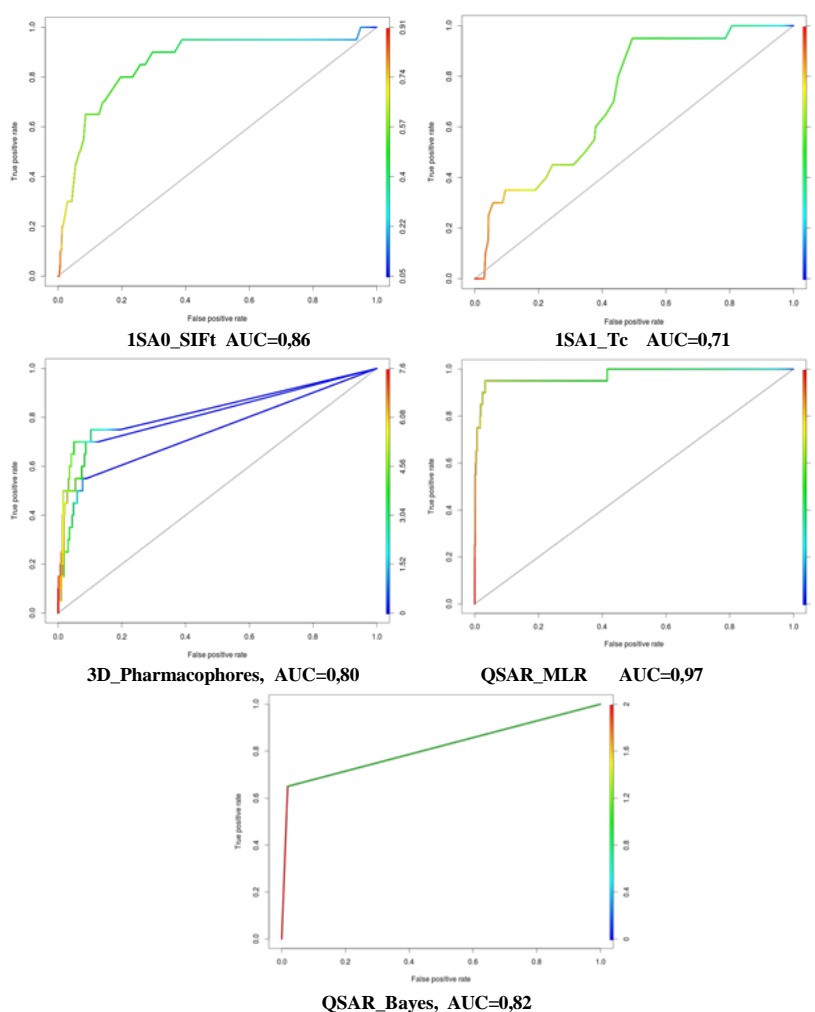
Rysunek 46. Model farmakoforu wygenerowany na podstawie danych literaturowych z wykorzystaniem procedury „3D QSAR Pharmacophore Generation”. A – model z zaznaczonymi odległościami topologicznymi.; B – model z nałożonym ligandem z testowego zbioru. Cechy farmakoforowe oznaczono odpowiednio: HBA – akceptor wiązania wodorowego (*zielony*), HBD – donor wiązania wodorowego (*fioletowy*), HYA – hydrofobowa grupa aromatyczna (*niebieski*), HY1 – hydrofobowa grupa (*cyjan*), HY2 – hydrofobowa grupa (*cyjan*)

Model ten pozwala tylko na klasyfikację binarną analizowanego zbioru (związek aktywny – przypisana wartość logiczna 1, oraz nieaktywny – przypisana wartość logiczna 0). Drugi model wykorzystywał algorytm „*Multiple Linear Regression*”. W jego przypadku z kolei wykorzystane zostały następujące deskryptory i fingerprinty molekularne:

- AlogP,
- logP,
- ECFP_4 (fingerprint molekularny składający się z 2048 deskryptorów),
- MW (masa cząsteczkowa),
- liczba akceptorów wiązania wodorowego,
- liczba donorów wiązania wodorowego,
- liczba pierścieni,
- liczba wiązań π i σ ,
- liczba rotowanych wiązań,
- PSA (ang. *polar surface area*).

Fuzja danych (ocena konsensusowa – Cscore)

W celu otrzymania jednego rankingu dla związków z biblioteki VCL, wykorzystano metodę fuzji danych „Consensus Score” (ze schematem votingu). Modele klasyfikacyjne użyte w wirtualnym skriningu oceniono pod kątem ich jakości i znamienności statystycznej. W tym celu wyznaczono krzywe ROC będące narzędziem zapewniającym łączny opis czułości i specyficzności danego modelu oraz obliczono wartości AUC (wartość z przedziału [0, 1], im większa wartość tym lepszy model) będące miarą dobroci i trafności przyjętych modeli. Na podstawie krzywych ROC, dla każdego z 5 filtrów wyznaczono optymalna wartość odcięcia, tj. punkt, kiedy przypisywana jest klasyfikowanym związkom ocena 1 (aktywny) lub 0 (nieaktywny). Kolejno oceny zostały zsumowane. Teoretycznie najlepiej oceniony związek otrzymał ocenę 5 a najgorszy 0. Wykresy oraz uzyskane korelacje krzywych ROC i AUC zestawiono na rysunku 47.



Rysunek 47. Krzywe ROC i wartości AUC modeli klasyfikacyjnych użytych w procedurze wirtualnego skriningu

W oparciu o uzyskany ranking oraz wartości funkcji oceniającej „Cscore” pochodnych CA-4 dokonano wyboru związków do syntezy. Wybór związków podyktowany był zarówno możliwościami syntetycznymi oraz dostępnością odczynników własnych i handlowych. Ponadto celem przetestowania uzyskanego modelu predykcyjnego wybierane związki znalazły się w całym przedziale określonym wartością funkcji oceniającej (dla związków wybranych było to przedział [1, 5]). W tabeli 14 zebrano wszystkie struktury tiopochodnych CA-4 wybranych do syntezy podając ich nazwy robocze wraz z wartościami liczbowymi zastosowanych funkcji oceniających.

Tabela 14. Tiopochodne CA-4 wybrane do syntezy na drodze protokołu VCL-VS. Skrótami oznaczono zastosowane modele klasyfikacyjne (funkcje oceniające)

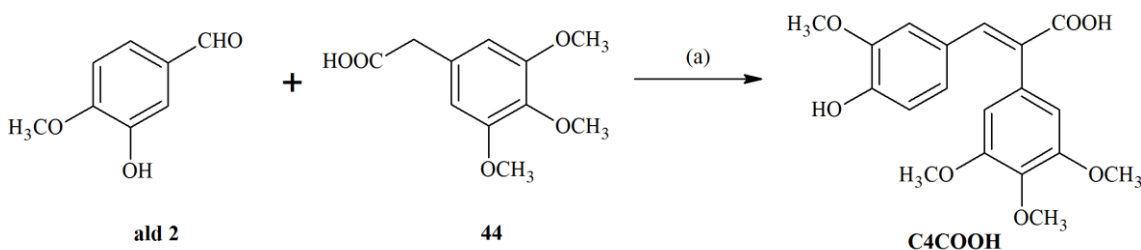
L.p.	Nazwa robocza związku	SIFt-1SA1	SIFt-1SA0	2D-QSAR_MLR	QSAR_Bayes	FV	Cscore
1.	KomOx1	0,55	0,40	10,35	1	0,00	3
2.	KomOx2	0,58	0,44	9,36	1	7,38	4
3.	KomOx3	0,56	0,53	9,55	1	4,38	5
4.	KomOx4	0,50	0,41	10,56	1	0,00	3
5.	KomOx5	0,36	0,29	10,32	1	0,00	2
6.	KomOx6	0,56	0,50	9,95	0	0,00	3
7.	KomOx7	0,50	0,33	9,60	0	0,00	2
8.	KomNMeI1	0,71	0,46	10,92	1	0,00	3
9.	KomNMeI2	0,70	0,50	10,12	0	6,01	4
10.	KomNMeI5	0,36	0,29	10,89	0	0,00	1
11.	KomNMeI6	0,41	0,67	10,52	0	0,00	2
12.	KomNMeI7	0,74	0,62	10,17	0	0,00	3
13.	Kom-C4	0,45	0,56	7,21	0	0,00	1
14.	Kom-C6	0,78	0,62	6,61	0	0,00	2
15.	Kom4	0,68	0,53	9,46	0	0,00	3
16.	Kom6	0,63	0,47	8,99	0	0,00	2
17.	CA-4	0,52	0,67	8,52	1	5,54	5

Przyjęte modele klasyfikacyjne (funkcje oceniające) oznaczono następującymi skrótami: SIFt-1SA1 (protokół dokowania do domeny kolchicynowej w kompleksie z podofilotoksyną (PDB ID: 1SA1) z zastosowaniem fingerprintów oddziaływania), SIFt-1SA0 (protokół dokowania do domeny kolchicynowej w kompleksie z DAMA-kolchicyną (PDB ID: 1SA0) z zastosowaniem fingerprintów oddziaływania), 2D-

QSAR_MLR (modele QSAR oparte o algorytm „*Multiple Linear Regression*”), QSAR_Bayes (modele QSAR oparte o klasyfikator Bayesowski), FV (funkcja „*Fit Value*” w modelach farmakoforowych 3D)

5.4. Synteza CA-4

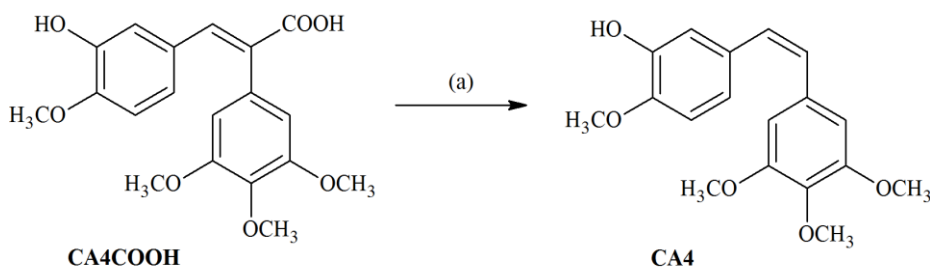
Syntezę CA-4 prowadzono w dwuetapowej reakcji zgodnie z procedurą opisaną przez Gaukrogera i wsp. [138]. W pierwszym etapie otrzymano kwas (E)-3-(3-hydroksy-4-metoksyfenilo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenilo)prop-2-enowy **CA4COOH** w reakcji kondensacji Perkina między 3-hydroksy-4-metoksybenzaldehydem **ald2** a kwasem 3,4,5-trimetoksyfenylooctowym **44** (Schemat 23). Reakcję prowadzono w środowisku bezwodnika kwasu octowego i trietyloaminy w atmosferze azotu.



Schemat 23. Synteza **CA4COOH**. Reagenty i warunki reakcji: (a) Ac_2O , Et_3N , 3 godziny, temp. 110°C , azot, wyd. 62%

Uzyskany surowy produkt **CA4COOH** oczyszczano przez rekrystalizację z 96% etanolu i scharakteryzowano za pomocą temperatury topnienia, współczynnika R_f oraz nisko- i wysokorozdzielczego widma masowego. Temperatura topnienia wynosiła $228\text{--}230$ (lit. $237\text{--}239^\circ\text{C}$ [138]). W przypadku wysokorozdzielczego widma masowego uzyskana wartość zmierzonej masy jonu molekularnego była w pełni zgodna z jej wartością teoretyczną.

W drugim etapie otrzymany produkt pośredni **CA4COOH** poddano reakcji dekarboksylacji w temperaturze 200°C w atmosferze azotu (Schemat 24) w obecności sproszkowanej miedzi. Jako rozpuszczalnika używano chinoliny.



Schemat 24. Synteza **CA-4**. Reagenty i warunki reakcji: (a) chinolina, Cu, 2 godziny, temp. 200°C , wyd. 68%

Otrzymany surowy produkt w postaci brązowej oleistej cieczy oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie (heksan:EtOAc, 7:3). **CA-4** ((*Z*)-1-(3-hydroksy-4-metoksyfenilo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenilo)eten) scharakteryzowano za pomocą widm ^1H NMR i ^{13}C NMR, temperatury topnienia, współczynnika R_f , widma IR oraz nisko- i wysoko rozdzielczego widma masowego. Temperatura topnienia **CA-4** była zbliżona do literaturowej i wynosiła 114-115°C (lit. 117-118°C [138]). W przypadku wysokorozdzielczego widma masowego uzyskana wartość zmierzonej masy jonu molekularnego była w pełni zgodna z jej wartością teoretyczną. Widmo ^1H NMR cząsteczki **CA-4** było zgodne z podanymi wartościami literaturowymi w tabeli 3 (str. 43). Obserwowano m.in. charakterystyczną stałą sprzężenia protonów winylowych dla układu (*Z*)-stilbenu wynoszącą 12,2 Hz. Na widmie IR obecne było m.in. charakterystyczne szerokie pasmo drgań rozciągających grupy hydroksylowej przy 3382 cm^{-1} .

5.5. Synteza tiopochodnych CA-4

5.5.1. Synteza tiopochodnych benzaldehydów

Pierwszym etapem w syntezie tiopochodnych CA-4 było otrzymanie odpowiednio podstawionych tiopochodnych benzaldehydów. Istnieją różne metody tworzenia wiązania

Ar-S i charakterystyczne dla nich mechanizmy reakcji, jak m.in.:

- aromatyczna substytucja elektrofilowa m.in. z wykorzystaniem chlorku trifluorometylosulfenylowego – CF_3SCI [178].
- aromatyczna substytucja nukleofilowa halogenków arylowych z tiolami w reakcjach Ulmana [179],
- reakcja wykorzystująca związki Grignarda w obecności siarki i odpowiednich halogenków arylowych [180],
- przegrupowanie $\text{O}\rightarrow\text{S}$ znane pod nazwą przegrupowania Newmana-Kwarta [181].

Biorąc pod uwagę specyficzne warunki reakcji, dostępność odczynników i bezpieczeństwo prowadzonych reakcji zdecydowano się wykorzystać metodę, w której na jednym z etapów pośrednich zachodzi wspomniane przegrupowanie Newmana-Kwarta między O-tiokarbaminowymi a S-tiokarbaminowymi pochodnymi benzaldehydów.

Inną równie ważną przesłanką przy wyborze omawianej metody syntezy tiopochodnych benzaldehydów była możliwość wykorzystania otrzymywanych produktów pośrednich a mianowicie O- i S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów jako zabezpieczonych merkaptopochodnych aldehydów benzoesowych w reakcjach syntezy pochodnych **Komox2**, **KomOx3** i **KomNMeI2**.

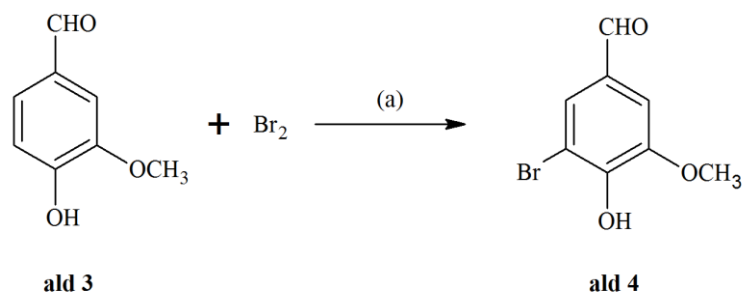
Wieloetapowy szlak syntezy tiobenzaldehydów w tym metylotiobenzaldehydów obejmował wykorzystanie odpowiednich hydroksybenzaldehydów jak związków wyjściowych, które przekształcono do pochodnych O-tiokarbaminowych. Dalej w reakcji przegrupowania Newmana-Kwarta były one przekształcane do odpowiednich pochodnych

S-tiokarbaminowych, które hydrolizowano do pochodnych merkaptobenzaldehydów i dalej w reakcji metylowania do metylotiobenzaldehydów. Dla części związków wymagane było zabezpieczenie grupy aldehydowej na etapie hydrolizy ugrupowania tiokarbamoilowego. Reakcje w toku syntezy tiopochodnych benzaldehydów prowadzone były seriami i tak też zostaną opisane w poniższych rozdziałach.

5.5.1.1. Synteza bromobenzaldehydów

Synteza 3-bromo-4-hydroksy-5-metoksybenzaldehydu (5-bromowaniliny) (ald 4)

Syntezę przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Manhanda i wsp. [163]. W reakcji wykorzystano dostępny handlowo 4-hydroksy-5-metoksybenzaldehyd (wanilinę) **ald 3** (Schemat 25). Tożsamość powstałego produktu **ald 4** oceniono na podstawie temperatury topnienia, która była zgodna z danymi literaturowymi.

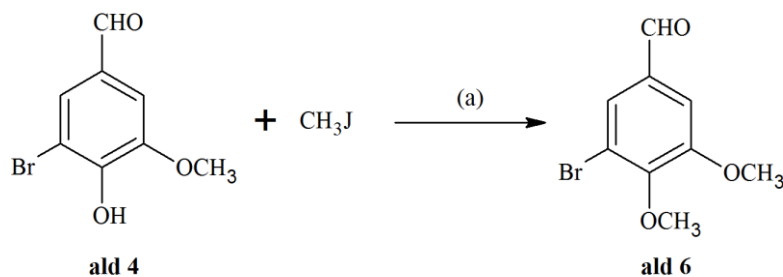


Schemat 25. Synteza 3-bromo-4-hydroksy-5-metoksybenzaldehydu **ald 4**. Reagenty i warunki reakcji: (a) MeOH, 1 godzina, temp. 0-25°C, wyd. 99%

Synteza 3-bromo-4,5-dimetoksybenzaldehydu (aldehydu 5-bromoweratrowego) (ald 6)

Syntezę przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Fürstnera i wsp. [164]. W reakcji wykorzystano otrzymaną uprzednio 5-bromowanilinę **ald 4** (Schemat 26) i

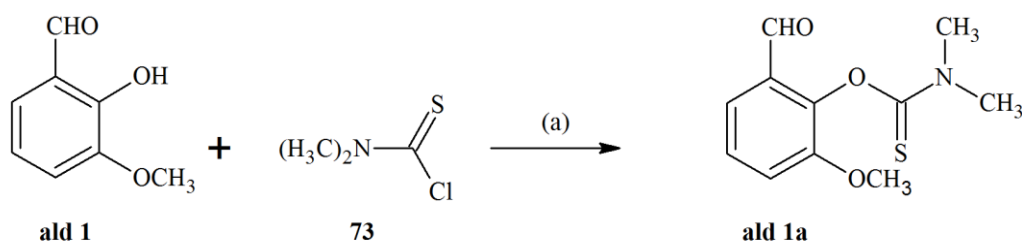
również tożsamość powstałego produktu **ald 6** oceniono na podstawie temperatury topnienia, która była zgodna z danymi literaturowymi.



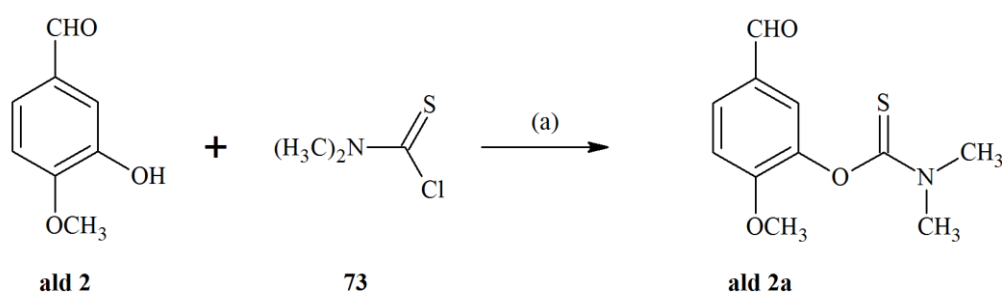
Schemat 26. Synteza 3-bromo-4,5-dimetoksybenzaldehydu **ald 6**. Reagenty i warunki reakcji: (a) DMF, K_2CO_3 , 25 godzin, temp. pok., wyd. 88%

5.5.1.2. Synteza O-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów

W metodzie tej wykorzystywane były odpowiednio podstawione hydroksybenzaldehydy (**ald 1-5**) zarówno uprzednio otrzymane, jak i dostępne handlowo, które dalej przekształcane zostały do pochodnych O-tiokarbaminowych **ald 1a-5a** w reakcji z chlorkiem N,N-dimetylotiokarbamoilowym **73** (Schematy 27-31).



Schemat 27. Synteza O-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 1a**. Reagenty i warunki reakcji: (a) KOH, H_2O , THF, 80 minut, temp. 0-25°C



Schemat 28. Synteza O-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 2a**. Reagenty i warunki reakcji: (a) KOH, H_2O , THF, 60 minut, temp. 0-25°C

W tabeli 15 zestawiono otrzymane pochodne O-tiokarbaminowe podając uzyskane wydajności i temperatury topnienia.

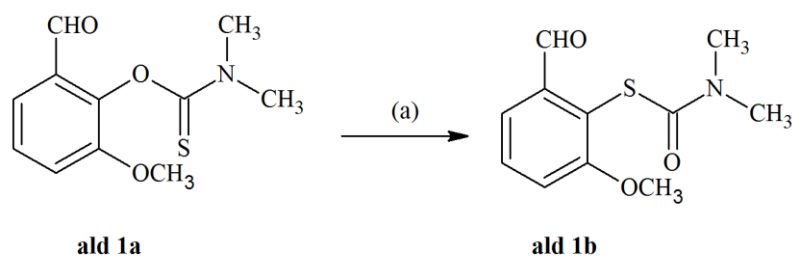
Tabela 15. Otrzymane O-tiokarbaminowe pochodne benzaldehydów

Nazwa robocza	Wydajność [%]	Temperatura topnienia [°C]
ald 1a	70	118-120
ald 2a	80	114-115
ald 3a	65	122-124
ald 4a	63	163-164
ald 5a	94	177-179

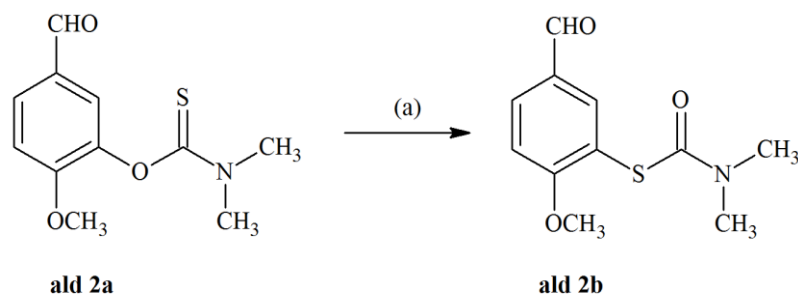
Związki krystalizowano z metanolu z wyjątkiem **ald 5a**, który nie wymagał oczyszczenia. Scharakteryzowano je za pośrednictwem widm ^1H NMR i ^{13}C NMR. Na widmach ^1H NMR zaobserwowano m.in. charakterystyczne sygnały od protonów grup metylowych podstawnika O-tiokarbamoliowego w zakresie 3,35-3,5 ppm o intensywności porównywalnej z sygnałami protonów grup metoksyloowych. Związki **ald 1a** [166], **ald 3a** [167] oraz **ald 5a** [168] zostały wcześniej opisane w literaturze a ich temperatury topnienia były zgodne z literaturowymi, jakkolwiek metodyka ich otrzymywania różniła się nieznacznie od tej, która zastosowano w niniejszej pracy. Różnice polegały głównie na tym, iż w badaniach własnych wykorzystano krystalizację jako szybką i skuteczną metodę oczyszczania otrzymanych związków oraz nie przeprowadzano ekstrakcji poreakcyjnej do fazy organicznej, jak to miało miejsce w syntezach opisywanych przez innych autorów (np. chloroform w przypadku syntezy związku **ald 3a** [167], benzen w przypadku syntezy związku **ald 1a** [166]).

5.5.1.3. Synteza S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów

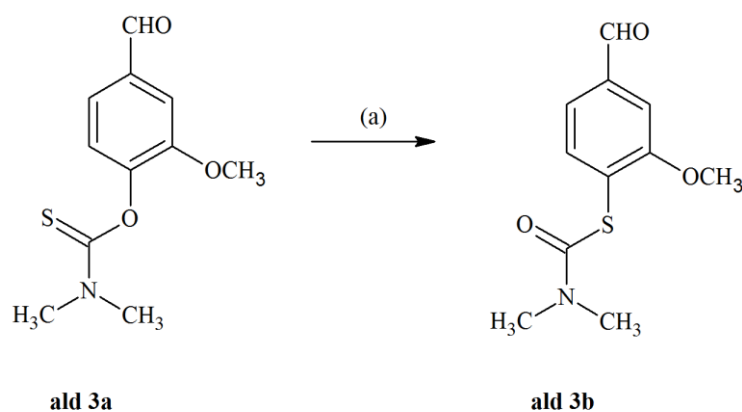
Otrzymane O-tiokarbaminowe pochodne benzaldehydów przekształcono do ich odpowiedników S-tiokarbaminowych (**ald 1b-5b**) wykorzystując fakt wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania O→S zgodnie z opisanym przez Newmana-Kwarta mechanizmem. Reakcję prowadzono w atmosferze azotu w obecności eteru difenylowego jako rozpuszczalnika w wysokiej temperaturze (240°C) i co ważne mierzonej bezpośrednio w medium reakcyjnym (Schematy 32-36).



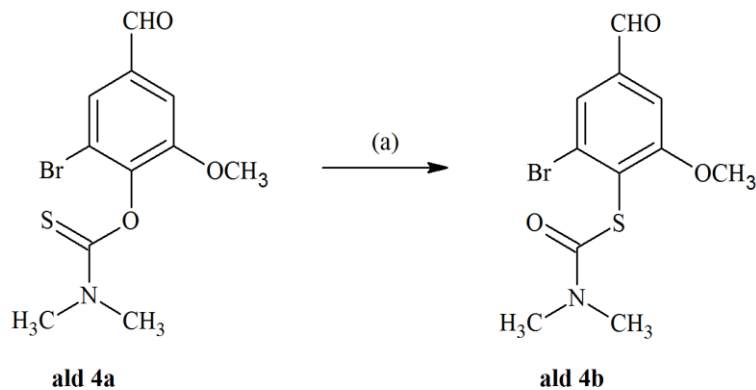
Schemat 32. Synteza S-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 1b**. Reagenty i warunki reakcji:
(a) eter difenyłowy, azot, 30 minut, temp. 240°C



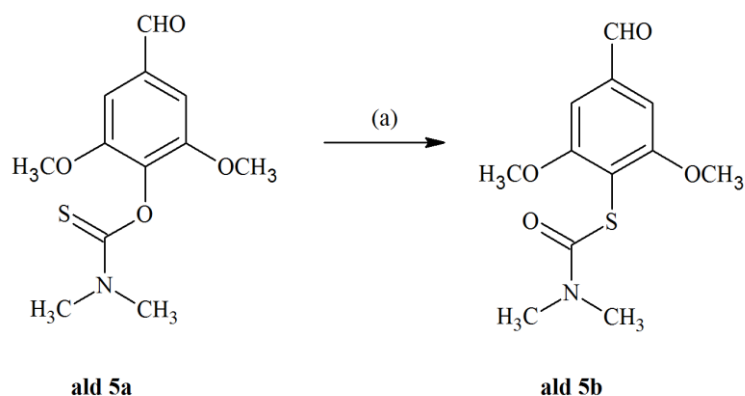
Schemat 33. Synteza S-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 2b**. Reagenty i warunki reakcji:
(a) eter difenyłowy, azot, 120 minut, temp. 240°C



Schemat 34. Synteza S-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 3b**. Reagenty i warunki reakcji:
(a) eter difenyłowy, azot, 45 minut, temp. 240°C



Schemat 35. Synteza S-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 4b**. Reagenty i warunki reakcji:
(a) eter difenyłowy, azot, 15 minut, temp. 240°C



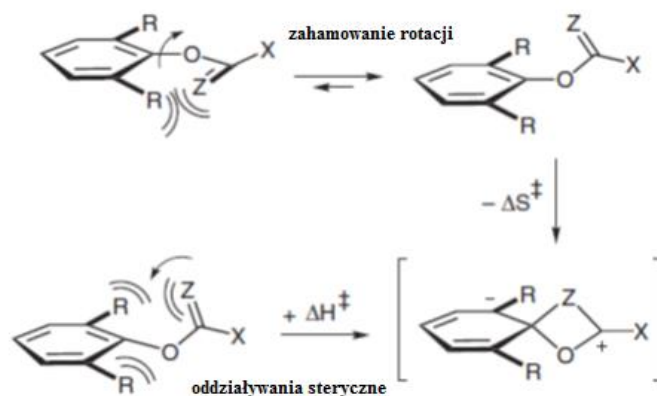
Schemat 36. Synteza S-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 5b**. Reagenty i warunki reakcji: (a) eter difenylowy, azot, 15 minut, temp. 240°C

Wynikało to z odpowiednio zoptymalizowanej metodyki ich otrzymywania uwzględniającej zarówno czas jak i temperaturę prowadzonych reakcji (Tabela 16), która ma bezpośredni wpływ na wydajność procesu. Zbyt długie ogrzewanie w tak wysokiej temperaturze nawet o kilka minut prowadzi zwykle do znacznego obniżenia wydajności, co spowodowane jest głównie reakcjami rozkładu substratów.

Tabela 16. Warunki reakcji, uzyskane wydajności oraz temperatury topnienia S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów

Nazwa robocza	Czas reakcji [min]	Wydajność [%]	Temperatura topnienia [°C]
ald 1b	30	59	89-90
ald 2b	120	54	126-128
ald 3b	45	86	108-110
ald 4b	15	94	170-173
ald 5b	15	82	191-194

Biorąc pod uwagę wpływ podstawienia na szybkość zachodzącej reakcji przegrupowania można zauważyć, iż dla pochodnych **ald 4b** i **ald 5b**, w których podstawnik O-tiokarbamoilowy znajduje się w sąsiedztwie dwóch innych podstawników (w tym przypadku bromu i/lub grup metoksyowych) obserwuje się znaczne przyspieszenie reakcji przegrupowania. Jest to zgodne z opisanym w literaturze przez Rellesa i wsp. [182] efektem sterycznym mającym wpływ na spadek entropii stanu przejściowego, co przekłada się na wzrost szybkości procesu przegrupowania (Rysunek 42).



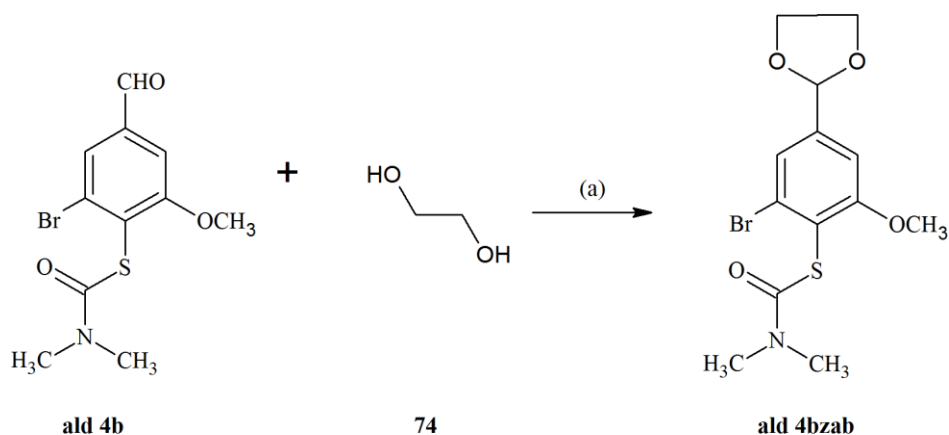
Rysunek 48. Ilustracja wpływu efektu sterycznego podstawników na wzrost szybkości reakcji przegrupowania wg [181]

S-tiokarbaminowe pochodne benzaldehydów scharakteryzowano podobnie jak pochodne O-tiokarbaminowe za pośrednictwem widm ^1H NMR i ^{13}C NMR. Na widmach ^1H NMR zaobserwowano m.in. charakterystyczne szerokie sygnały od protonów grup metylowych podstawnika S-tiokarbamiolowego w zakresie 2,84-3,21 ppm. Jednakże ich intensywność była znacznie mniejsza od sygnałów protonów grup metoksyowych. Związki **ald 1b** [166], **ald 3b** [167] oraz **ald 5b** [168] zostały wcześniej opisane w literaturze a ich temperatury topnienia były zgodne z literaturowymi.

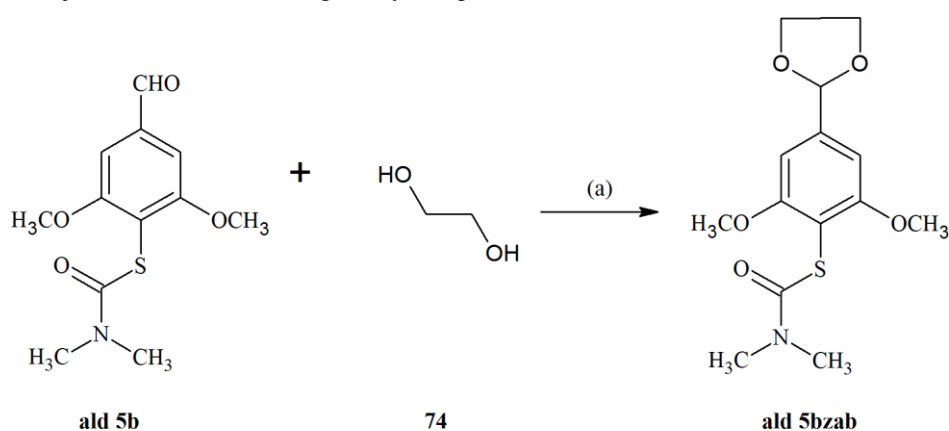
5.5.1.4. Synteza cyklicznych acetai (1,3-dioksoolanów) wybranych pochodnych S-tiokarbaminowych benaldehydów

Pomimo, iż kolejnym etapem na drodze syntezy metylotiofenaldehydów jest hydroliza grupy tiokarbamiolowej do tiofenolowej w środowisku zasadowym pojawiły się trudności na tym etapie w przypadkach związków **ald 4b** i **ald 5b**. Polegały one na powstawaniu szeregu produktów ubocznych, co prawdopodobnie wiązało się z zachodzeniem reakcji Cannizzaro grupy aldehydowej w tych związkach. Trudno jednoznacznie stwierdzić, co może być przyczyną tego zjawiska właśnie wśród tych pochodnych.

Przeprowadzono zatem reakcję zabezpieczenia grupy aldehydowej w tych związkach (Schematy 37-38) przy użyciu glikolu etylenowego **73** w środowisku bezwodnego toluenu w obecności kwasu Lewisa (dihydratu kwasu p-toluenosulfonowego). Reakcję prowadzono w aparacie Deana-Starka w temperaturze 145°C usuwając tworzącą się jako produkt uboczny wodę z mieszaniny reakcyjnej.



Schemat 37. Synteza 1,3-dioksolanu S-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 4bzab**. Reagenty i warunki reakcji: (a) bezw. toluen, 2,5 godziny, temp. 145°C



Schemat 38. Synteza 1,3-dioksolanu S-tiokarbaminowej pochodnej benzaldehydu **ald 5bzab**. Reagenty i warunki reakcji: (a) bezw. toluen, 2,5 godziny, temp. 145°C

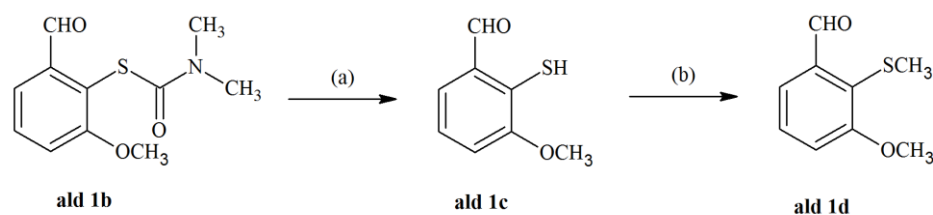
Tabela 17. Otrzymane S-tiokarbaminowe pochodne benzaldehydów z grupą aldehydową zabezpieczoną układem 1,3-dioksolanu

Nazwa robocza	Wydajność	Temperatura topnienia
	[%]	[°C]
ald 4bzab	77	106-107
ald 5bzab	94	121-123

Otrzymane związki scharakteryzowano za pomocą widm ^1H NMR i ^{13}C NMR. W widmie ^1H NMR zaobserwowano m.in. charakterystyczne pasmo sygnałów pochodzących od protonów metylenowych układu 1,3-dioksolanu w zakresie 4,02-4,08 ppm oraz protonów metinowych przy odpowiednio 5,83 ppm w przypadku **ald 4bzab** oraz 5,86 ppm dla **ald 5bzab**.

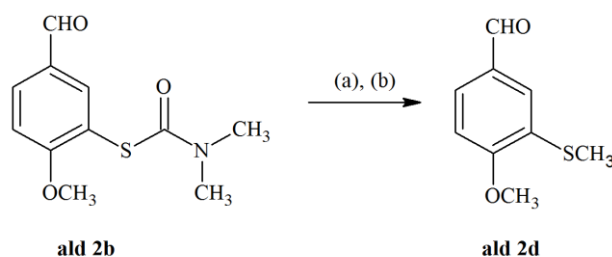
5.5.1.5. Synteza metylotiobenzaldehydów

Przedstawiona synteza metylotiobenzaldehydów obejmuje w przypadku związków **ald 1b-3b** ich hydrolizę do odpowiednich pochodnych merkaptobenzaldehydów w środowisku 10% metanolowego roztworu wodorotlenku potasu a następnie podstawienie ich grupą metylową w reakcji z jodkiem metylu. Pozwoliło to na otrzymanie metylotiobenzaldehydów **ald 1d-3d**. W przypadku syntezy **ald 1d** wyizolowano produkt pośredni 2-merkapto-3-metoksybenzaldehyd **ald 1c** (Schemat 39).

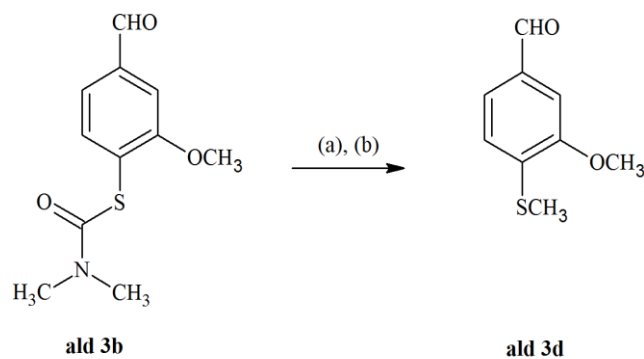


Schemat 39. Synteza metylotiobenzaldehydu **ald 1d**. Reagenty i warunki reakcji: (a) 10% r-r KOH w MeOH, 2 godziny, temp. 80°C; (b) CH₃I, bezw. K₂CO₃, bezw. DMF, 22 godziny, temp. pok.

Dla pozostałych dwóch pochodnych S-tiokarbaminowych **ald 2b** i **ald 3b** reakcję hydrolizy i następczego metylowania grupy tiolenolowej przeprowadzono w jednym naczyniu reakcyjnym (ang. *one-pot reactions*) bez izolacji produktów pośrednich – merkaptobenzaldehydów (Schematy 40-41)

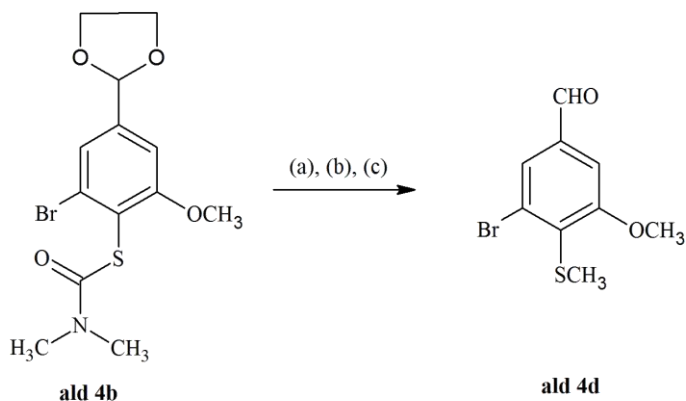


Schemat 40. Synteza metylotiobenzaldehydu **ald 2d**. Reagenty i warunki reakcji: (a) 10% r-r KOH w MeOH, 2,5 godziny, temp. 80°C; (b) CH₃I, bezw. K₂CO₃, bezw. DMF, 20 godziny, temp. pok.

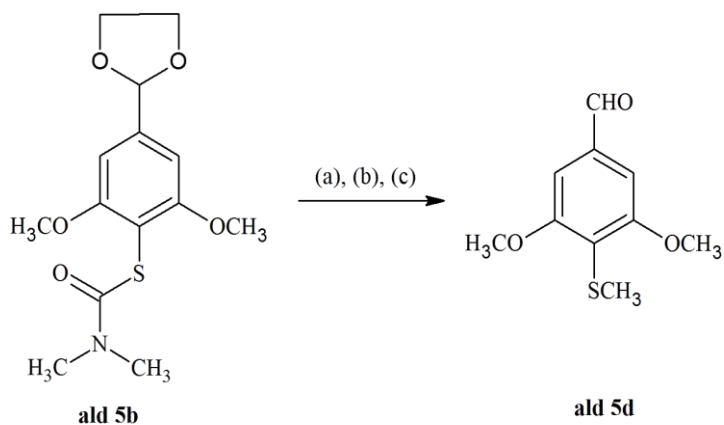


Schemat 41. Synteza metylotiobenzaldehydu **ald 3d**. Reagenty i warunki reakcji: (a) 10% r-r KOH w MeOH, 2,5 godziny, temp. 80°C; (b) CH₃I, bezw. K₂CO₃, bezw. DMF, 24 godziny, temp. pok.,

Podobnie postępowano przy syntezie pozostałych metylotiobenzaldehydów **ald 4d** i **ald 5d** (Schematy 42-43) jakkolwiek zamiast jodku metylu zastosowano jako czynnik metylujący siarczan dimetylu po czym zakwaszono środowisko reakcji celem odblokowania grup formylowych.



Schemat 42. Synteza metylotiobenzaldehydu **ald 4d**. Reagenty i warunki reakcji: (a) 10% r-r KOH w MeOH, 3 godziny, temp. 80°C; (b) Me₂SO₄, bezw. K₂CO₃, bezw. DMF, 1 godzina, temp. 25-55°C; (c) HCl (pH = 3-4), 2 godziny, 55°C



Schemat 43. Synteza metylotiobenzaldehydu **ald 5d**. Reagenty i warunki reakcji: (a) 10% r-r KOH w MeOH, 7 godzin, temp. 80°C; (b) Me₂SO₄, bezw. K₂CO₃, bezw. DMF, 1 godzina, temp. 25-55°C; (c) HCl (pH = 3-4), 2 godziny, 55°C

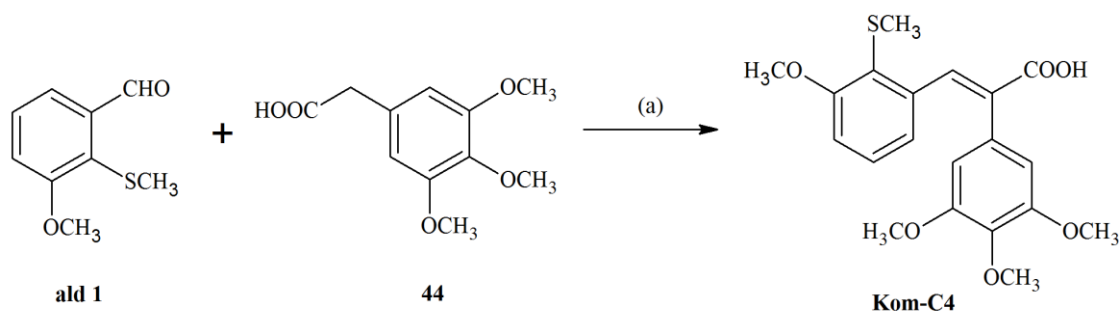
Wszystkie otrzymane metylotiobenzaldehydy **ald 1-5** (Tabela 18) scharakteryzowano za pomocą widm ¹H NMR i ¹³C NMR, R_f, widm masowych i temperatur topnienia. Dla opisanych związków **ald 1d**, **ald 2d**, **ald 3d** oraz **ald 5d** uzyskane zakresy temperatur topnienia były zbliżone do literaturowych [169].

Tabela 18. Otrzymane metylotiobenzaldehydy

Nazwa robocza	Wydajność [%]	Temperatura topnienia [°C]
ald 1d	67	57-59
ald 2d	95	47-49
ald 3d	98	44-46
ald 4d	50	65-66
ald 5d	48	50-52

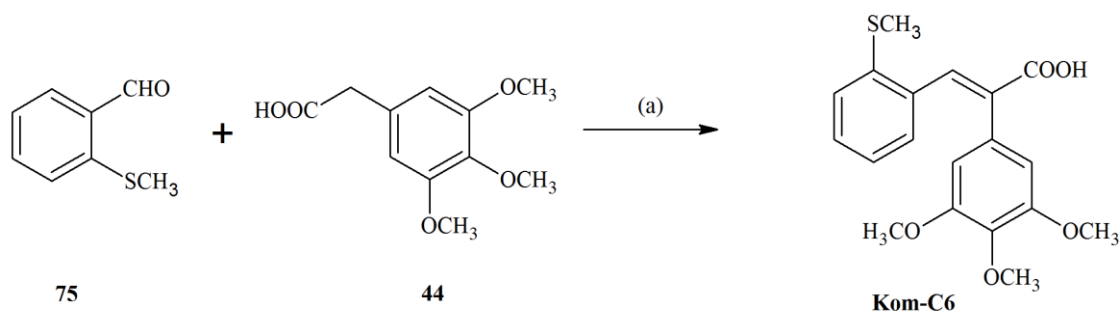
5.5.2. Synteza tiopochodnych kwasu α -fenylocynamonowego (Kom-C)

Pochodne posiadające układ kwasu (E)-1,2-difenylopropenowego (kwasu α -fenylocynamonowego) **Kom-C** otrzymywano w reakcji kondensacji Perkina między metylotiobenzaldehydami a kwasem 3,4,5-trimetoksyfenyloctowym **44** w środowisku bezwodnika kwasu octowego i trietyloaminy. Wybór właśnie tej metody podyktowany był jej wysoką stereoselektywnością pozwalającą na otrzymywanie praktycznie wyłącznie izomerów (E) syntetyzowanych związków (pierścienie fenylowe były w konfiguracji (Z)). Otrzymano dwie pochodne Kom-C w tej grupie a mianowicie związki oznaczone jako **Kom-C4** i **Kom-C6** (Schematy 34-35). W przypadku związku **Kom-C4** użytym metylotiobenzaldehydem był otrzymany wcześniej 3-metoksy-2-metylotiobenzaldehyd **ald 1d** a w przypadku tiopochodnej **Kom-C6** wykorzystano handlowo dostępny 2-metylotiobenzaldehyd **75**.



Schemat 44. Synteza tiopochodnej kwasu α -fenylocynamonowego **Kom-C4**. Reagenty i warunki reakcji:

(a) Ac₂O, Et₃N, 3 godziny, temp. 115°C



Schemat 45. Synteza tiopochodnej kwasu α -fenylocynamonowego **Kom-C6**. Reagenty i warunki reakcji:
(a) Ac_2O , Et_3N , 5 godzin, temp. 115°C

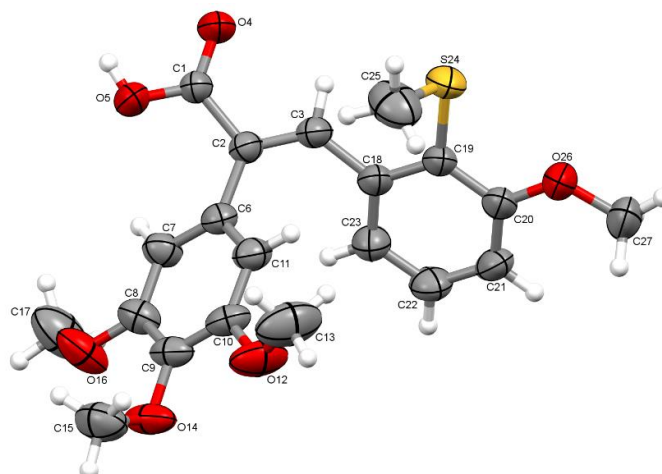
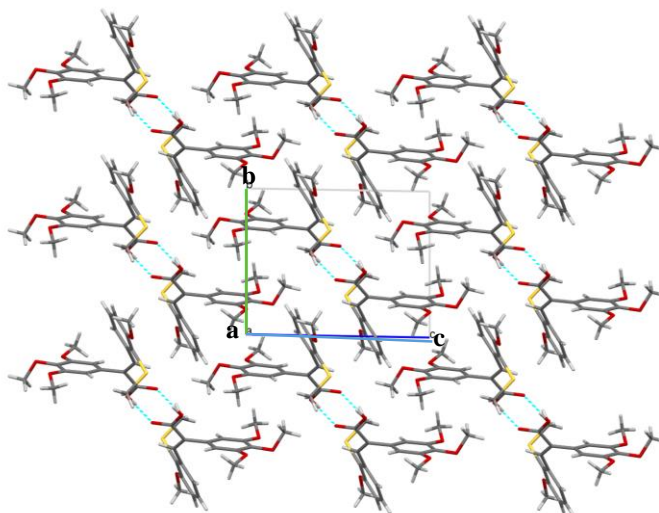
Tabela 19. Wydajności i temperatury topnienia otrzymanych tiopochodnych kwasu α -fenylocynamonowego (**Kom-C**)

Nazwa robocza	Wydajność [%]	Temperatura topnienia [$^\circ\text{C}$]
Kom-C4	33	178-180
Kom-C6	26	190-192

Związki scharakteryzowano za pomocą ^1H NMR i ^{13}C NMR, podanych w tabeli 19 temperatur topnienia, współczynnika R_f , widm IR oraz nisko- i wysoko rozdzielczych widm masowych. Na widmach IR zaobserwowano m.in. charakterystyczne szerokie pasma pochodzące od drgań rozciągających grupy O-H występujące dla związku **Kom-C4** przy 2932 cm^{-1} oraz dla pochodnej **Kom-C6** przy 2924 cm^{-1} . Ponadto dla związku **Kom-C4** uzyskano monokryształ (krystalizacja z mieszaniny heksanu i octanu etylu (1:1)), który przekazano do badań rentgenostrukturalnych Pani mgr Agnieszce Gielarze-Korzańskiej przy współpracy z Panem mgr Arturem Korzańskim. Dane krystalograficzne zaprezentowano w tabeli 20. Struktura krystalograficzna związku oraz upakowania jej cząsteczek wzdłuż wybranego kierunku zaprezentowano na rysunkach 49 i 50.

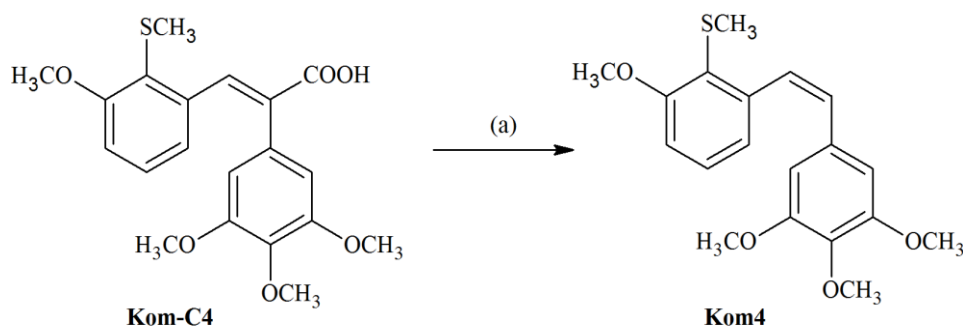
Tabela 20. Dane krystalograficzne dla związku **Kom-C4**

Wzór cząsteczkowy	$C_{20}H_{22}O_6S$	
Masa cząsteczkowa	390,44	
Temperatura	293(2) K	
Układ krystalograficzny	Trójskośny	
Grupa przestrzenna	P1	
Parametry komórki elementarnej	$a = 9,2115(6) \text{ \AA}$	$\alpha = 88,619(5)^\circ$
	$b = 9,2594(7) \text{ \AA}$	$\beta = 74,334(5)^\circ$
	$c = 11,9334(7) \text{ \AA}$	$\gamma = 81,360(6)^\circ$
Objętość	$968,76(11) \text{ \AA}^3$	
Z	2	
Gęstość obliczona	1.338 Mg/m^3	
Współczynnik absorpcji	0.200 mm^{-1}	
Liczba refleksów zmierzona/użyta	13988/3399	

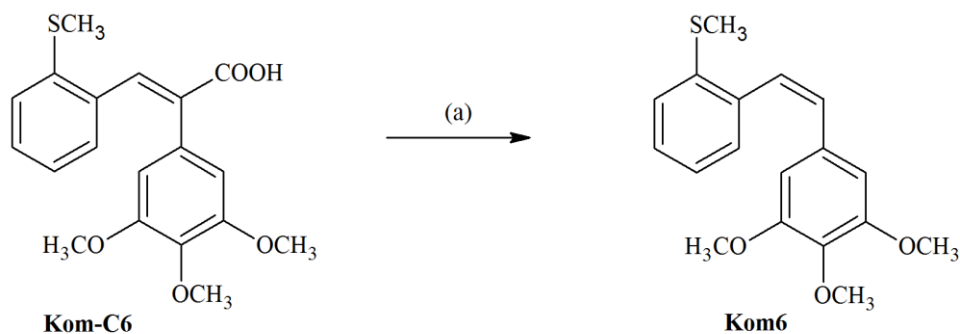
**Rysunek 49.** Struktura krystalograficzna związku **Kom-C4****Rysunek 50.** Upakowanie cząsteczek związku **Kom-C4** wzdłuż kierunku [100]

5.5.3. Synteza tiopochodnych (Z)-stilbenu (Kom)

Otrzymane tiopochodne kwasu α -fenylocynamonowego **KomC-4** i **Kom-C6** poddawano reakcji dekarboksylacji w temperaturze 200°C w atmosferze azotu otrzymując odpowiednio pochodną **Kom4** i **Kom6** (Schematy 46-47). Jako rozpuszczalnika używano chinolinę oraz sproszkowaną miedź jako katalizator. Jako metodę oczyszczania wykorzystywano chromatografię kolumnową stosując jako eluent mieszaninę heksanu i octanu etylu (10:1).



Schemat 46. Synteza tiopochodnej (Z)-stilbenu **Kom4**. Reagenty i warunki reakcji: (a) chinolina, azot, 2,5 godziny, temp. 200°C



Schemat 47. Synteza tiopochodnej (Z)-stilbenu **Kom4**. Reagenty i warunki reakcji: (a) chinolina, azot, 2,5 godziny, temp. 200°C

Związki **Kom4** i **Kom6** scharakteryzowano za pomocą widm ^1H NMR i ^{13}C NMR, podanych w tabeli 21 temperatur topnienia, współczynnika R_f , widm IR oraz nisko- i wysoko rozdzielczych widm masowych.

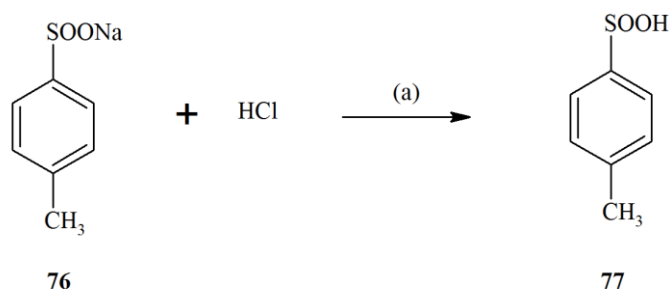
Tabela 21. Wydajności i temperatury topnienia otrzymanych tiopochodnych (Z)-stilbenu (**Kom**)

Nazwa robocza	R_1	R_2	Wydajność [%]	Temperatura topnienia [°C]
Kom4	SCH ₃	OCH ₃	39	78-80
Kom6	SCH ₃	H	37	73-75

Na widmach ^1H NMR zaobserwowano m.in. charakterystyczne stałą sprzężenia protonów winylowych dla układu (Z)-stilbenu wynoszącą odpowiednio 12,1 Hz dla związku **Kom4** oraz 12,0 Hz dla związku **Kom6**.

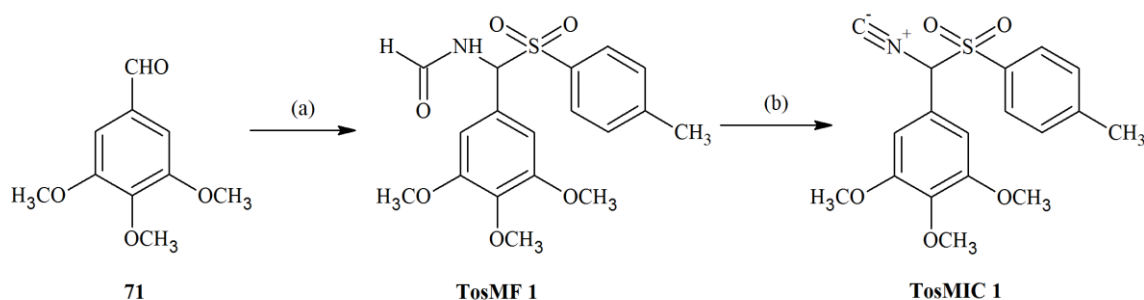
5.5.4. Synteza tosylometylo izocyjanków (TosMIC)

W syntezie zarówno oksazolowych jak i N-metyloimidazolowych pochodnych CA-4 konieczne było najpierw otrzymanie odpowiednio podstawionych pochodnych tosylometylo izocyjanków (TosMIC). Syntetyzowano je w trzy etapowej reakcji zgodnie z procedurą opisaną przez Wang'a i wsp. [95] wychodząc z soli sodowej kwasu 4-toluenosulfinowego **76**, którą następnie przekształcano do kwasu 4-toluenosulfinowego **77** w reakcji z kwasem solnym w środowisku wodno-eterowym (Schemat 48).

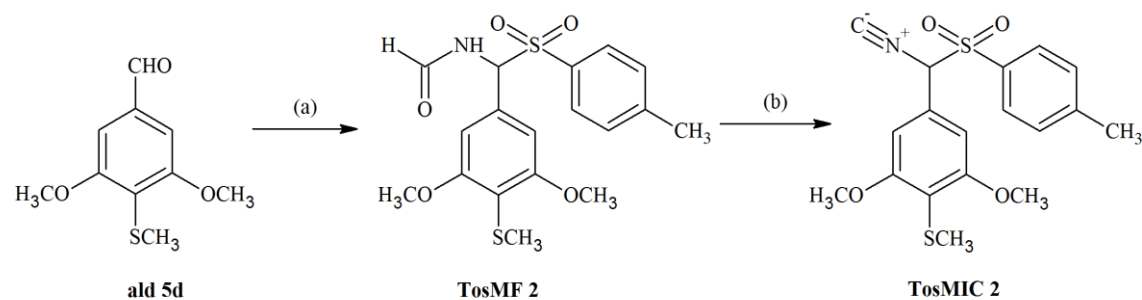


Schemat 48. Synteza kwasu 4-toluenosulfinowego **77**. Reagenty i warunki reakcji: (a) eter t-butylo-*o*-metylowy, H_2O , 10 minut, temp. pok., wyd. 83%

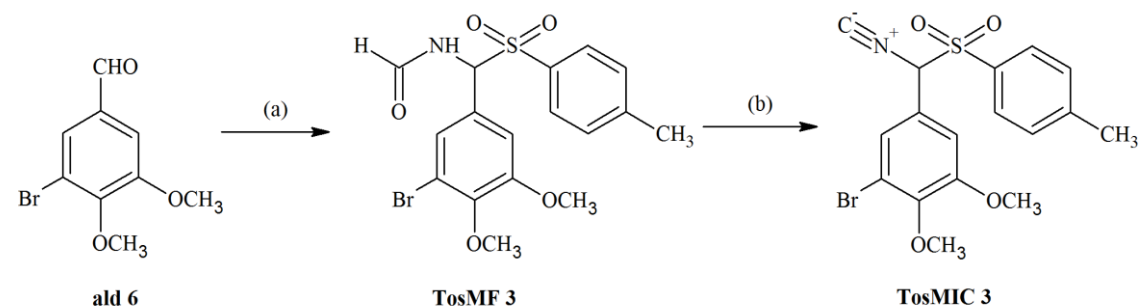
Kolejnym etapem była reakcja uzyskanego kwasu **77** z odpowiednimi aldehydami benzoesowymi zarówno otrzymanymi wcześniej jak i dostępnymi handlowo. W reakcji używano również formamid i katalityczne ilości kwasu kamforosulfonowego otrzymując pochodne tosylometyloformamidu (TosMF). Pochodne te poddawano następnie reakcji dehydratacji w obecności tlenochlorku fosforu i trietyloaminy w środowisku bezwodnego dimetoksyetanu (DME). Otrzymano w ten sposób trzy pochodne TosMIC oznaczone jako **TosMIC1**, **TosMIC2** oraz **TosMIC3** (Schematy 49-51). Do ich syntezy użyto odpowiednio 3,4,5-trimetoksybenzaldehydu **71** w przypadku **TosMIC1**, 3,5-dimetoksy-4-metylotiobenzaldehyd **ald 5d** w przypadku **TosMIC2** oraz aldehyd 5-bromoweratrowy **ald 6** dla **TosMIC3**.



Schemat 49. Synteza pochodnej tosylometrylo izocyjanku **TosMIC1**. Reagenty i warunki reakcji: (a) formamid, **77**, kwas kamforosulfonowy, 20 godzin, temp. 65°C, wyd. 59% (b) POCl₃, Et₃N, DME, 2,5 godziny, temp. -10÷25°C, wyd. 75%



Schemat 50. Synteza pochodnej tosylometrylo izocyjanku **TosMIC2**. Reagenty i warunki reakcji: (a) formamid, **77**, kwas kamforosulfonowy, 20 godzin, temp. 65°C, wyd. 72% (b) POCl₃, Et₃N, DME, 3,5 godziny, temp. -10÷25°C, wyd. 70%



Schemat 51. Synteza pochodnej tosylometrylo izocyjanku **TosMIC3**. Reagenty i warunki reakcji: (a) formamid, **77**, kwas kamforosulfonowy, 20 godzin, temp. 65°C, wyd. 57% (b) POCl₃, Et₃N, DME, 2,5 godziny, temp. -10÷25°C, wyd. 79%

W tabeli 21 zamieszczono wydajności końcowe otrzymanych pochodnych **TosMIC 1-3** oraz ich temperatury topnienia.

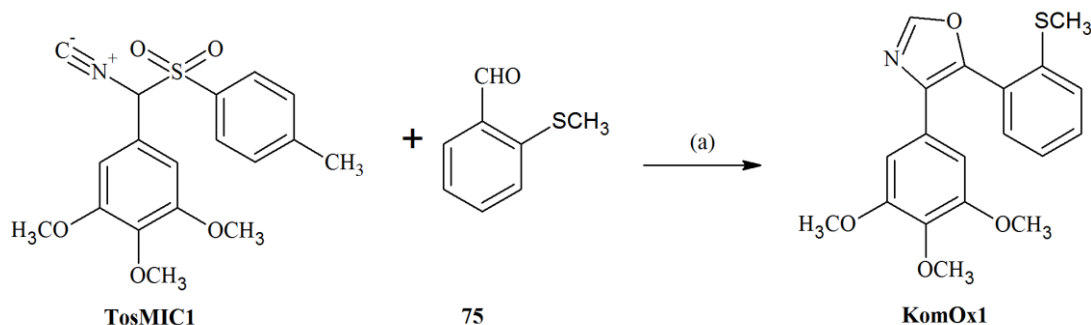
Tabela 21. Otrzymane pochodne **TosMIC**

Nazwa robocza	Wydajność	Temperatura topnienia
	[%]	[°C]
TosMIC1	67	104-105
TosMIC2	71	65-66
TosMIC3	68	50-52

Pochodne **TosMIC1** i **TosMIC3** zostały wcześniej opisane w literaturze [95, 170]. Uzyskany dla związku **TosMIC3** zakres temperatury topnienia był zbliżony do danych literaturowych [170] natomiast dla pochodnej **TosMIC1** brak jest danych literaturowych w tym zakresie. Ponadto wykonano dla wszystkich trzech pochodnych widma ^1H NMR i ^{13}C NMR oraz widma masowe. W widmach masowych EI MS obserwowano piki pochodzące od jonów fragmentacyjnych powstałych przez oderwanie od cząsteczki danego związku, grupy tosyłowej M-155, dla których wartość m/z wynosiła odpowiednio 206,1 (**TosMIC1**), 222,1 (**TosMIC2**) oraz 254 (**TosMIC3**).

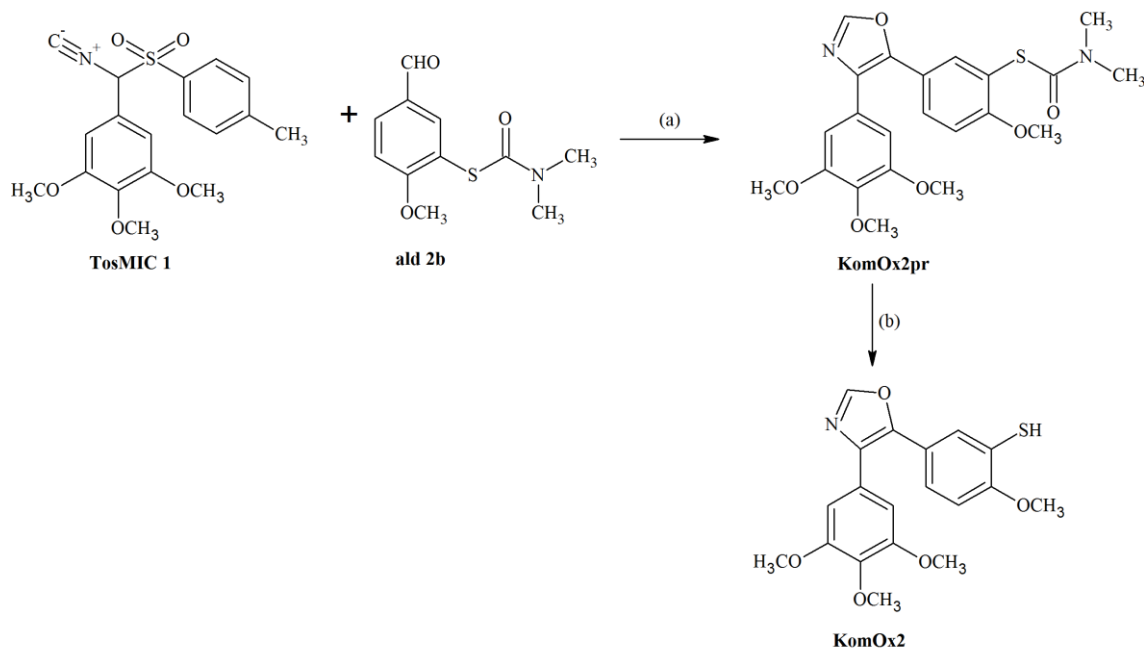
5.5.5. Synteza oksazolowych tiopochodnych CA-4 (**KomOx**)

Oksazolowe tiopochodne CA-4 otrzymywano w reakcji tiobenzaldehydów z pochodnymi tosylometylo izocyjanków **TosMIC** wg procedury opisanej przez Wanga [95] i Schoberta [96]. Jako rozpuszczalnika używano mieszaniny bezwodnego dimetoksyetanu i metanolu w stosunku objętościowym 3:10. Jako zasadę używano bezwodny węgiel potasu. W syntezie związku **KomOx1** wykorzystano handlowo dostępny 2-metylotiobenzaldehyd **75** oraz otrzymany tosylometylo izocyjank **TosMIC1** (Schemat 52).



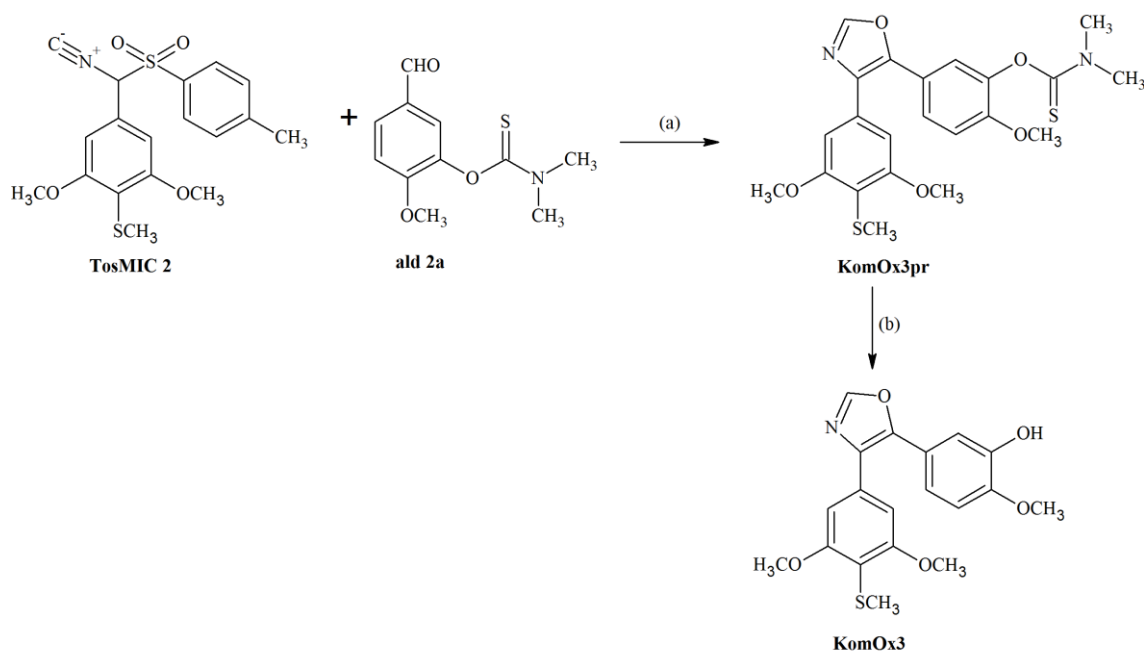
Schemat 52. Synteza **KomOx1**. Reagenty i warunki reakcji: (a) K_2CO_3 , DME:MeOH (3:10), 2 godziny, temp. wrzenia

Syntezę związku **KomOx2** prowadzono dwuetapowo (Schemat 53). Najpierw wymagane było otrzymanie odpowiedniej pochodnej tiokarbaminowej **KomOx2pr** w reakcji między S-tiokarbaminową pochodną benzaldehydu **ald 2b** a tosylometylo izocyjankiem **TosMIC1**. Następnie związek **KomOx2pr** hydrolizowano w środowisku 10% metanolowego roztworu wodorotlenku potasu. Reakcję prowadzono w atmosferze azotu.



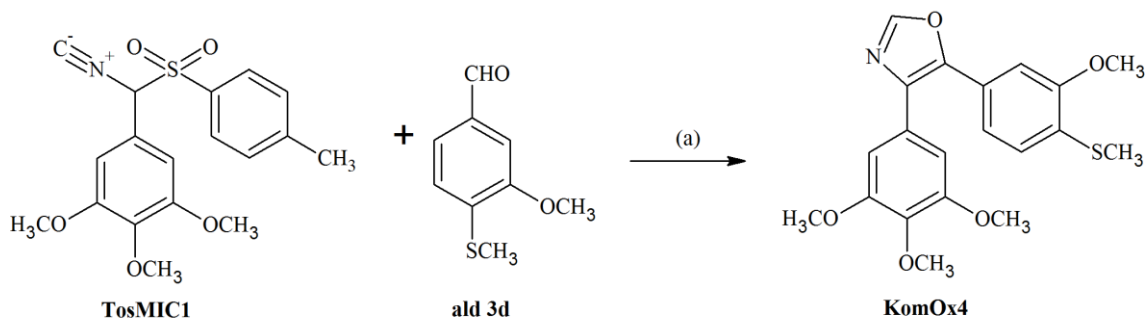
Schemat 53. Synteza **KomOx2**. Reagenty i warunki reakcji: (a) K_2CO_3 , DME:MeOH (3:10), 1,5 godziny, temp. wrzenia; (b) 10% KOH w MeOH, 1,5 godziny, temp. 80°C, azot

Syntezę związku **KomOx3** (Schemat 54) prowadzono w identyczny sposób, jak dla opisanej wyżej pochodnej **KomOx2**. W reakcji otrzymywania związku **KomOx3pr** użyto O-tiokarbaminową pochodną benzaldehydu **ald 2a** oraz tosylometylo izocyjanek **TosMIC2**.



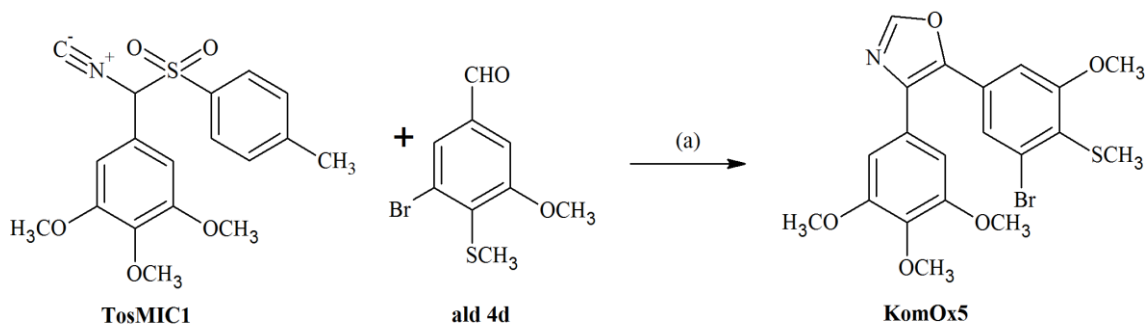
Schemat 54. Synteza **KomOx3**. Reagenty i warunki reakcji: (a) K_2CO_3 , DME:MeOH (3:10), 2 godziny, temp. wrzenia; (b) 10% KOH w MeOH, 2 godziny, temp. 80°C, azot

W syntezie związku **KomOx4** wykorzystano otrzymany metylotiobenzaldehyd **ald 3d** oraz otrzymany tosylometylo izocyjanek **TosMIC1** (Schemat 55).



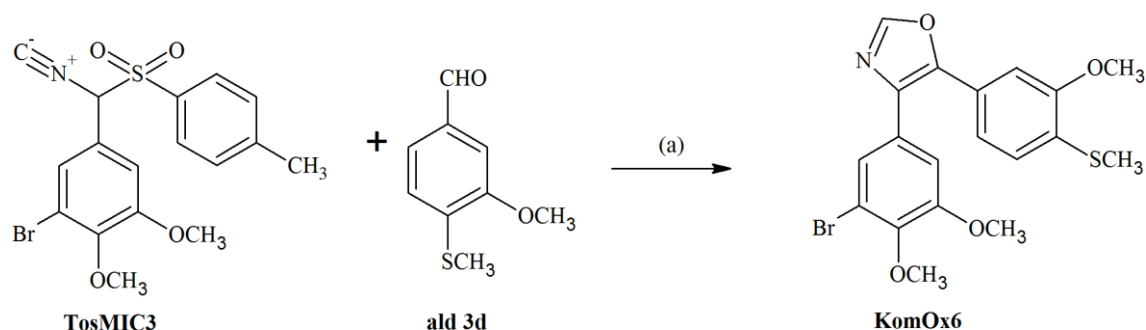
Schemat 55. Synteza **KomOx4**. Reagenty i warunki reakcji: (a) K_2CO_3 , DME:MeOH (3:10), 1 godzina, temp. wrzenia

Związek **KomOx5** otrzymano w reakcji metylotiobenzaldehydu **ald 4d** oraz tosylometylo izocyjanek **TosMIC1** (Schemat 56).

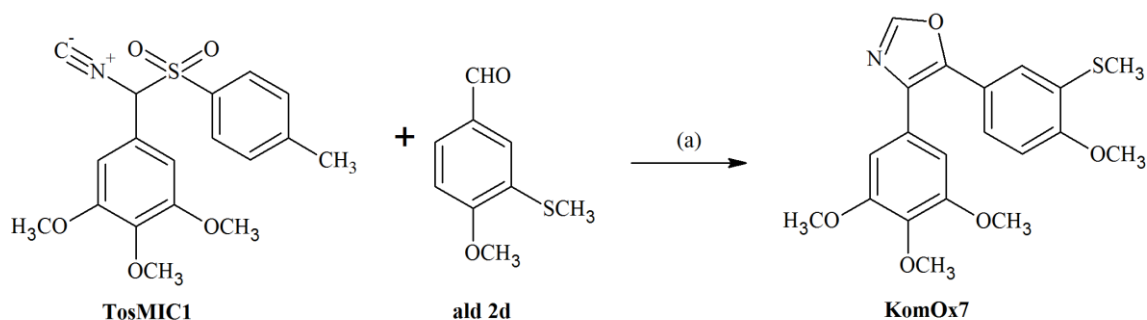


Schemat 56. Synteza **KomOx5**. Reagenty i warunki reakcji: (a) K_2CO_3 , DME:MeOH (3:10), 2 godziny, temp. wrzenia

W syntezie związków **KomOx6** i **KomOx7** wykorzystano metylotiobenzaldehydy odpowiednio **ald 3d** i **ald 2d** oraz tosylometylo izocyjanek **TosMIC3** (Schematy 57-58).



Schemat 57. Synteza **KomOx6**. Reagenty i warunki reakcji: (a) K_2CO_3 , DME:MeOH (3:10), 2 godziny, temp. wrzenia



Schemat 58. Synteza **KomOx7**. Reagenty i warunki reakcji: (a) K_2CO_3 , DME:MeOH (3:10), 2 godziny, temp. wrzenia

Wszystkie otrzymane oksazolowe tiopochodne CA-4 wraz z wydajnościami reakcji oraz temperaturami topnienia uzyskanych pochodnych zestawiono w tabeli 22. Wszystkie związki w tej grupie scharakteryzowano za pomocą widm 1H NMR i ^{13}C NMR, widm IR, nisko- i wysokorozdzielczych widm masowych oraz współczynnika R_f . W przypadku wysokorozdzielczych widm masowych uzyskane wartości zmierzonych mas jonu molekularnego badanych związków były w pełni zgodne z ich wartościami teoretycznymi.

Tabela 22. Otrzymane oksazolowe tiopochodne CA-4

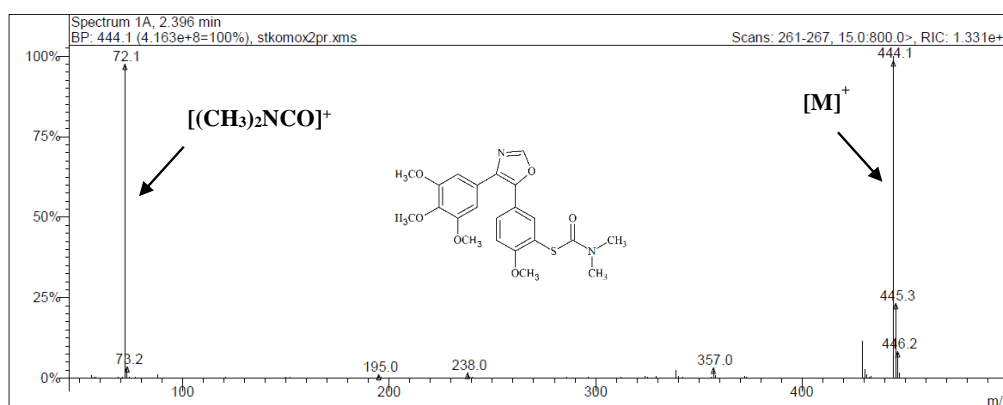
Nazwa robocza	Wydajność	Temperatura topnienia
	[%]	[°C]
KomOx1	44	87-89
KomOx2pr	45	123-124
KomOx2	29	133-135
KomOx3pr	74	130-132
KomOx3	55	161-162
KomOx4	60	114-116
KomOx5	49	112-114
KomOx6	52	102-105
KomOx7	47	102-105

Na widmach 1H NMR i ^{13}C NMR obserwowano sygnały pochodzące od charakterystycznych, powtarzających się elementów strukturalnych w cząsteczkach związków w tej grupie a mianowicie m.in. sygnały protonu metinowego obecnego przy węglu C2 w układzie oksazolu w zakresie 7,89-8,00 ppm, sygnały protonów grupy metylotiolowej w zakresie 2,47-2,43 ppm oraz odpowiadające im sygnały atomów węgla na widmie ^{13}C NMR w zakresie 14,34-18,24 ppm. Ponadto dla S-tiokarbaminowej pochodnej **KomOx2pr** obserwowano szerokie sygnały protonów

grup metylowych w obrębie ugrupowania tiokarbamoilowego przy 3.11 i 2.99 ppm o charakterystycznej niskiej intensywności (jak w przypadku omawianych wcześniej S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehidów). Natomiast dla O-tiokarbaminowej pochodnej **KomOx3pr** sygnały protonów grup metylowych w obrębie ugrupowania tiokarbamoilowego wystąpiły przy 3.44 i 3.34 ppm, o intensywności porównywalnej z sygnałami grup metoksyowych.

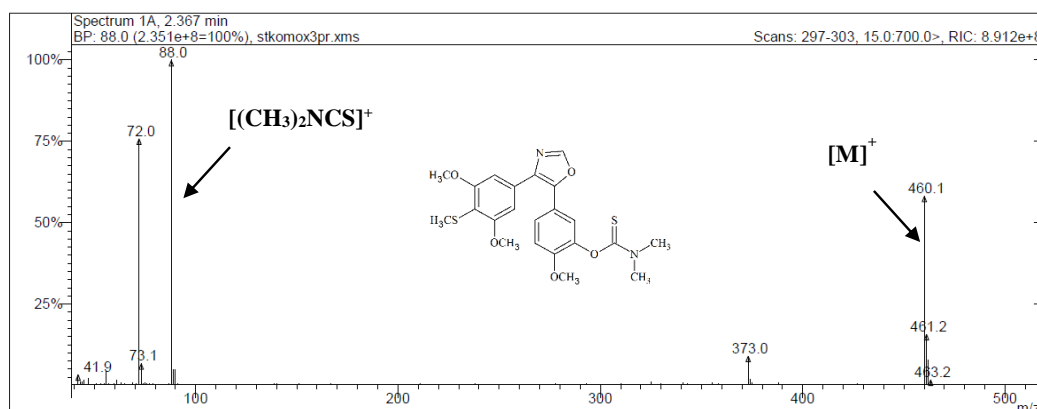
Na widmach IR obserwowano pasma drgań rozciągających grupy N=C2-H ugrupowania oksazolowego w zakresie 3134-3105 cm^{-1} . Ponadto dla związku **KomOx3** występowało szerokie pasmo drgań rozciągających grupy fenolowej przy 3134 cm^{-1} .

Na widmach masowych zaobserwowano dla związku **KomOx2pr** pik jonu fragmentacyjnego $[(\text{CH}_3)_2\text{NCO}]^+$ powstałego przez rozerwanie wiązania między atomem siarki a grupą karbonylową reszty tiokarbamoilowej o wartości m/z równej 72,1 (Rysunek 51).



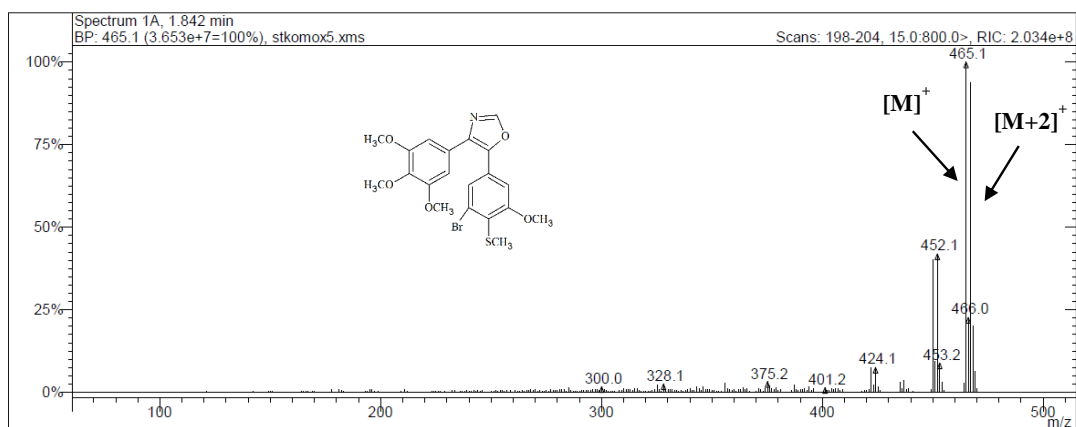
Rysunek 51. Widmo masowe związku **KomOx2pr**

Dla związku **KomOx3pr** pik jonu fragmentacyjnego $[(\text{CH}_3)_2\text{NCS}]^+$ powstałego przez rozerwanie wiązania między atomem tlenu a grupą tiokarbonylową reszty tiokarbamoilowej o wartości m/z równej 88 (Rysunek 52).

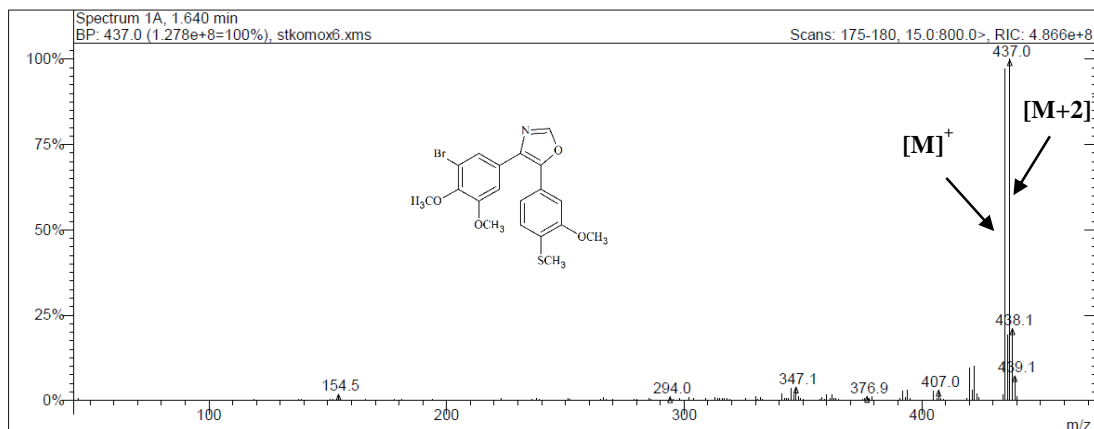


Rysunek 52. Widmo masowe związku **KomOx3pr**

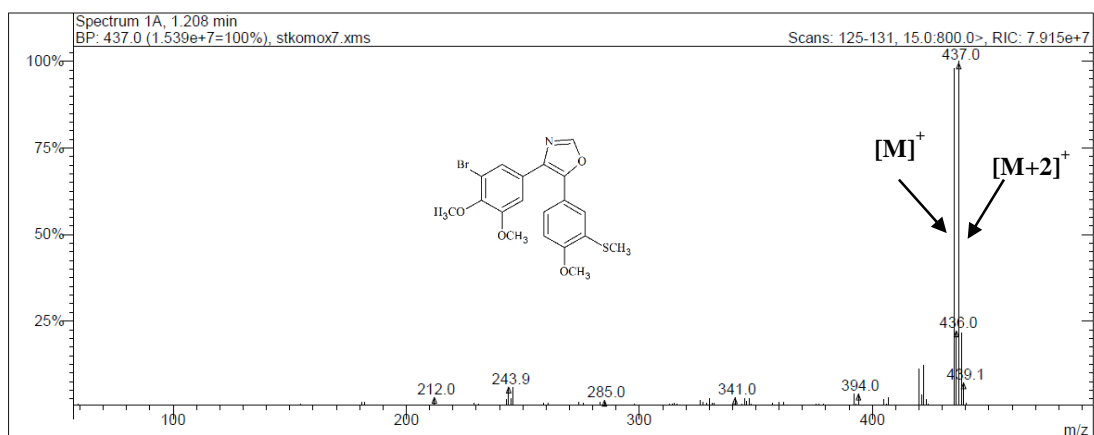
Dla związków **KomOx 5-7** występowały piki izotopowe atomu bromu $[M^{+2}]$ obecnego w tych związkach o wartościach odpowiednio 467,1 (Rysunek 53) dla związku **KomOx5** oraz 437 dla związków **KomOx6** i **KomOx7** (Rysunki 54-55).



Rysunek 53. Widmo masowe związku **KomOx5**



Rysunek 54. Widmo masowe związku **KomOx6**



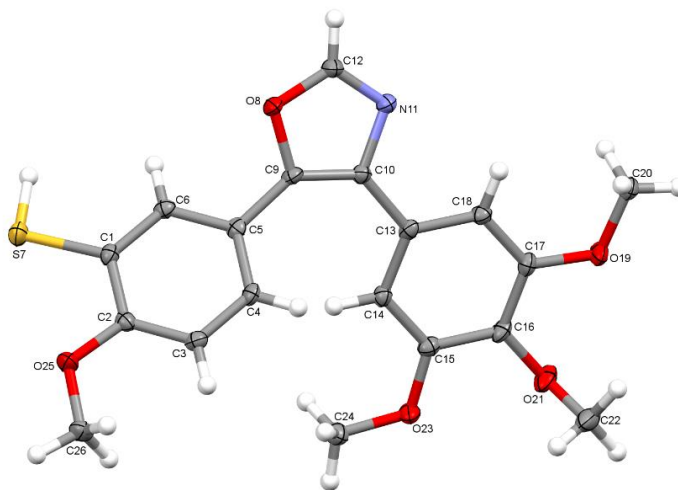
Rysunek 55. Widmo masowe związku **KomOx7**

Dla związków **KomOx2** i **KomOx7** otrzymano ponadto monokryształy (krystalizacja z heksanu dla związku **KomOx2** i z izopropanolu dla związku **KomOx7**, które przekazano do badań rentgenostrukturalnych Pani mgr Agnieszce Gielar-

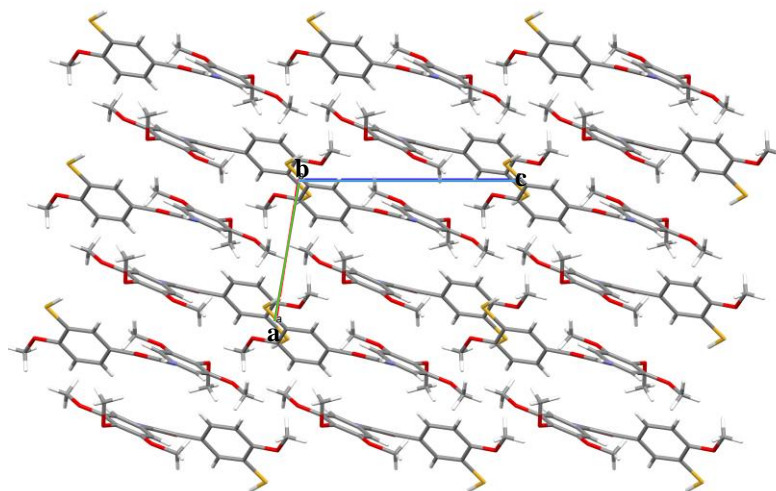
Korzańskiej przy współpracy z Panem mgr Arturem Korzańskim. Dane krystalograficzne zaprezentowano w tabelach 23-24. Struktury krystalograficzne związków oraz upakowania ich cząsteczek wzdłuż wybranego kierunku zaprezentowano na rysunkach 56-59

Tabela 23. Dane krystalograficzne dla związku **KomOx2**

Wzór cząsteczkowy	C ₁₉ H ₁₉ NO ₅ S	
Masa cząsteczkowa	373,41	
Temperatura	293(2) K	
Układ krystalograficzny	Trójskośny	
Grupa przestrzenna	P1	
Parametry komórki elementarnej	a = 7,7068(3) Å	α = 108,544(3)°
	b = 10,2384(3) Å	β = 94,602(3)°
	c = 11,9461(4) Å	γ = 100,912(3)°
Objętość	867,47(5) Å ³	
Z	2	
Gęstość obliczona	1.430 Mg/m ³	
Współczynnik absorpcji	0.218 mm ⁻¹	
Liczba refleksów zmierzona/użyta	15084/3052	



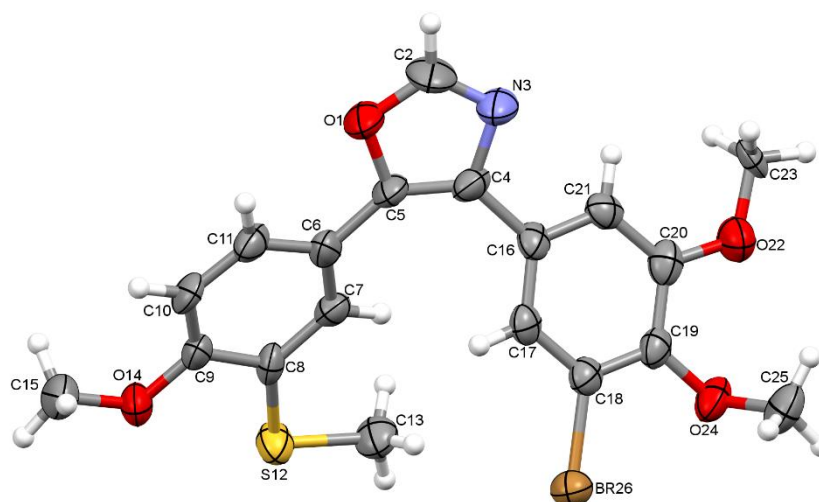
Rysunek 56. Struktura krystalograficzna związku **KomOx2**



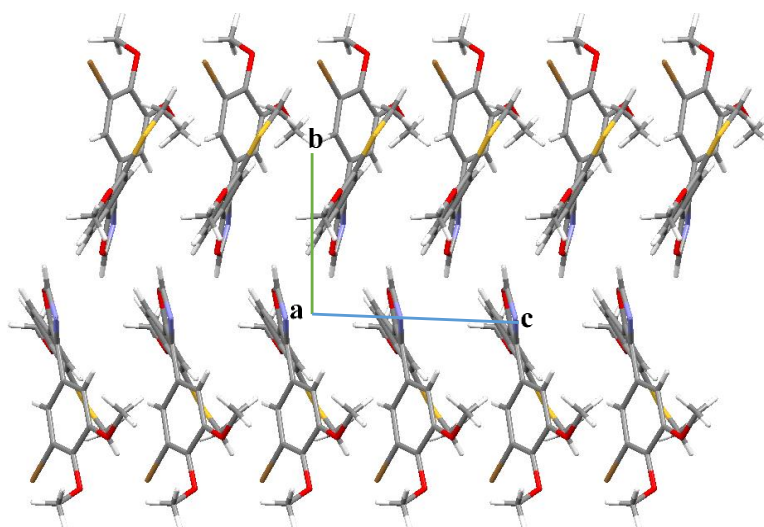
Rysunek 57. Upakowanie cząsteczek związku **KomOx2** wzdłuż kierunku [010]

Tabela 24. Dane krystalograficzne dla związku **KomOx7**

Wzór cząsteczkowy	$C_{19}H_{18}BrNO_4S$	
Masa cząsteczkowa	436,31	
Temperatura	293(2) K	
Układ krystalograficzny	Jednoskośny	
Grupa przestrzenna	$P2_1$	
Parametry komórki elementarnej	$a = 12,4359(9) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 4,1836(3) \text{ \AA}$	$\beta = 103,988(7)^\circ$
	$c = 17,9998(12) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Objętość	$908,70(11) \text{ \AA}^3$	
Z	2	
Gęstość obliczona	$1,595 \text{ Mg/m}^3$	
Współczynnik absorpcji	$2,402 \text{ mm}^{-1}$	
Liczba refleksów zmierzona/użyta	9380/3151	



Rysunek 58. Struktura krystalograficzna związku **KomOx7**

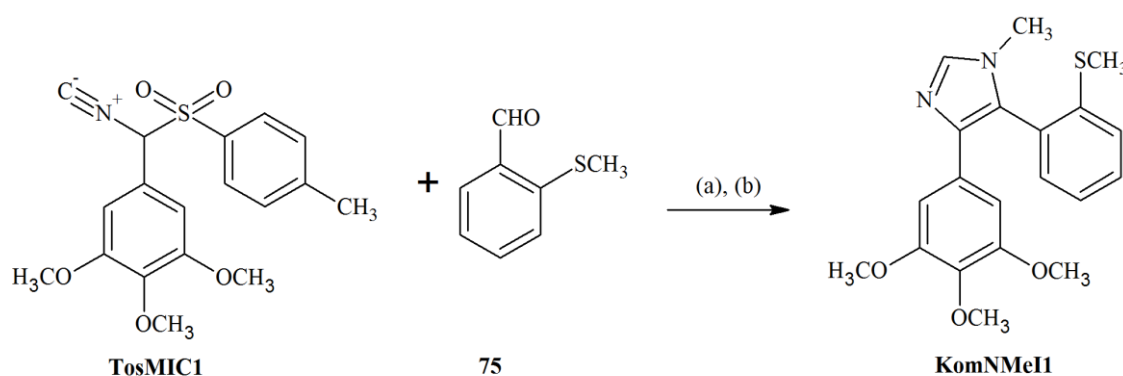


Rysunek 59. Upakowanie cząsteczek związku **KomOx7** wzdłuż kierunku [100]

5.5.6. Synteza N-metyloimidazolowych tiopochodnych CA-4 (KomNMeI)

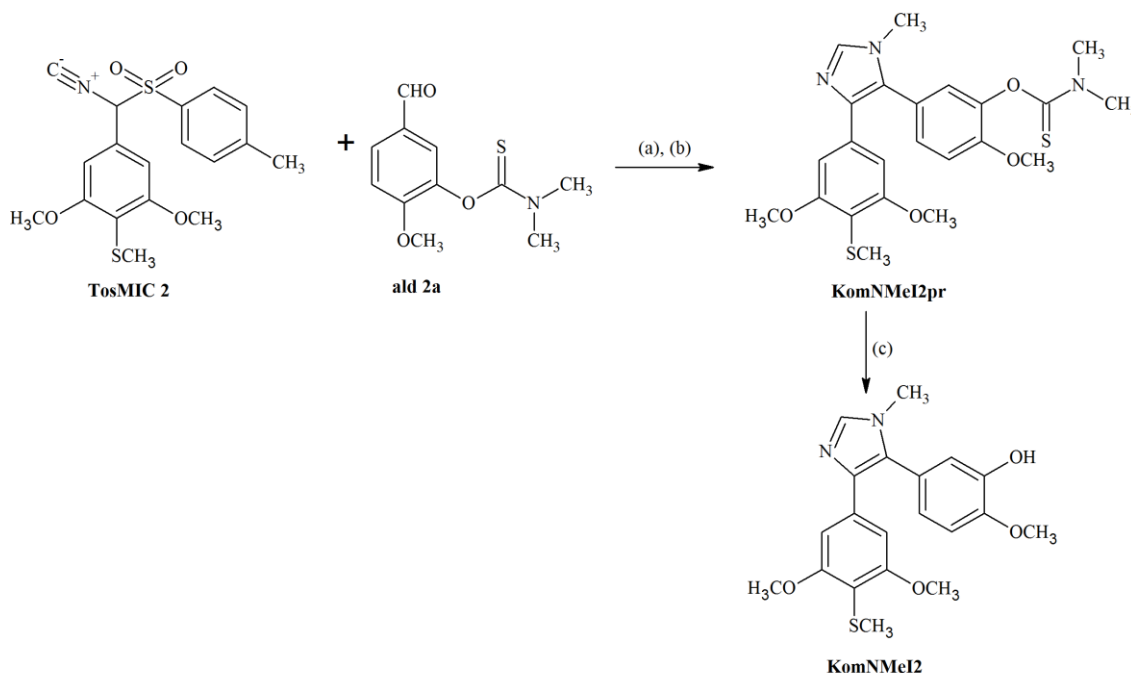
N-metyloimidazolowe tiopochodne CA-4 otrzymywano wg procedury opisanej przez Wang'a i wsp. [95] oraz Schoberta i wsp. [96]. Najpierw w reakcji odpowiednich tiobenzaldehydów z metyloaminą (33% roztwór w etanolu) w środowisku bezwodnego etanolu i katalitycznych ilości lodowatego kwasu octowego generowano *in situ* pochodne enaminowe. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawano pochodne tosylometrylo izocyjaneków TosMIC co pozwoliło na otrzymanie N-metyloimidazolowych tiopochodnych CA-4. Jako rozpuszczalnika używano bezwodnego dimetoksyetanu. Jako zasadę używano bezwodny węgiel potasu.

W syntezie związku **KomNMeI** wykorzystano handlowo dostępny 2-metylotiobenzaldehyd **75** oraz otrzymany tosylometrylo izocyjanek **TosMIC1** (Schemat 59).



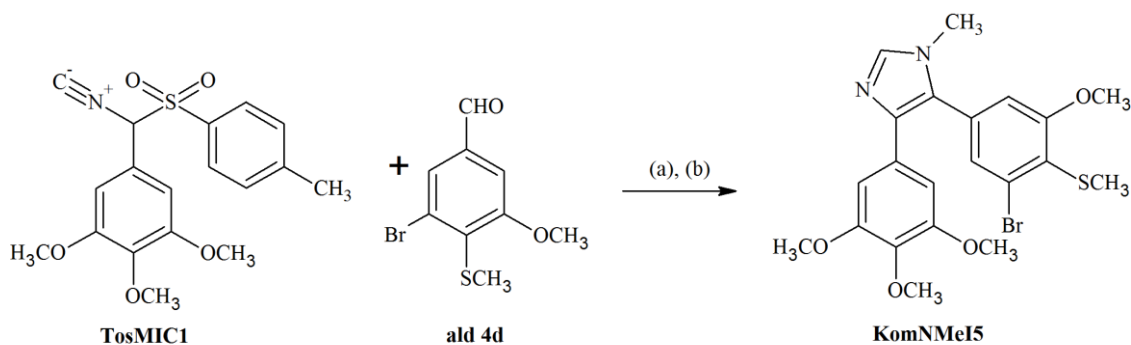
Schemat 59. Synteza **KomNMeI**. Reagenty i warunki reakcji: (a) MeNH₂ (33% r-r w EtOH), AcOH, EtOH, 2 godziny, temp. wrzenia; (b) K₂CO₃, DME, 3 godziny, temp. wrzenia

Syntezę związku **KomNMeI2** prowadzono dwuetapowo (Schemat 60). Najpierw wymagane było otrzymanie odpowiedniej pochodnej tiokarbaminowej **KomNMeI2pr** w reakcji między O-tiokarbaminową pochodną benzaldehydu **ald 2a** a tosylometrylo izocyjankiem **TosMIC2**. Następnie związek **KomNMeI2pr** hydrolizowano w środowisku 10% metanolewego roztworu wodorotlenku potasu. Reakcję prowadzono w atmosferze azotu.



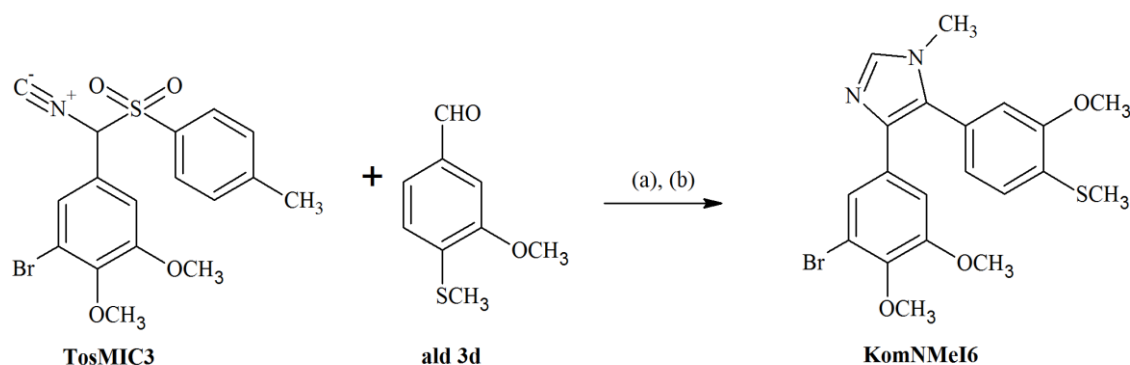
Schemat 60. Synteza **KomNMeI2**. Reagenty i warunki reakcji: (a) MeNH₂ (33% r-r w EtOH), AcOH, EtOH, 2 godziny, temp. wrzenia; (b) K₂CO₃, DME, 3 godziny, temp. wrzenia; (c) 10% KOH w MeOH, 5,5 godziny, temp. 80°C, azot

W syntezie związku **KomNMeI5** wykorzystano metylotiobenzaldehyd **ald 4d** oraz tosylometrylo izocyjanek **TosMIC1** (Schemat 61).

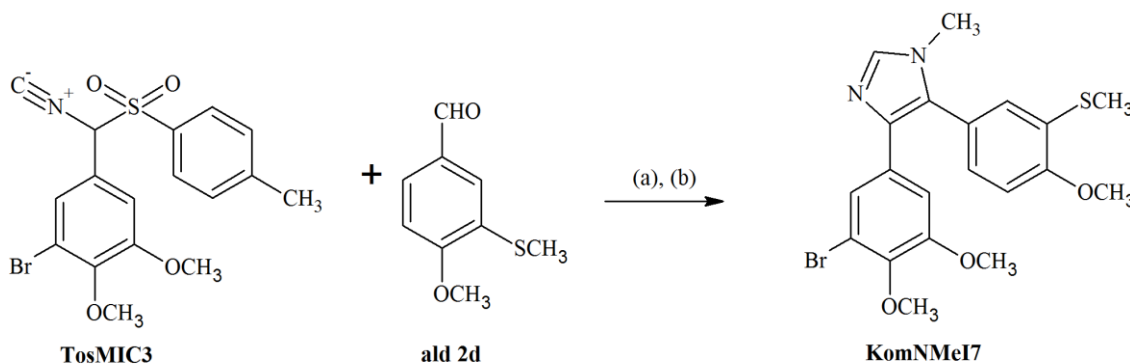


Schemat 61. Synteza **KomNMeI5**. Reagenty i warunki reakcji: (a) MeNH₂ (33% r-r w EtOH), AcOH, EtOH, 2 godziny, temp. wrzenia; (b) K₂CO₃, DME, 3 godziny, temp. wrzenia

W syntezie związków **KomNMeI6** i **KomNMeI7** wykorzystano metyliotiobenzaldehydy odpowiednio **ald 3d** i **ald 2d** oraz tosylometylo izocyjanek **TosMIC3** (Schematy 62-63).



Schemat 62. Synteza **KomNMeI6**. Reagenty i warunki reakcji: (a) MeNH₂ (33% r-r w EtOH), AcOH, EtOH, 2 godziny, temp. wrzenia; (b) K₂CO₃, DME, 3 godziny, temp. wrzenia



Schemat 63. Synteza **KomNMeI7**. Reagenty i warunki reakcji: (a) MeNH₂ (33% r-r w EtOH), AcOH, EtOH, 2 godziny, temp. wrzenia; (b) K₂CO₃, DME, 3 godziny, temp. wrzenia

Wszystkie otrzymane N-metyloimidazolowe tiopochodne CA-4 wraz z wydajnościami reakcji oraz temperaturami topnienia zestawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Otrzymane oksazolowe tiopochodne CA-4

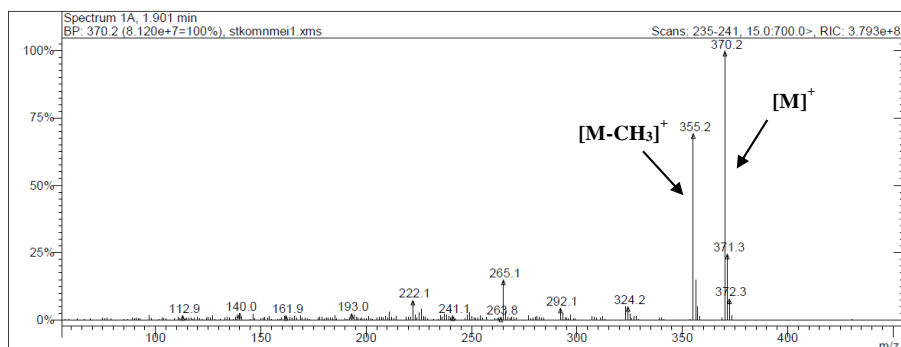
Nazwa robocza	Wydajność	Temperatura topnienia
	[%]	[°C]
KomNMeI1	98	156-158
KomNMeI2pr	50	192-194
KomNMeI2	33	123-125
KomNMeI5	19	126-130
KomNMeI6	17	130-135
KomNMeI7	25	130-135

Wszystkie związki w tej grupie scharakteryzowano za pomocą widm ¹H NMR i ¹³C NMR, widm IR, nisko- i wysokorozdzielczych widm masowych oraz współczynnika R_f.

W przypadku wysokorozdzielczych widm masowych uzyskane wartości zmierzonych mas jonu molekularnego badanych związków były w pełni zgodne z ich wartościami teoretycznymi.

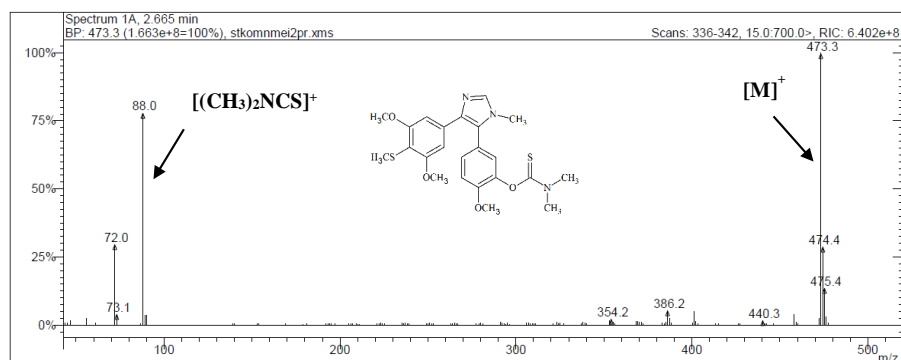
Na widmach ^1H NMR i ^{13}C NMR obserwowano sygnały pochodzące od charakterystycznych, powtarzających się elementów strukturalnych w cząsteczkach związków w tej grupie, a mianowicie m.in. sygnały protonu metinowego obecnego przy węglu C2 w układzie N-metyloimidazolu w zakresie 7,54-7,62 ppm, sygnały protonów grupy metylotiolowej w zakresie 2,35-2,48 ppm oraz odpowiadające im sygnały atomów węgla na widmie ^{13}C NMR w zakresie 14,42-18,16 ppm. Ponadto dla O-tiokarbaminowej pochodnej **KomNMeI2pr** obserwowano sygnały protonów grup metylowych w obrębie ugrupowania tiokarbamoilowego przy 3,37 i 3,45 ppm, o intensywności porównywalnej z sygnałami grup metoksyowych.

Na widmach masowych zaobserwowano: dla związku **KomNMeI1** pik jonu fragmentacyjnego $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ powstałego przez oderwanie od cząsteczki grupy metylowej przy azocie N1 o wartości m/z równej 355,2 (Rysunek 60).



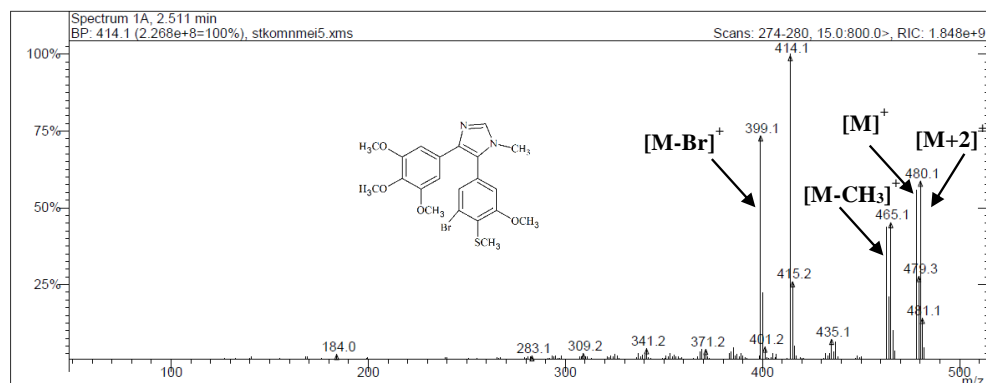
Rysunek 60. Widmo masowe związku **KomNMeI1**

Dla związku **KomNMeI2pr** zaobserwowano pik jonu fragmentacyjnego $[(\text{CH}_3)_2\text{NCS}]^+$ powstałego przez rozerwanie wiązania między atomem tlenu a grupą tiokarbonylową reszty tiokarbamoilowej o wartości m/z równej 88 (Rysunek 61).



Rysunek 61. Widmo masowe związku **KomNMeI2pr**

Dla związku **KomNMeI5** podobnie jak w przypadku związku **KomNMeI1** zaobserwowano pik jonu fragmentacyjnego $[M-CH_3]^+$ powstałego przez oderwanie od cząsteczki grupy metylowej przy azocie N1 o wartości m/z równej 463. Widoczny był również pik jonu fragmentacyjnego $[M-Br]^+$ o wartości m/z równej 399,1. Występował także pik izotopowy atomu bromu $[M^+2]$ o wartości m/z równej 480,1 (Rysunek 62).



Rysunek 62. Widmo masowe związku **KomNMeI5**

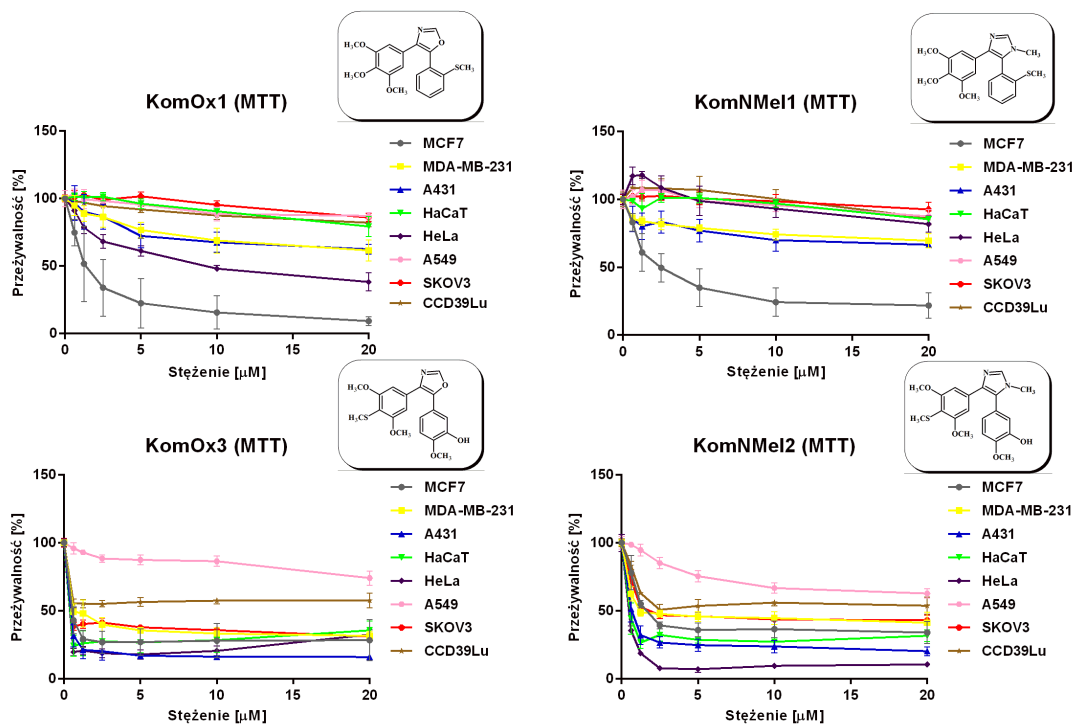
5.6. Badania biologiczne tiopochodnych CA-4

Badanie cytotoksyczności (test żywotności komórek – MTT) oraz wpływ na proces polimeryzacji tubuliny *in vitro*

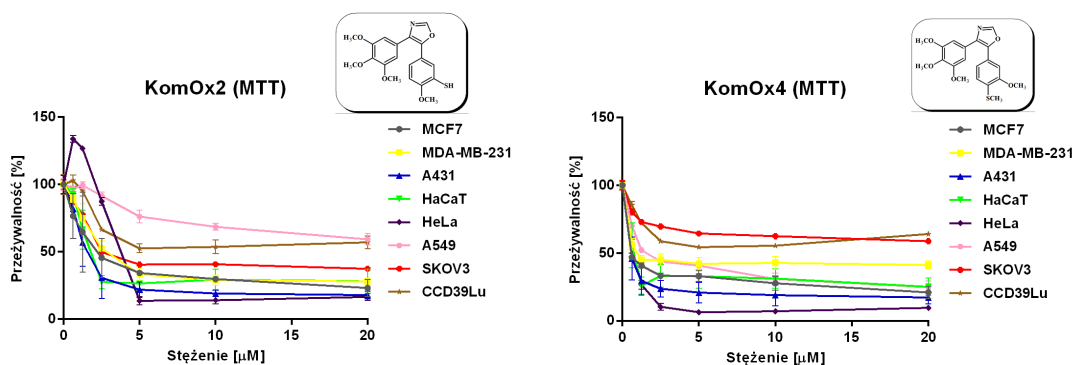
Wszystkie otrzymane tiopochodne CA-4 zostały przebadane pod kątem ich aktywności cytotoksycznej na wybranych liniach komórek nowotworowych: MCF7, MDA-MB-231, A439, HeLa, A549, SKOV3 i prawidłowych HaCaT i CCD39Lu. Identycznie jak w przypadku tiopochodnych RSV posłużono się testem MTT. Przeprowadzenie prób testów MTT dla poszczególnych linii komórkowych pozwoliło określić odpowiedni zakres stężeń związków badanych i związku referencyjnego (CA-4) a mianowicie: od 0-20 μM . Inkubacja związków badanych oraz związku referencyjnego w każdym teście wynosiła 48 godzin. Dla każdego stężenia wykonano 3 powtórzenia próby, a każda inkubacja wykonywana była w trzech niezależnych eksperymentach. Wyniki testów MTT pokazujących wpływ badanych tiopochodnych CA-4 oraz związku referencyjnego (CA-4) na procent przeżywających komórek (100% przyjęto dla grupy kontrolnej, w której stężenie badanego związku wynosiło 0 μM) przedstawiono na rysunkach 63-67.

Z uwagi, iż wśród tiopochodnych CA-4 występowały związki prezentujące cztery opisane wcześniej struktury rdzeniowe wyniki testów MTT zestawiono porównując

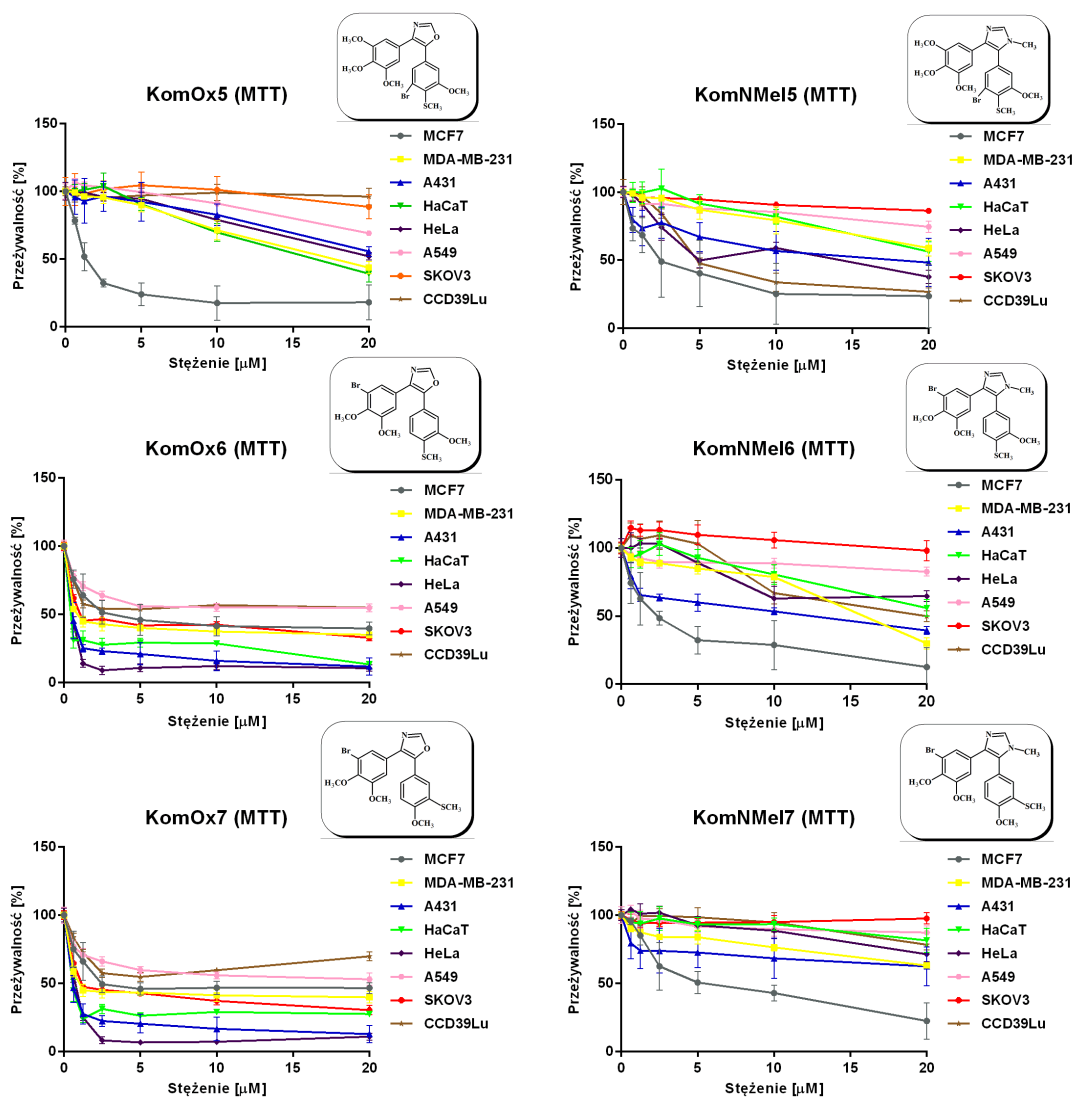
obok siebie w miarę możliwości związki charakteryzujące się różną strukturą rdzenia, ale posiadające ten sam układ podstawników w pierścieniach fenylowych.



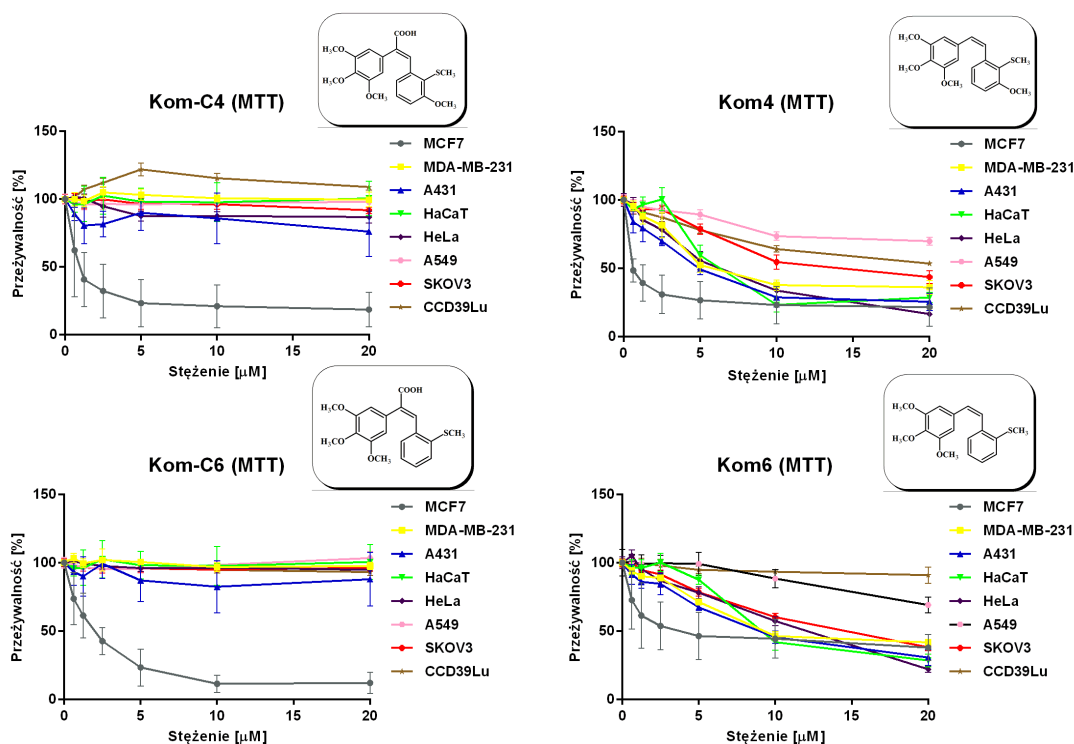
Rysunek 63. Wpływ tiopochodnych CA-4 (**KomOx1**, **KomOx3**, **KomNMeI1**, **KomNMeI2**) na przeżywalność komórek badanych linii (test MTT, 48 godz.)



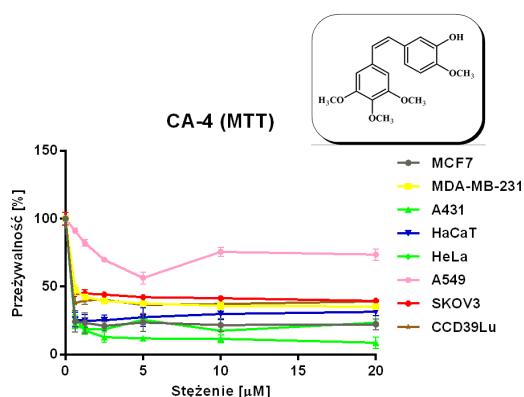
Rysunek 64. Wpływ tiopochodnych CA-4 (**KomOx2**, **KomOx4**) na przeżywalność komórek badanych linii (test MTT, 48 godz.)



Rysunek 65. Wpływ tiopochodnych CA-4 (KomOx5, KomOx6, KomOx7, KomNMeI5, KomNMeI6, KomNMeI7) na przeżywalność komórek badanych linii (test MTT, 48 godz.)



Rysunek 66. Wpływ tiopochodnych CA-4 (**Kom-C4**, **Kom-C6**, **Kom4**, **Kom6**) na przeżywalność komórek badanych linii (test MTT, 48 godz.)



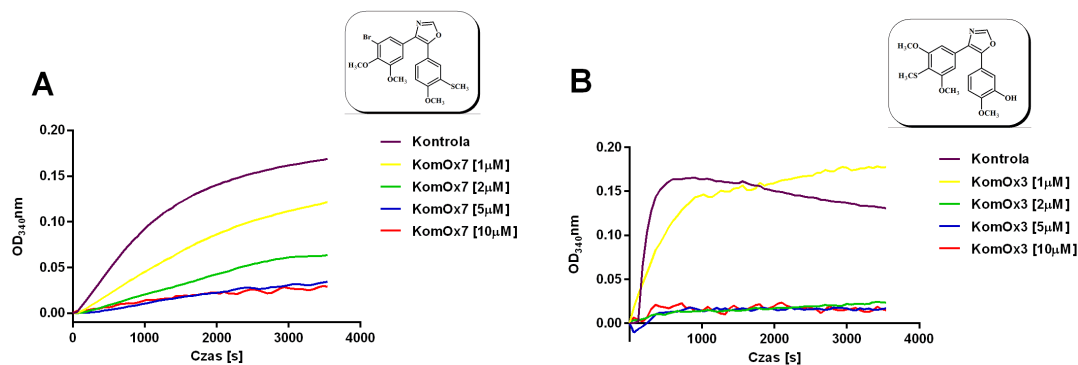
Rysunek 67. Wpływ CA-4 na przeżywalność komórek badanych linii (test MTT, 48 godz.)

Następnie wszystkie związki poddano badaniom skrinigowym w teście oceniającym ich wpływ na proces polimeryzacji tubuliny. Zastosowano stężenie 10 μM. Jako związku referencyjnego używano CA-4. W oparciu o przeprowadzone badania skrinigowe zostały sporządzone następujące założenia umożliwiające oszacowanie wpływu badanych związków:

- $IC_{50} < 10 \mu M$ zmniejsza szybkość polimeryzacji o 60–70%
- $IC_{50} \sim 10 \mu M$ zmniejsza szybkość polimeryzacji o 40–60%
- $IC_{50} > 10 \mu M$ zmniejsza szybkość polimeryzacji o 20–40%

- $IC_{50} \gg$ stężenia $10 \mu\text{M}$ brak wpływu na szybkość polimeryzacji

Dla dwóch najbardziej aktywnych inhibitorów **KomOx3** i **KomOx7** wyznaczono wartości IC_{50} . W tym celu dla czterech stężeń związków badanych 1, 2, 5 i $10 \mu\text{M}$ oraz kontroli wyznaczono przebieg krzywych polimeryzacji tubuliny w funkcji czasu (Rysunek 68).



Rysunek 68. Wpływ związków **KomOx7** (A) i **KomOx3** (B) na proces polimeryzacji tubuliny

Wyniki wszystkich badań cytotoksyczności oraz wpływu na proces polimeryzacji tubuliny wraz z rankingiem otrzymanym za pośrednictwem metody VCL-VS wyrażonym wartością konsensusowej funkcji oceniającej „Cscore” zestawiono w tabeli 26.

Tabela 26. Wyniki badań aktywności cytotoksycznej i antymitotycznej tiopochodnych CA-4 wraz z ich rankingiem VS (Cscore)

Związek	Linia, IC ₅₀ ± SD [μM]								Polimeryzacja tubuliny [μM]	Ranking VS CScore
	A431	HaCaT	MCF7	MDA-MB-231	HeLa	CCD39Lu	A549	SKOV3		
KomOx1	>20	>20	1.43±0.37	>20	7,33±0,91	>20	>20	>20	~ 10	3
KomOx2	1.22±0.82	1.28±0.75	2.11±0.57	2.87±0.34	4,44±0,97	>20	>20	3,18±0,26	< 10	4
KomOx3	0.25±0.20	0.32±0.09	0.45±0.14	0.71±0.16	0,009±0,002	>20	>20	0,25±0,12	0.64	5
KomOx4	0.43±0.29	0.43±0.23	0.60±0.10	0.85±0.13	0,645±0,03	>20	>20	1,48±0,16	~10	3
KomOx5	>20	16.74±2.64	1.42±0.23	17.87±0.90	>20	>20	>20	>20	>> 10	2
KomOx6	0.41±0.30	0.26±0.10	2.48±0.64	0.76±0.10	0,44±0,04	>20	>20	1,03±0,12	< 10	3
KomOx7	0.43±0.31	0.52±0.08	2.78±0.77	0.92±0.14	0,63±0,04	>20	>20	1,16±0,13	1.61	2
KomNMeI1	>20	>20	2.29±0.46	>20	>20	>20	>20	>20	>> 10	3
KomNMeI2	0.43±0.33	0.50±0.09	1.63±0.27	0.39±0.28	0,39±0,02	>20	>20	1,72±0,14	> 10	4
KomNMeI5	16.57±3.71	>20	2.51±0.87	>20	8,18±2,28	6,13±0,75	>20	>20	>> 10	1
KomNMeI6	13.64±3.23	>20	2.20±0.57	15.45±0.37	>20	19,26±2,14	>20	>20	>> 10	2
KomNMeI7	>20	>20	5.24±1.11	>20	>20	>20	>20	brak efektu	>> 10	3
Kom-C4	>20	brak efektu	0.95±0.33	brak efektu	>20	brak efektu	brak efektu	brak efektu	>>10	1
Kom-C6	>20	brak efektu	1.84±0.36	brak efektu	>20	brak efektu	brak efektu	brak efektu	~ 10	2
Kom4	3.61±2.44	9.56±3.03	0.65±0.19	11.73±0.85	6,18±0,46	>20	>20	14,47±1,25	~ 10	3
Kom6	8.22±4.66	12.82±1.83	2.35±1.04	14.20±0.54	11,68±2,54	>20	>20	14,08±0,61	>> 10	2
CA-4	0.25±0.21	0.19±0.08	0.17±0.04	0.56±0.08	0,11±0,11	>20	>20	0,38±0,09	2.3-2.8	5

Analizując wyniki zaprezentowanych badań aktywności przeciwnowotworowej tiopochodnych CA-4 widać generalnie ściśle zależności pomiędzy poziomem aktywności cytotoksycznej i antymitotycznej opartej na zdolności do hamowania polimeryzacji tubuliny.

Związki najbardziej aktywne antymitotycznie, a więc tiopochodne oksazolowe CA-4 **KomOx3** i **KomOx7** wykazują jednocześnie najsilniejszy efekt cytotoksyczny w badanych liniach komórek nowotworowych. Ponadto wyznaczone wartości IC_{50} w odniesieniu do hamowania polimeryzacji tubuliny są większe od związku referencyjnego CA-4 odpowiednio: 0,64 μ M dla związku **KomOx3** oraz 1,61 μ M dla pochodnej **KomOx7** vs 2,3-2,8 μ M dla CA-4. Oba związki wykazują działanie cytotoksyczne wobec linii komórek prawidłowych fibroblastów CCD39Lu przy znacznie wyższym stężeniu wynoszącym ponad 20 μ M. Można więc mówić w aspekcie badanej linii CCD39Lu o ich selektywnym działaniu przeciwnowotworowym. Jednocześnie w przypadku linii prawidłowej keratynocytów HaCaT nie zauważono różnicy w działaniu w stosunku do linii nowotworowej raka skóry A431. Co ciekawe CA-4 wykazuje równie wysoką cytotoksyczność zarówno dla badanych linii komórek nowotworowych, jak i prawidłowych.

Porównując związki w odniesieniu do różnych rdzeni molekularnych można stwierdzić, iż pochodne oksazolowe charakteryzują się wyższą aktywnością zarówno cytotoksyczną, jak i antymitotyczną w porównaniu do ich odpowiedników N-metyloimidazolowych (związek **KomOx1** vs **KomNMeI1**, **KomOx3** vs **KomNMeI2**, **KomOx5** vs **KomNMeI5**, **KomOx6** vs **KomNMeI6** oraz **KomOx7** vs **KomNMeI7**). Największe różnice widoczne są dla związków **KomOx5** i **KomOx7** w porównaniu do ich analogów **KomNMeI5** i **KomNMeI7**. Widoczne różnice w aktywności prezentują również pochodne w grupie Kom-C i Kom. Związki **Kom-C4** i **Kom-C6** praktycznie nie wykazują działania cytotoksycznego oraz wpływu na proces polimeryzacji tubuliny. Natomiast ich odpowiedniki **Kom4** i **Kom6** mają wyższe aktywności cytotoksyczne.

Uwzględniając z kolei wpływ podstawienia pierścieni fenylowych na efekt aktywności przeciwnowotworowej w badanych testach widać, iż najbardziej preferowane jest podstawienie pierścienia B w pozycjach 3 i 4 uwzględniając występujące w związkach podstawniki (metoksyl, hydroksyl, metylotiol, tiol) – związki **KomOx2**, **KomOx3**, **KomOx4**, **KomNMeI2**, **Kom-C4**, **Kom4**. Brak obecności

podstawników w tych pozycjach i podstawienie grupą metylotiolową pierścienia A w pozycji 2 znacznie zmniejsza aktywność cytotoksyczną i antymitotyczną – związki **KomOx1**, **KomNMeI1**, **Kom-C6**, **Kom6**. Ponadto podstawienie pierścienia B jednocześnie w pozycjach 3,4,5 powoduje znaczne obniżenie cytotoksyczności i aktywności antmitotycznej takich pochodnych – związki **KomOx5** i **KomNMeI5**. Konfrontując uzyskane wyniki z doniesieniami literaturowymi nt. badań SAR pochodnych CA-4 można powiedzieć, iż są one zgodne z występującymi tutaj zależnościami [95, 96, 106].

Porównując wyniki aktywności antmitotycznej opartej o wpływ na polimeryzację tubuliny z badaniami *in silico* opartymi na protokole VCL-VS widać, iż charakteryzują się one dużą korelacją. Można powiedzieć, że przyjęty model predykcyjny był w stanie z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć, które związki powinny charakteryzować się większą, a które mniejszą aktywnością antymitotyczną. Dla najbardziej aktywnego związku **KomOx3** w badanej grupie tiopochodnych CA-4 model przewidział jego aktywność dając mu najwyższą z możliwych ocen 5. Jednakże w przypadku drugiego w kolejności związku aktywnego **KomOx7** model nie był w stanie przewidzieć jego wysokiej aktywności dając mu ocenę 2. Należy jednak podkreślić, iż żaden z obecnie wykorzystywanych modeli predykcyjnych w procedurze wirtualnego skriningu nie jest w stanie idealnie przewidzieć aktywności dla badanej populacji związków. Związane jest to głównie z niedostateczną ilością danych na temat samego miejsca wiążącego (niewystarczająca rozdzielczość zdeponowanych w bazie PDB struktur krystalograficznych kompleksów liganda z receptorem), nie braniem pod uwagę warunków panujących w środowisku *in vivo* (dokowanie molekularne wykonywane jest zazwyczaj w próżni) i wpływu innych nieznanymi obecnie czynników, które mogą powodować specyficzne zachowanie białka docelowego (celu molekularnego). Zastosowany model predykcyjny wymaga dalszej walidacji oparciu o uzyskane wyniki aktywności biologicznej tiopochodnych CA-4 co powinno poprawić jego skuteczność.

6. PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono nowoczesne narzędzia służące racjonalnemu podejściu przy projektowaniu nowych tiopochodnych kombretastatyny A-4. Obejmowały one zastosowanie wirtualnego skriningu połączonego z generowaniem wirtualnej biblioteki kombinatorycznej, które wykorzystano do optymalizacji struktury wiodącej kombretastatyny A-4. W tym celu wykorzystano m.in. dokowanie molekularne do domeny kolchicynowej, modelowanie farmakoforowe 3D oraz modele QSAR. Jednocześnie założono bioizosteryczną wymianę atomu/atomów tlenu w cząsteczce CA-4, jako jeden z głównych aspektów jej modyfikacji strukturalnej. Z uwagi na niestabilność chemiczną cząsteczki CA-4 usztywniono ponadto mostek winylowy w jej strukturze poprzez zastosowanie heterocyklicznych układów oksazolu i N-metyloimidazolu.

Na podstawie wyników badań *in silico* wygenerowany został zestaw około 20 struktur będących tiopochodnymi CA-4 stanowiącymi podstawę do ich syntezy. Otrzymano ostatecznie 16 nowych tiopochodnych CA-4. Związki podzielone były na cztery podstawowe rdzenie strukturalne każdy zawierający układ stilbenowy (1,2-difenyloetenowy) a mianowicie: pochodne kwasu (E)-1,2-difenylopropenowego (Kom-C), pochodne (Z)-stilbenu (Kom), pochodne 1,2-difenylooksazolu (KomOx) oraz N-metylo-1,2-difenyloimidazolu (KomNMeI). Struktury otrzymanych pochodnych scharakteryzowano za pomocą metod spektroskopowych w tym: metod ^1H i ^{13}C NMR, IR, MS. Ponadto dla trzech związków **KomOx2**, **KomOx7** i **Kom-C4** otrzymano monokryształy, które pozwoliły na analizę ich struktury krystalograficznej, w tym upakowania w kryształach.

Związki poddano następnie badaniom aktywności antymitotycznej opartej o wpływ na proces polimeryzacji tubuliny oraz aktywności cytotoksycznej. Aktywność cytotoksyczną badano wykorzystując osiem linii komórkowych: 6 nowotworowych i 2 prawidłowe. Wśród linii nowotworowych wykorzystano: linię raka piersi estrogenozależną MCF7 i estrogenoniezależną MDA-MB-231, raka skóry A431, raka szyjki macicy HeLa, raka jelita grubego SKOV3 oraz raka płuc A549. Wśród linii prawidłowych wykorzystano linię ludzkich immortalizowanych keratynocytów HaCaT oraz fibroblastów CCD39Lu. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż grupą związków charakteryzującej się największą aktywnością cytotoksyczną oraz antymitotyczną były pochodne oksazolowe CA-4. Wśród nich najbardziej aktywny

związek oznaczony roboczo **KomOx3** (4-(3,4,5-trimetoksyfenilo)-5-(3-hydroksy-4-metoksyfenilo)oksazol) wykazywał bardzo silny efekt hamowania wzrostu komórek linii HeLa ($IC_{50} = 0,009 \mu M$ vs IC_{50} dla CA-4 wynoszące $0,11 \mu M$) oraz niewielki wpływ na komórki linii prawidłowej CCD39Lu. Stanowi on zatem przykład związku o wybiórczym efekcie działania przeciwnowotworowego co jest niezwykle pożądaną właściwością przy projektowaniu nowego leku.

Ponadto biorąc pod uwagę wysoką aktywność chemoprewencyjną tiopochodnych resweratrolu opartą o mechanizm hamowania izoform enzymu P450: CYP1A1, CYP1A2 oraz CYP1B1, która została określona w badaniach przeprowadzonych w macierzystej jednostce przeprowadzono syntezę ośmiu pochodnych z tej grupy będących strukturalnymi analogami (E)-4'-metylotiostilbenu. Struktury otrzymanych pochodnych scharakteryzowano za pomocą metod spektroskopowych w tym: metod 1H i ^{13}C NMR, IR, MS. Ponadto dla siedmiu związków **S1**, **S2**, **S3**, **S4**, **S6**, **S7** oraz **S8** otrzymano monokryształy, które pozwoliły na analizę ich struktury krystalograficznej, w tym upakowania w kryształach. Pochodne te posiadały różną ilość i konfigurację podstawników metoksylowych w pierścieniu A cząsteczki stilbenu.

Następnie uzyskane pochodne przebadano na aktywność cytotoksyczną na czterech liniach komórkowych: raka piersi estrogenozależnej MCF7 i estrogenoniezależnej MDA-MB-231, raka skóry A431 oraz ludzkich immortalizowanych keratynocytów HaCaT. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż związki posiadające trzy podstawniki metoksylowe w pierścieniu A stilbenu a więc związki oznaczone roboczo, jako **S7** ((E)-3,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben) i **S8** ((E)-2,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben) wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną w stosunku do wszystkich badanych linii większą niż aktywność związku referencyjnego resweratrolu. Celem wyjaśnienia mechanizmu działania tych związków przeprowadzono dla nich ocenę wpływu na proces polimeryzacji tubuliny. Wykazała ona, iż charakteryzują się one stabilizującym wpływem na ten proces podobnie jak zastosowany związek referencyjny paklitaksel.

Wyniki badań aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych tiopochodnych stilbenu a zwłaszcza obiecujące wyniki wpływu analogów CA-4 z rdzeniem oksazolowym na proces hamowania polimeryzacji tubuliny jak również zastosowany z sukcesem protokół VCL-VS stanowią podstawę do dalszych prac na drodze racjonalnego projektowania nowych cząsteczek aktywnych, których mechanizm działania oparty jest o wpływ na proces polimeryzacji tubuliny.

7. STRESZCZENIE

Mikrotubule są dynamicznymi strukturami białkowymi biorącymi udział w istotnych dla komórki procesach biologicznych, jak m.in. transport wewnętrzny, aktywność ruchowa i co najistotniejsze, podział zachodzący w trakcie mitozy. Zbudowane są z monomerów α i β tubuliny, które łączą się podczas procesu polimeryzacji. Tubulina jest jednym z niezwykle istotnych i często branych pod uwagę celów molekularnych dla nowych cząsteczek aktywnych uzyskiwanych na drodze projektowania potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Wśród tej grupy związków, stilbeny (pochodne 1,2-difenyloetenu), z resweratrolom i kombretastatyną A-4 jako strukturami wiodącymi, stanowią obiecującą grupę związków o nieskomplikowanej strukturze, stwarzającą szerokie możliwości modyfikacji strukturalnych pozwalających na poprawę ich naturalnych właściwości antykancerogennych.

W pracy zaprezentowano m.in. metody racjonalnego podejścia w projektowaniu nowych tiopochodnych kombretastatyny A-4 w oparciu o implementację protokołu VCL-VS, narzędzia do generowania i analizy wirtualnych bibliotek kombinatorycznych. Jej główne etapy zawierały utworzenie wirtualnej biblioteki kombinatorycznej (VCL) opartej o zaproponowaną i zoptymalizowaną ścieżkę reakcyjną syntezy tiopochodnych CA-4. Następnie poprzez zastosowanie metod wirtualnego skringingu wykorzystując szereg filtrów: dokowanie molekularne, mapowanie na modele farmakoforowe 3D oraz modele QSAR, zawężono początkową bibliotekę składającą się z ponad 2000 struktur do 20. Ostatecznie przeprowadzono syntezę 16 tiopochodnych CA-4 oraz badania skringowe wpływu na polimeryzację tubuliny. Ponadto przeprowadzono badania aktywności cytotoksycznej w teście MTT na ośmiu liniach komórkowych (6 nowotworowych i 2 prawidłowych). Uzyskane wyniki pozwoliły na wyłonienie aktywnego związku z grupy oksazolowych pochodnych (Z)-stilbenu o aktywności przewyższającej aktywność związku referencyjnego CA-4 na komórkach linii HeLa (IC₅₀ 0,009 vs 0,11 μ M). Jednocześnie wykazano dużą korelację między wynikami analizy wirtualnego skringingu a aktywnością antymitotyczną *in vitro*.

Innym aspektem pracy była synteza tiopochodnych resweratrolu – analogów z grupy pochodnych (E)-stilbenu. Na podstawie wcześniejszych badań nad tą grupą związków i obiecujących wyników dotyczących ich aktywności chemoprewencyjnej

zsyntetyzowano osiem tiopochodnych będących strukturalnymi analogami (E)-4'-metylotiostilbenu i oceniono ich aktywność antyproliferacyjną w teście MTT na czterech liniach komórkowych (3 nowotworowych i 1 prawidłowej). Wyłonione na ich podstawie najbardziej aktywne struktury **S7** ((E)-3,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben) oraz **S8** ((E)-2,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben) oceniono w teście polimeryzacyjnym tubuliny. Oba związki wykazały stabilizujący efekt na proces polimeryzacji tubuliny co dowodzi, iż jednym z mechanizmów aktywności cytotoksycznej tych związków może być ich aktywność antymitotyczna.

8. ABSTRACT

„Design, synthesis and evaluation of the biological activity of stilbene thioderivatives”

Microtubules are dynamic protein structures involved in important cell biological processes such as internal transport, motility and cell division during mitosis. They consist of monomers of α,β tubulin and bind to each other during the polymerization process. Tubulin is a significant and heavily researched molecular target for designing of new active molecules possessing anticancer activity. Among this group of compounds stilbenes (1,2-diphenylethene derivatives) with combretastatin A-4 and resveratrol as leading structures represent a promising class of compounds with a simple structure, taking the possibility of extensive structural modifications that improve their natural anticancer properties.

One of the methods of rational approach in the design of new thioderivatives of combretastatin A-4, based on the protocol implementation of the VCL-VS (virtual combinatorial library – virtual screening) have been presented. The main steps include the creation of a virtual combinatorial library based on proposed CA-4 thioderivatives synthetic pathways. Then, through the use of virtual screening methods, using a series of filters such as: molecular docking, mapping to 3D pharmacophoric models and QSAR models, initial library consisting of over 2000 structures were reduced to 20. Then 16 compounds were synthesized and their effect on tubulin polymerization using Tubulin Polymerization assay kit was evaluated. In addition, a study of cytotoxic activity in the MTT assay for eight cell lines (six tumor and two normal cell lines) were evaluated. The results enabled the identification of the active compound from the group of the oxazole (Z)-stilbene thioderivatives with activity exceeding that of the reference compound CA-4 in the HeLa cells (IC_{50} 0.009 vs 0.11 μ M). A correlation between the results of virtual screening tests and *in vitro* antitubulin activity can be noticed.

Another aspect of this thesis was the synthesis of resveratrol thioanalogs from the group of (E)-stilbene. Based on previous studies on this class of compounds and their promising results of chemopreventive activity, eight structural analogs of 4'-methylthio-*trans*-stilbene and their antiproliferative activity in the MTT assay on four cell lines (three tumor and one normal cell lines) were performed. The most active structure **S7** (((E)-3,4,5-trimethoxy-4'-methylthiostilbene) and **S8** ((E)-2,4,5-trimethoxy-4'-methylthiostilbene) were evaluated in a tubulin polymerization assay. Both compounds

showed a stabilizing effect on tubulin polymerization process which shows that one of the mechanisms of their cytotoxic activity is their antimitotic activity.

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] Bielska, E.; Lucas, X.; Czerwoniec, A.; Kasprzak, J. M.; Kamińska, K. H.; Bujnicki, J. M. Virtual screening strategies in drug design – methods and applications. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* **2011**, 92, 249-264.
- [2] Reddy, A. S.; Pati, P.; Kumar, P.; Pradeep, H. N.; Sastry, G. N. Virtual screening in drug discovery – a computational perspective. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2007**, 8, 329-351.
- [3] Johnson, M. A.; Maggiora, G. M., Eds.; Concepts and applications of molecular similarity. Wiley-VCH: Weinheim, **1990**.
- [4] Projektowanie leków – deskryptory;
https://www.icm.edu.pl/kdm/Projektowanie_leków.
- [5] Kurczab, R. Opracowanie i weryfikacja protokołu wirtualnego skriningu, jako narzędzia wspomagającego proces poszukiwania nowych leków. *Rozprawa doktorska*, Instytut Farmakologii PAN, Zakład Chemii Leków, Kraków **2013**.
- [6] Yang, S.-Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discov. Today*, **2010**, 15, 444-450.
- [7] Langer, T.; Hoffmann, R. D., Eds. Pharmacophores and pharmacophore searches. Wiley-VCH: Weinheim, **2006**.
- [8] Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1998). *Pure & Appl. Chem.* **1998**, 70, 1129-1143.
- [9] Son, M.; Baek, A.; Sakkiyah, S.; Park.; John, S.; Lee, K. W. Exploration of Virtual Candidates for Human HMG-CoA Reductase Inhibitors Using Pharmacophore Modeling and Molecular Dynamics Simulations *PLOS ONE* **2013**, 8, 1-10.
- [10] Kurczab, R. Znaleźć igłę w stogu siana, *BPM Przemysł Farmaceutyczny* **2011**, 5, 88-92.
- [11] Yearly growth of total structures;
<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/contentGrowthChart.do?content=total&seqid=100>.

- [12] Miller, M.; Schneider, J.; Sathyanarayana, B. K.; Toth, M. V.; Marshall, G. R.; Clawson, L.; Selk, L.; Kent, S. B.; Wlodawer, A. Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science* **1989**, 246, 1149-52.
- [13] Hosur, M. V.; Bhat, N.; Kempf, D. J.; Baldwin, E. T.; Liu, B.; Gulnik, S.; Wideburg, N. E.; Norbeck, D. W.; Appelt, K.; Erickson, J. W. Influence of stereochemistry on activity and binding modes for C2 symmetry-based diol inhibitors of HIV-1 protease. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 847-855.
- [14] Adachi, M.; Ohhara, T.; Kurihara, K.; Tamada, T.; Honjo, E.; Okazaki, N.; Arai, S.; Shoyama, Y.; Kimura, K.; Matsumura, H.; Sugiyama, S.; Adachi, H.; Takano, K.; Mori, Y.; Hidaka, K.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y.; Kuroki, R. Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 12, 4641-4646.
- [15] Lengauer, T.; Rarey, M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 402-406.
- [16] Verdonk, M. L.; Berdini, V.; Hartshorn, M. J.; Mooij, W. T.; Murray, C. W.; Taylor, R. D.; Watson, P. Virtual screening using protein-ligand docking: avoiding artificial enrichment. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, 44, 793-806.
- [17] Shoichet, B. K.; McGovern, S. L.; Wei, B.; Irwin, J. J. Lead discovery using molecular docking. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 439-446.
- [18] Mikstacka, R.; Rimando, A. M.; Dutkiewicz, Z.; Stefański, T.; Sobiak, S. Design, synthesis and evaluation of the inhibitory selectivity of novel trans-resveratrol analogues on human recombinant CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 5117-5126.
- [19] Stahl, M.; Rarey, M. Detailed analysis of scoring functions for virtual screening. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1035-1042.
- [20] Deng, Z.; Chuaqui, C.; Singh, J. Structural interaction fingerprint (SIFt): a novel method for analyzing three-dimensional protein-ligand binding interactions. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 337-344.
- [21] Langmuir, I. Isomorphism, isosterism and covalence. *J. Am. Chem. Soc.* **1919**, 41, 1543-1559.
- [22] Burger, A. Medicinal Chemistry, 3rd Ed., NY, EUA, Wiley, **1970**, 127.

- [23] Burger, A. Isosterism and bioisosterism in drug design. *Prog. Drug Res.* **1991**, 37, 287-371.
- [24] Lima, L.M.; Barreiro, E.J.; Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 23-49.
- [25] Brown, N. Bioisosteres in Medicinal Chemistry Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2012**.
- [26] Bhatia, R.; Sharma, V.; Shrivastava, B.; Singla, R. K. A Review on Bioisosterism: A Rational Approach for Drug Design and Molecular Modification. *Pharmacologyonline* **2011**, 1, 272-299.
- [27] Clader, J. W. The Discovery of Ezetimibe: A View from Outside the Receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1-9.
- [28] Burgey, C. S.; Robinson, K. A.; Lyle, T. A.; Sanderson, P. E. J.; Lewis, S. D.; Lucas, B. J.; Krueger, J. A.; Singh, R.; Miller-Stein, C.; White, R. B.; Wong, B.; Lyle, E. A.; Williams, P. D.; Coburn, C. A.; Dorsey, B. D.; Barrow, J. C.; Stranieri, M. T.; Holahan, M. A.; Sitko, C. A.; Cook, J. J.; McMasters, D. R.; McDonough, C. M.; Sanders, W. M.; Wallace, A. A.; Clayton, F. C.; Bohn, D.; Leonard, Y. M.; Detwiler, T. J.; Lynch, J. J.; Yan, Y.; Chen, Z.; Kuo, L.; Gardell, S. J.; Shafer, J. A.; Vacca, J. P. Metabolism-Directed Optimization of 3-Aminopyrazinone Acetamide Thrombin Inhibitors. Development of an Orally Bioavailable Series Containing P1 and P3 Pyridines. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 461-473.
- [29] Stryer, L. Biochemia Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, **2000**.
- [30] Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 309-322.
- [31] Renata Mikstacka, Tomasz Stefański, Jakub Rózański. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2013**, 18, 368-397.
- [32] Mitchison, T. and Kirschner, M. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* **1984**, 312, 232-237.
- [33] Downing, K. H.; Nogales, E. Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, 10, 16-22.
- [34] Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. Structure of the $\alpha\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **1998**, 391, 199-203.

- [35] Ravelli, R.B., Gigant, B., Curmi P.A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A. and Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, 428, 198-202.
- [36] Massarotti, A.; Coluccia, A.; Silvestri, R.; Sorba, G.; Brancale, A. The Tubulin Colchicine Domain: a Molecular Modeling Perspective. *ChemMedChem* **2012**, 7, 33–42.
- [37] Skoufias, D. A.; Wilson, L. Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry* **1992**, 31, 738 –746.
- [38] Sackett, D. L. Podophyllotoxin, steganacin and combretastatin: natural products that bind at the colchicine site of tubulin. *Pharmacol. Ther.* **1993**, 59, 163 –228.
- [39] Commun, K.; Mauro, M. C.; Chupeau, Y.; Boulay, M.; Burrus, M.; Jeandet, P. Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, 41, 317–323.
- [40] Harada, J.; Ogawa, K. X-ray Diffraction Analysis of Nonequilibrium States in Crystals: Observation of an Unstable Conformer in Flash-Cooled Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3539-3544.
- [41] Traetteberg, M.; Frantsen, E. B. A gas electron diffraction study of the molecular structure of *trans*-stilbene. *J. Mol. Struct.* **1975**, 26, 57-68.
- [42] Traetteberg, M.; Frantsen, E. B. A gas electron diffraction study of the molecular structure of *cis*-stilbene. *J. Mol. Struct.* **1975**, 26, 69-76.
- [43] Chen, P. C.; Chieh, Y. C. Azobenzene and stilbene: a computational study. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2003**, 624, 191-200.
- [44] Freile, M. L.; Risso, S.; Curaqueo A.; Zamora, M. A.; Enriz, R. D. Ab initio conformational study of vinylogues. 2-Butene, stilbene and their conjugated polyenes. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2005**, 731, 107-114.
- [45] Likhtenshtein, G. I. Stilbenes: Application in chemistry, life sciences and materials science Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2010**.
- [46] Takaoka, M. J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.) *J. Faculty Sci., Hokkaido Imp. Univ.* **3 1940**, 3, 1–16.
- [47] Deak, M.; Falk, H. On the chemistry of resveratrol diastereomers, *Monat. für Chem.* **2003**, 134, 883-888.
- [48] Trela, B. C.; Waterhouse, A. L. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 1253-1257.

- [49] Caruso, F.; Tanski, J.; Villegas-Estrada, A.; Rossi, M. Structural basis for antioxidant activity of *trans*-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 7279-7285.
- [50] Mikulski, D.; Górnjak, R.; Molski, M. A theoretical study of the structure-radical scavenging activity of *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol in gas phase and water environment. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1015-1027.
- [51] Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences* **2000**, *66*, 663-673.
- [52] Nonomura, S.; Kanagawa, H.; Makimoto, A. Chemical constituents of polygonaceous plants: I. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) *Yakugaku Zasshi* **1963**, *83*, 983-988.
- [53] Chung, I. M.; Park, M. R.; Chun, J. C.; Yun, S. J. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants *Plant. Sci* **2003**, *164*, 103-109.
- [54] Decendit, A.; Waffo-Teguo, P.; Richard, T.; Krisa, S.; Vercauteren, J.; Monti, J. P.; Deffieux, G.; Merillon, J. M. Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 795-798.
- [55] Langcake, P.; Cornford, C. A.; Pryce, R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1025-1027.
- [56] Aaviskar, A.; Haga, M.; Kuzina, K.; Puessa, T.; Raal, A.; Tsoupras, G. Hydroxystilbenes in the roots of *Rheum rhaponticum*. *Proc. Estonian Acad. Sci.* **2003**, *52*, 99-107.
- [57] Pinney, K. G.; Pettit, G. R.; Trawick, M. L.; Jelinek, C.; Chaplin, D. J. The discovery and development of the combretastatins. in: Anticancer Agents from Natural Products, (Cragg, G.R., Kingston, D.G.I. and Newman, D.J. Eds.) 2nd edition, *CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL*, **2012**, 27-63.
- [58] Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Herald, D. L.; Schmidt, J. M.; Lobavanijaya, P. Antineoplastic agents. Part 84. Isolation and structure of combretastatin. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1374-1376.
- [59] Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendall, D. Isolation and Structure of the Strong Cell Growth and Tubulin Inhibitor Combretastatin A-4. *Experientia* **1989**, *45*, 209-211.
- [60] Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Schmidt, J. M.; Hogan, F. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5, and A-6, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1666-1672.

- [61] Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Singh, S. B. Antineoplastic agents, 122. Constituents of *Combretum caffrum*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 386-391.
- [62] Xiaotao, G.; Dan, Z.; Zhifang, Y.; Tianzhen, L.; Dachang, L.; Chunbao, L. A protecting group-free synthesis of the antineoplastic agent combretastatin A4. *J. Chem. Res.* **2011**, *35*, 229-230.
- [63] Lara-Ochoa, F.; Espinosa-Pérez, G. A new synthesis of combretastatins A-4 and AVE-8062A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7007-7010
- [64] Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Herald, D. L.; Schmidt, J. M.; Lohavanijaya, P. Isolation and structure of combretastatin. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1374-1376.
- [65] Pettit, G. R.; Singh, S. Antineoplastic agents. Part 130. Isolation, structure and synthesis of combretastatins A-2, A-3, and B-2. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2390-2396.
- [66] Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Niven, M. L.; Hamel, E.; Schmidt, J. M. Antineoplastic agents. Part 123. Isolation, structure, and synthesis of combretastatin A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from *Combretum caffrum*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 119-131.
- [67] Murias, M.; Jäger, W.; Handler, N.; Erker, T.; Horvath, Z.; Szekeres, T.; Nohl, H.; Gille, L. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship *Biochemical Pharmacology* **2005**, *69*, 903-912.
- [68] Mikstacka, R.; Rimando, A. R.; Szalaty, K.; Stasik, K.; Baer-Dubowska, W. Effect of natural analogues of *trans*-resveratrol on cytochromes P4501A2 and 2E1 catalytic activities *Xenobiotica* **2006**, *36*, 269-285.
- [69] Mikstacka, R.; Baer-Dubowska, W.; Wieczorek, M.; Sobiak, S. Thiomethylstilbenes as inhibitors of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 activities. **2008**, *52*, S77-S83.
- [70] Murias, M.; Handler, N.; Erker, T.; Pleban, K.; Ecker, G.; Saiko, P.; Szekeres, T.; Jäger, W. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: synthesis and structure-activity relationship *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5571-5578.
- [71] Gehm, B. D.; McAndrews, J. M.; Chien, P. Y.; Jameson, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14138-14143.

- [72] Sale, S.; Verschoyle, R.D.; Boockock, D.; Jones, D. J. N.; Wilsher, N.; Potter, G. A.; Farmer, P. B.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue *trans*-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *Br. J. Cancer* **2004**, 90 736-744.
- [73] Sale, S.; Tunstall, R. G.; Ruparella, K. C.; Potter, G. A.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog *trans*-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) on adenoma development in the ApcMin+ mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **2005**, 115, 194-201.
- [74] Ma, Z., Molavi, O.; Haddadi, A.; Lai, R.; Gossage, R. A.; Lavasanifar, A. Resveratrol analog *trans* 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) mediates antitumor effects via mechanism different from that of resveratrol. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, 63 27-35.
- [75] Schneider, Y.; Chabert, P.; Stutzmann, J.; Coelho, D.; Fougereuse, A.; Gosse, F.; Launay, J.-F.; Brouillard, R.; Raul, F.; Resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene is a potent anti-mitotic drug inhibiting tubulin polymerization. *Int. J. Cancer* **2003**, 107 189-196.
- [76] Mazué, F.; Colin, D.; Gobbo, J.; Wegner, M.; Rescifina, A.; Spatafora, C.; Fasseur, D.; Delmas, D.; Meunier, P.; Triangli, C.; Latruffe, N. Structural determinants of resveratrol for cell proliferation inhibition potency. Experimental and docking studies of new analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 2972-2980.
- [77] Frémont, L.; Belguendouz L.; Delpal, S. *Life Sciences* **1999**, 64, 2511-2521
- [78] Wiśniewska, A.; Mazerska, Z. Cytochrome P450 isoenzymes in metabolism of endo- and exogenic compounds. *Postępy Biochem.* **2009**, 55, 259-271.
- [79] Liehr, J. G.; Ricci, M. J. 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93, 3294-3296.
- [80] Chang, T. K. H.; Chen, J.; Lee, W. B. K. Differential inhibition and inactivation of human CYP1 enzymes by *trans*-resveratrol: evidence for mechanism-based inactivation of CYP1A2. *JPET* **2001**, 299, 874-882.
- [81] Guengerich, F. P.; Chun, Y.-J.; Kim, D.; Gillam, E. M. J.; Shimada, T. Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies *Mutat. Res.* **2003**, 523-524, 173-182.

- [82] Mikstacka, R.; Przybylska, D.; Rimando, A. M.; Baer-Dubowska, W. Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by *trans*-resveratrol methyl ethers. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, 51, 517.
- [83] Ndiaye, M.; Kumar, R.; Ahmad, N. Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, 1215, 144-149.
- [84] Goswami, S. K.; Das, D. K. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett.* **2009**, 284, 1-6.
- [85] Juan, M. E.; Alfaras, I.; Planas, J. M. Colorectal cancer chemoprevention by *trans*-resveratrol. *Pharmacol. Res.* **2012**, 65, 584-591.
- [86] Smoliga, J. M.; Baur, J. A.; Hausenblas, H. A. Resveratrol and health-a comprehensive review of human clinical trials. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, 55, 1129-1141.
- [87] Ragione, F. D., Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V. D., Racioppi, L., Soldati, G., Manna, C., Galletti, P., Zappia, V. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 250, 53-58.
- [88] Fontecave, M. Ribonucleotide reductases and radical reactions. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 684-695.
- [89] Li, H.; Wu, W. K. K.; Zheng, A.; Che, C. T.; Yu, L.; Li, Z. J.; Wu, Y. C.; Cheng, K.-W.; Yu, J.; Cho, C. H.; Wang, M. 2,3',4,4',5'-Pentamethoxy-*trans*-stilbene, a resveratrol derivative, is a potent inducer of apoptosis in colon cancer cells via targeting microtubules. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, 78, 1224-1232.
- [90] Tron, C.G.; Pirali, T.; Sorba, G.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 11, 3033-3044.
- [91] Chaudhary, A.; Pandeya, S. N.; Kumar, P.; Sharma, P.; Gupta, S.; Soni, N.; Verma, K. K.; Bhardwaj, G. Combretastatin A-4 Analogs as Anticancer Agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 1186-1205.
- [92] Xia, Y.; Yang, A.-Y.; Xia, P.; Bastow, K.F.; Tachibana, Y.; Kuo, S.-C.; Hamel, E.; Hacki, T.; Lee, K.-H. J. Antitumor agents. 181. Synthesis and biological evaluation of 6,7,2',3',4'-substituted-1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-4-quinolones as a new class of antimitotic antitumor agents. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1155-1162.
- [93] Wu, M.; Sun, Q.; Yang, C.; Chen, D.; Ding, J.; Chen, Y.; Lin, L.; Xie, Y. Synthesis and activity of combretastatin A-4 analogues: 1,2,3-thiadiazoles as potent antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 869-873.

- [94] Hall, J. J.; Sriram, M.; Strecker, T. E.; Tidmore, J. K.; Jelinek, C. J.; Kumar, G. D. K.; Hadimani, M. B.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J.; Trawick, M. L.; Pinney, K. G. Design, synthesis, biochemical, and biological evaluation of nitrogen containing trifluoro structural modifications of combretastatin A-4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5146-5149.
- [95] Wang, L.; Woods, K. W.; Li, Q.; Barr, K. J.; McCroskey, R. W.; Hannick, S. M.; Gherke, L.; Credo, R. B.; Hui, Y. H.; Marsh, K.; Warner, R.; Lee, J. Y.; Zielinski-Mozng, N.; Frost, D.; Rosenberg, S. H.; Sham, H. L. Potent, orally active heterocycle-based combretastatin A-4 analogues: synthesis, structure-activity relationship, pharmacokinetics, and *in vivo* antitumor activity evaluation. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1697-1711.
- [96] Schobert, R.; Biersack, B.; Dietrich, A.; Effenberger-Neidnicht, K.; Knauer, S.; Mueller, T. 4-(3-Halo/amino-4,5-dimethoxyphenyl)-5-aryloxazoles and N-methylimidazoles that are cytotoxic against combretastatin A resistant tumor cells and vascular disrupting in a cisplatin resistant germ cell tumor model. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 6595-6602.
- [97] Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Salvador, M. K.; Camacho, M. E.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Bassetto, M.; Brancale, A.; Hamel, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Synthesis and biological evaluation of 2-substituted-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-5-aryl thiazoles as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 7083-7094.
- [98] Thorpe, P. E. Vascular Targeting Agents as Cancer Therapeutics. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 415-427.
- [99] Silverman, R. B. *Chemia organiczna w projektowaniu leków*. WNT, Warszawa **2004**,
- [100] Yang, H.; Baur, J. A.; Chen, A.; Miller, C.; Sinclair, D. Design and synthesis of compounds that extend yeast replicative lifespan. *Aging Cell* **2007**, 6, 35-43.
- [101] Medina de, P.; Casper, R.; Savouret, J-F.; Poirot, M. Synthesis and Biological Properties of New Stilbene Derivatives of Resveratrol as New Selective Aryl Hydrocarbon Modulators. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 287-291.
- [102] Dzierzbicka, K.; Kubacka, P.; Renuz, S.; Kołodziejczyk, M.; Kombretastatyna A4 (CA-4) i jej analogi. Synteza i aktywność biologiczna.; *Wiadomości chemiczne*, **2008**, 62, 11-12.

- [103] Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; Nolan, S.; McGown, A. T. Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3033-3037.
- [104] Maya, A. B.; Perez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernandez, J. L.; et al. Further naphthylcombretastatins. An investigation on the role of the naphthalene moiety. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 556-568.
- [105] Pettit, G. R.; Minardi, M. D.; Rosenberg, H. J.; Hamel, E.; Bibby, M. C.; et al. Antineoplastic agents. 509: synthesis of fluorcombstatin phosphate and related 3-halostilbenes(1). *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1450-1458.
- [106] Tron, C.G.; Pirali, T.; Sorba, G.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 11, 3033-3044.
- [107] Pettit, G. R.; Minardi, M. D.; Rosenberg, H. J.; Hamel, E.; Bibby, M. C.; Martin, S. W.; Jung, M. K.; Pettit, R. K.; Cuthberston, T. J.; Chapuis, J. C. Antineoplastic agents. 509: synthesis of fluorcombstatin phosphate and related 3-halostilbenes(1). *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1450-1458.
- [108] Hall, J. J.; Sriram, M.; Strecker, T. E.; Tidmore, J. K.; Jelinek, C. J.; Kumar, G. D. K.; Hadimani, M. B.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J.; Trawick, M. L.; Pinney, K. G. Design, synthesis, biochemical, and biological evaluation of nitrogen containing trifluoro structural modifications of combretastatin A-4. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5146-5149.
- [109] Maya, A. B.; del Ray B., Lamamie de Clairac, R. P.; Caballero, E.; Barasoain, I.; Andreu, J. M.; Medarde, M. Design, synthesis and cytotoxic activities of naphthyl analogues of CA4; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 2549-2551.
- [110] Lawrence, N. J.; Hepworth, L. A.; Rennison, D.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A. Synthesis and anticancer activity of fluorinated analogues of combretastatin A-4. *J. Fluorine Chem.* **2003**, 123, 101-108.
- [111] Pettit, G. R.; Rhodes, M. R.; Herald, D. L.; Hamel, E.; Schmidt, J. M.; et al. Antineoplastic agents. 445. Synthesis and evaluation of structural modifications of (Z)- and (E)-combretastatin A-4. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4087-4099.
- [112] Cushman, M., Nagarathnam, D., Gopal, D., Chakraborti, A.K., Lin, C. M.; Hamel, E. Synthesis and evaluation of analogues of (Z)-1-(4-methoxyphenyl)-2-(3,4,5 trimethoxyphenyl)ethene as potential cytotoxic and anti-mitotic agents. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2293-2360.

- [113] Pinney, K. G.; Meija, M. P.; Villalobos, V. M.; Rosenquist, B. E.; Pettit, G. R.; Verdier Pinard, P.; Hamel, E. Synthesis and biological evaluation of aryl azide derivatives of combretastatin A-4 as molecular probes for tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 2417-2425.
- [114] Monk, K. A.; Siles, R.; Hadimani, M. B.; Mugabe, B. E.; Ackley, J. F.; Studerus, S. W.; Edvardsen, K.; Trawick, M. L.; Garner, C. M.; Rhodes, M. R.; Pettit, G. R.; Pinney, K. G. Design, synthesis, and biological evaluation of combretastatin nitrogen-containing derivatives as inhibitors of tubulin assembly and vascular disrupting agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3231-3244.
- [115] Metzler M., Neumann H.G.; Epoxidation of the stilbene double bond a major pathway in aminostilbene metabolism; *Xenobiotica* **1977**, 7, 117-132.
- [116] Haar, E.; Rosenkranz, H. S.; Hamel, E.; Day, W. Computational and molecular modeling evaluation of the structural basis for tubulin polymerization inhibition by colchicine site agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 4, 1659-1671.
- [117] Bonezzi, K.; Taraboletti, G.; Borsotti, P.; Bellina, F.; Rossi, R.; Giavazzi, R. Vascular disrupting activity of tubulin-binding 1,5-diaryl-1H-imidazoles. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7906-7910.
- [118] Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Fujita, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Nihei, Y.; Suga, Y.; Morinaga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T. Synthesis and antitumor activity of *cis*-restricted combretastatins: 5-membered heterocyclic analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3153-3158.
- [119] Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Brancale, A.; Ricci, A.; Hamel, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Convergent synthesis and biological evaluation of 2-amino-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-5-aryl thiazoles as microtubule targeting agents. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5144-5153.
- [120] Tron, G. C.; Pagliai, F.; Sel Grosso, E.; Genazzani, A. A.; Sorba, G.; Synthesis and cytotoxic evaluation of combretafurazans. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3260-3258.
- [121] Pirali, T.; Busacca, S.; Beltrami, L.; Imovilli, D.; Pagliai, F.; Miglio, G.; Massarotti, A.; Verotta, L.; Tron, G. C.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Synthesis and cytotoxic evaluation of combretafurans, potential scaffolds for dual action of antitumoral agents. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5372-5376.
- [122] Theeramunkong, S.; Caldarelli, A.; Massarotti, A.; Aprile, S.; Caprioglio, S.; Zaninetti, R.; Teruggi, A.; Pirali, T.; Grosa, G.; Tron, G. C. Regioselective

- Suzuki coupling of dihaloheteroaromatic compounds as a rapid strategy to synthesize potent rigid combretastatin analogues. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 4977-4986.
- [123] Zhang, W.; Yang, Q.; Wu, Y.; Wu, L.; Li, W.; Qiao, F.; Bao, K.; Zhang, L. Preparation of 2,3-diarylthiophene derivatives as antitumor agents. CN patent 101429189, **2009**.
- [124] Qiao, F.; Zuo, D.; Shen, X.; Qi, H.; Wang, H.; Zhang, W.; Wu, Y. DAT-230, a novel microtubule inhibitor, exhibits potent anti-tumor activity by inducing G2/M phase arrest, apoptosis *in vitro* and perfusion decrease *in vivo* to HT-1080. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, 70, 259-270.
- [125] Liu, T.; Dong, X.; Xue, N.; Wu, R.; He, Q.; Yang, B.; Hu, Y. Synthesis and biological evaluation of 3,4-biaryl-5-aminoisoxazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 6279-6285.
- [126] Sun, C.-N.; Lin, L.-G.; Yu, H.-J.; Cheng, C.-Y.; Tsai, Y.-C. Synthesis and cytotoxic activities of 4,5-diarylisoxazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1078-1081.
- [127] Schobert, R.; Effenberger-Neidnicht, K.; Biersack, B. Stable combretastatin A-4 analogues with sub-nanomolar efficacy against chemoresistant HT-29 cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, 49, 71-72.
- [128] Biersack, B.; Effenberger, K.; Schobert, R.; Ocker, M. Oxazole-bridged combretastatin A analogues with improved anticancer properties. *ChemMedChem.* **2010**, 3, 420-427.
- [129] Xia, Y.; Yang, A.-Y.; Xia, P.; Bastow, K.F.; Tachibana, Y.; Kuo, S.-C.; Hamel, E.; Hacki, T.; Lee, K.-H. J. Antitumor agents. 181. Synthesis and biological evaluation of 6,7,2',3',4'-substituted-1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-4-quinolones as a new class of antimitotic antitumor agents. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1155-1162.
- [130] Akselsen, O. W.; Odlo, K.; Cheng, J.-J.; Maccari, G.; Botta, M.; Hansen, T. V. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of 1,2,3-triazole analogs of combretastatin A-1. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 234-242.
- [131] Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Cruz-Lopez, O.; Lopez-Cara, C.; Carrion, M. D.; Brancale, A.; Hamel, E.; Chen, L.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Synthesis and antitumor activity of 1,5-disubstituted 1,2,4-triazoles as *cis*-restricted combretastatin analogs. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4248-4258.

- [132] Odlo, K.; Hentzen, J.; dit Chabert, J. F.; Ducki, S.; Gani, O. A.; Sylte, I.; Skrede, M.; Flørenes, V. A.; Hansen, T. V. 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles as *cis*-restricted analogues of combretastatin A-4: synthesis, molecular modeling and evaluation as cytotoxic agents and inhibitors of tubulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4829-4838.
- [133] Odlo, K.; dit Chabert, J. F.; Ducki, S.; Gani, O. A.; Sylte, I.; Hansen, T. V. 1,2,3-Triazole analogs of combretastatin A-4 as potential microtubule-binding agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6874-6885.
- [134] Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Salvador, M. K.; Preti, D.; Tabrizi, M. D.; Brancale, A.; Fu, X. H.; Li, J.; Zhang, S. Z.; Hamel, E.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Synthesis and evaluation of 1,5-disubstituted tetrazoles as rigid analogues of combretastatin A-4 with potent antiproliferative and antitumor activity. *J. Med. Chem.* **2012**, 54, 475-488.
- [135] Shirai, R.; Takayama, H.; Nishikawa, A.; Koiso, Y.; Hashimoto, Y. Asymmetric synthesis of antimitotic combretadioxolane with potent antitumor activity against multi-drug resistant cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1997-2000.
- [136] Späth, E.; Liebherr, F. Über natürliche Stilbene, IV. Mitteil.: Die Synthese des Pinosylvins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1941**, 74, 869.
- [137] Wood, C. S.; Mallory, F. B. Photochemistry of Stilbenes. IV. The Preparation of Substituted Phenanthrenes^{1a-c} *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 3373-3377.
- [138] Gaukroger, K.; Hadfield, J. A.; Hepworth, L.; Lawrence, N. J.; McGown, A. T. Novel Syntheses of *Cis* and *Trans* Isomers of Combretastatin A-4. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8135-8138.
- [139] Jiann-Jyh, H.; Ruey-Lih, L.; Ruey-Lone, S.; Jing-Jer, J. Study of the Wittig reaction of benzyltriphenylphosphonium salt and benzaldehyde via ylide-mediated phase-transfer catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **1999**, 142, 125-139.
- [140] Bellucci, G.; Chiappe, C.; Lo Moro G. Crown Ether Catalyzed Stereospecific Synthesis of *Z*- and *E*-Stilbenes by Wittig Reaction in a Solid-Liquid Two-Phases System. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 4225 – 4228.
- [141] Li, H.; Wang, L.; Jing, X.; Wang, F. A modified Wittig polycondensation—to high-*trans*- and high-molecular weight PPVs. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3823 – 3826.
- [142] Moreno-Mañas, M.; Pleixats, R. *An. Quim. Ser. C 81* **1985**, 157.

- [143] Ali, M. A.; Kondo, K.; Tsuda, Y. Synthesis and Nematocidal Activity of Hydroxystilbenes. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 1130.
- [144] Belluci, G.; Chiappe, C.; Lo Morro, G. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 4225-4228.
- [145] Jiann-Jyh, H.; Ruey-Lih, L.; Ruey-Lone, S.; Jing-Jer, J. Study of the Wittig reaction of benzyltriphenylphosphonium salt and benzaldehyde via ylide-mediated phase-transfer catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **1999**, 142, 125-139.
- [146] Skarżewski J. Wprowadzenie Do Syntezy Organicznej; wyd. I **1999**.
- [147] Thakkar, K.; Geahlen, R.; Cushman, M. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of polyhydroxylated stilbene analogs of piceatannol. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2950 – 2955.
- [148] Ferré-Filmon, K.; Delaude, L.; Demonceau, A.; Noels, A. L. Catalytic methods for the synthesis of stilbenes with an emphasis on their phytoalexins. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, 248, 2323-2336.
- [149] <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/heck-reaction.shtm>.
- [150] Taylor P. G.; Mechanisms and Synthesis by Royal Society of Chemistry; Paperback, **2002**.
- [151] Dunne, A. M.; Mix, S.; Blechert, S. A highly efficient olefin metathesis initiator: improved synthesis and reactivity studies. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2733-2736.
- [152] <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/olefin-metathesis.shtm>.
- [153] Fox, H.H.; Schrock, R.R.; O'Dell, R. Coupling of Terminal Olefins by Molybdenum(VI) Imido Alkylidene Complexes. *Organometallics* **1994**, 13, 635 – 639.
- [154] Chang, S.; Na, Y.; Shin, H. J.; Choi, E.; Leong, L. S. *Tetrahedron Lett.* A short and efficient synthetic approach to hydroxy (E)-stilbenoids via solid-phase cross metathesis. **2002**, 43, 7445-7448.
- [155] ChemAxon Instant JChem, version 6.2.1., <http://www.chemaxon.com>, 2014.
- [156] Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.5, San Diego: Accelrys Software Inc., 2012.
- [157] Glide, v. 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
- [158] <http://www.mayachemtools.org>.
- [159] JChem, version 5.4.1; ChemAxon.
- [160] PyMOL, Version 0.99, Schrödinger Inc.

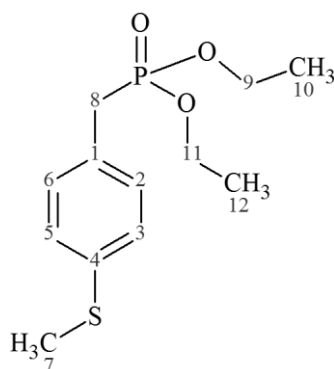
- [161] Ranatunge, R. R.; Garvey, D. S.; Janero, D. R. Letts, L. G.; Martino, A .M.; Murty, M. G.; Richardson, S. K.; Young, D. V.; Zemetseva, I. S. Synthesis and selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitory activity of a series of novel bicyclic pyrazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1357-1366.
- [162] Ulman, A.; Willand, C. S.; Kohler, W.; Robello, D. R.; Williams, D. J.; Handley, L. New sulfonyl-containing materials for nonlinear optics: semiempirical calculations, synthesis, and properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7083-7090.
- [163] Manchand, P. S.; Belica, P. S.; Wong, H. S. Synthesis of 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde. *Synth. Commun.* 20, **1990**, 2659-2666.
- [164] Fürstner, A.; Stelzer, F.; Rumbo, A.; Krause, H. Total Synthesis of the Turrianes and Evaluation of Their DNA-Cleaving Properties. *Chem. Eur. J.* 2002, 8, 1856-1871.
- [165] Zhang, F.; Zhao, Y.; Sun, L.; Ding, L.; Yucheng, G.; Gomg, P. Synthesis and anti-tumor activity of 2-amino-3-cyano-6-(1H-indol-3-yl)-4-phenylpyridine derivatives in vitro. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3149-3157.
- [166] Rahman, L. K. A.; Scrowston, R. M. 7-Substituted Benzo[b]thiophenes and 1,2-Benzisothiazoles. Part I. Hydroxy- or Methoxy-derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 01, 2973-2977.
- [167] Wong, S.-H.; Sasso, S.; Jones, H.; Kaminski, J. Stereochemical Considerations and the Antiinflammatory Activity of 6-Amino-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ols and Related Derivatives. *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 20-27.
- [168] Hoffman-La Roche&Co AG Sulfur-containing substituted aldehydes GB patent 2087378A, 1979.
- [169] Bevan, F. M.; Euerby, M. R.; Qureshi, S. J. The regioselectivity of lithiations in the synthesis of methoxymethylthiobenzaldehydes. *J. Chem Res. Miniprint* **1989**, 5, 901-920.
- [170] Biersack, B.; Effenberger, K.; Knauer, S.; Ocker, M.; Schobert, R. Ru(η^6 -arene) complexes of combretastatin-analogous oxazoles with enhanced anti-tumoral impact. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 4890-4896.
- [171] CytoDYNAMIX Screen 01™ (Cat. # BK004P) firmy Cytoskeleton, Inc.
- [172] Shelanski, M. L.; Gaskin, F.; Cantor, C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1973**, 70, 765-768.
- [173] Lee, J., C.; Timasheff, S., N. *In vitro* reconstitution of calf brain microtubules: effects of solution variable. *Biochemistry* **1977**, 16, 1754-1762.

- [174] GraphPad Software, Inc, Version 6.01.
- [175] CombiGlide, Version 2.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
- [176] Chiang, Y.K., Kuo, C.C., Wu, Y.S., Chen, C.T., Coumar, M.S., Wu, J.S., Hsieh, H.P., Chang, C.Y., Jseng, H.Y., Wu, M.H., Leou, J.S., Song, J.S., Chang, J.Y., Lyu, P.C., Chao, Y.S. and Wu, S.Y. Generation of ligand based pharmacophore model and virtual screening for identification of tubulin inhibitors with potent anticancer activity. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 4221-4233.
- [177] Chenxiao, D.; Susan, L.; Mooberry, J. T.; Gupton, E. K.; Glen, E. K. How to Deal with Low-Resolution Target Structures: Using SAR, Ensemble Docking, Hydrophobic Analysis, and 3D-QSAR to Definitively Map the $\alpha\beta$ -Tubulin Colchicine Site. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 7382-7395.
- [178] Haas, A.; Lieb, M.; Zhang, Y. Electrophilic reactions of trihalogenomethanesulfonyl acetates and trifluoroacetates. *J. Fluorine Chem.* **1985**, 29, 297-310.
- [179] Bates, C. G.; Gujadhur, R. K.; Ventakaraman, D. A General Method for the Formation of Aryl-Sulfur Bonds Using Copper (I) Catalysts. *Organic Letters* **2002**, 4, 2803-2806
- [180] Ko, J.; Ham, J.; Yang, I.; Chin, J.; Nam S. J.; Kang, H. A simple one-pot synthesis of hydroxylated and carboxylated aryl alkyl sulfides from various bromobenzenes. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7101-7106.
- [181] Guy Lloyd-Jones, G. C.; Moseley, J. D.; Renny, J. S. Mechanism and Application of the Newman-Kwart O→S Rearrangement of *O*-Aryl Thiocarbamates. *Synthesis* **2008**, 5, 661-689.
- [182] Relles, H. M.; Pizzolato, G. Steric Rate Enhancement in the Newman-Kwart Rearrangement. A Comparison with the Chapman Rearrangement. *J. Org. Chem.* **1968**, 33, 2249-2253.

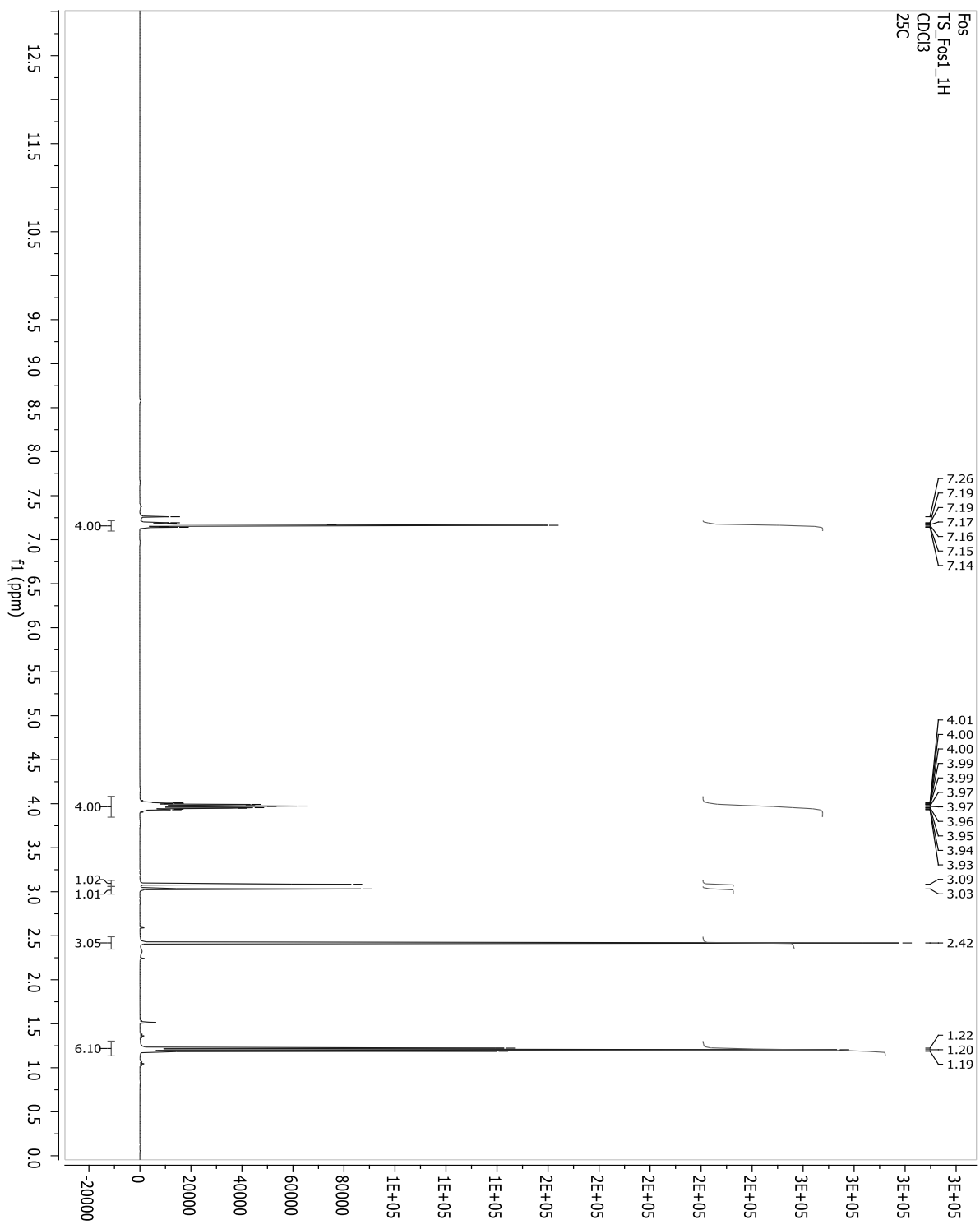
10. SUPPLEMENT

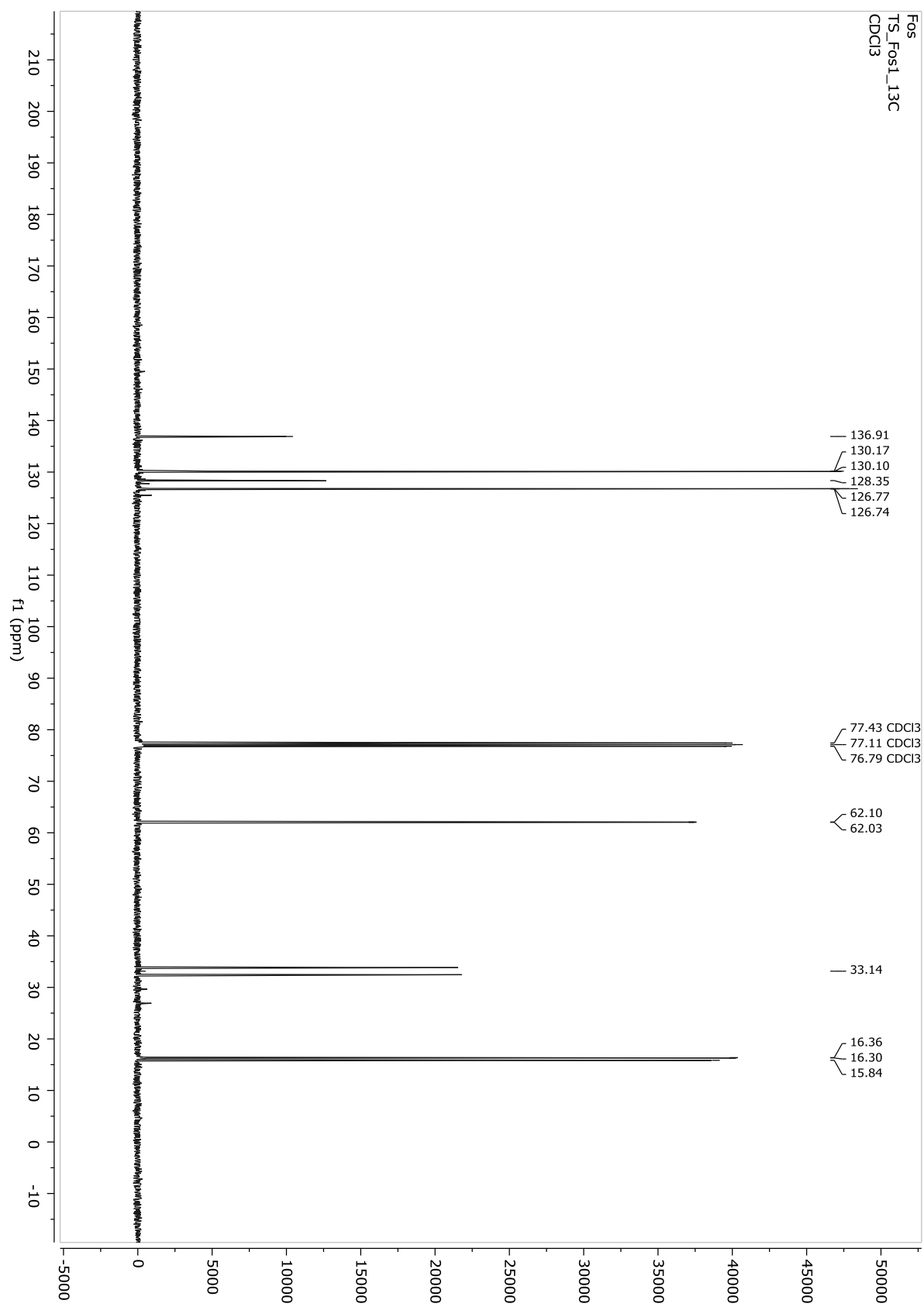
A. ^1H , ^{13}C , 1D NMR

Fosfonian (Fos)

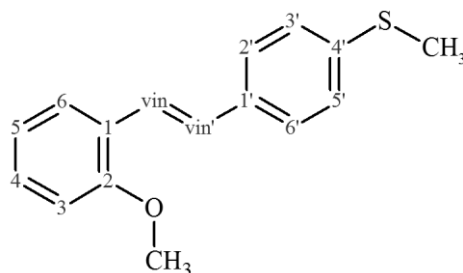
4-metylotiobenzylfosfonian dietylu (Fos1)

H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	128,35
H-2,3,5,6	7,23 – 7,06 (m)	C-2	130,17
		C-3	126,77
		C-4	136,91
		C-5	126,74
		C-6	130,10
3H	2,42 (s)	C-7	15,84
2H	3,09 (s), 3,03 (s)	C-8	33,14
2H	4,15 – 3,75 (m)	C-9	62,10
3H	1,2 (t, 7,1)	C-10	16,36
2H	4,15 – 3,75 (m)	C-11	62,03
3H	1,2 (t, 7,1)	C-12	16,30

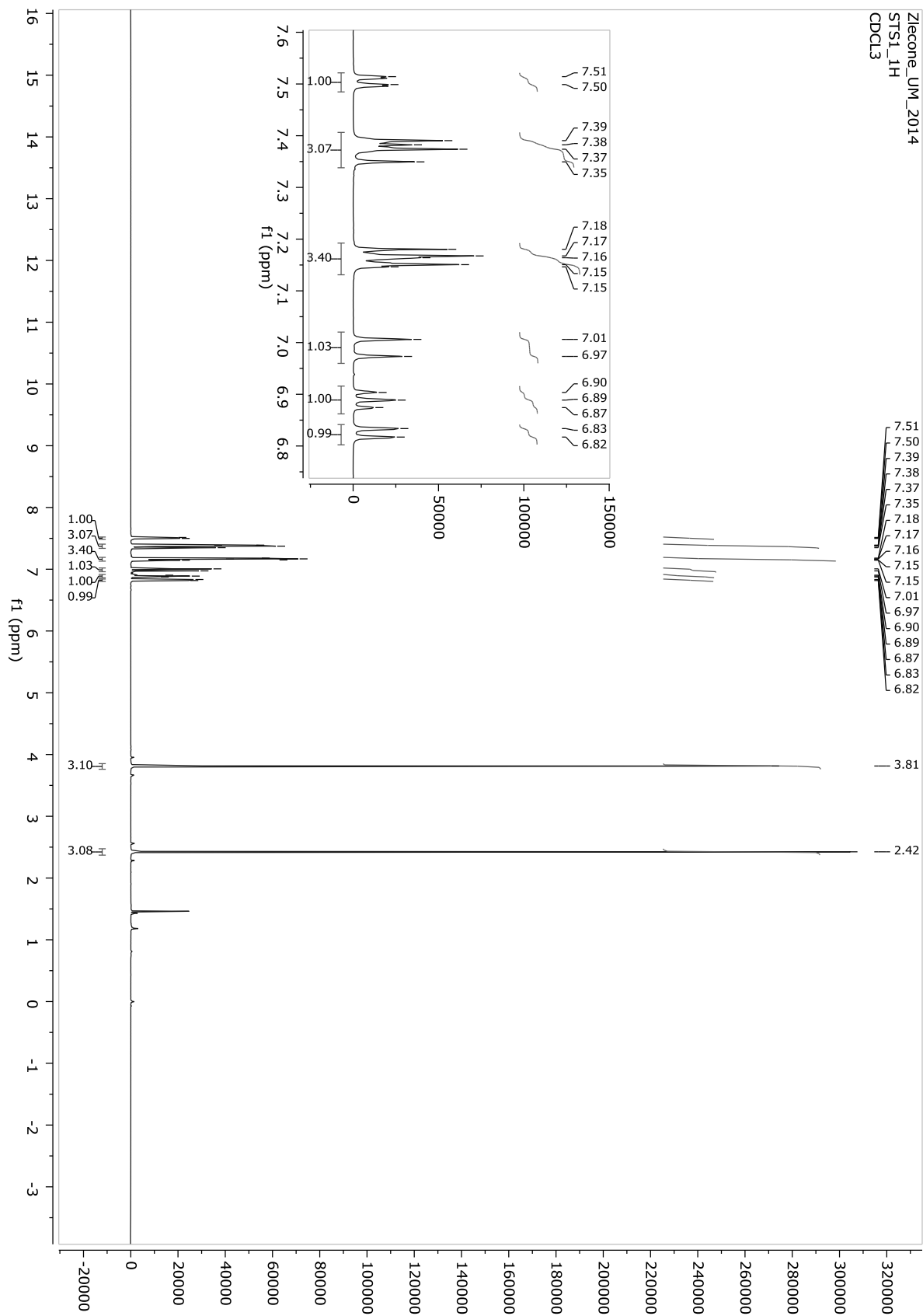


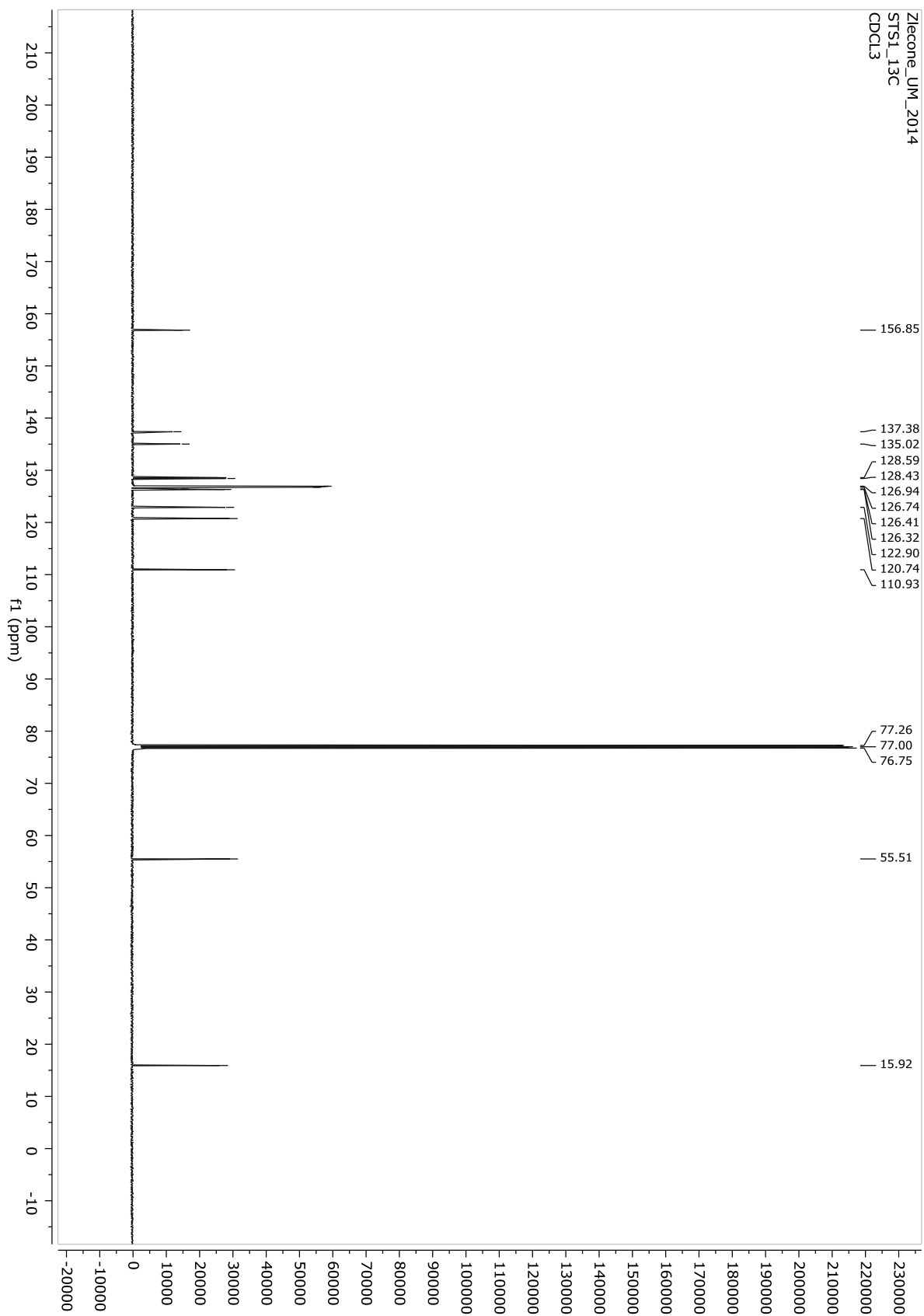


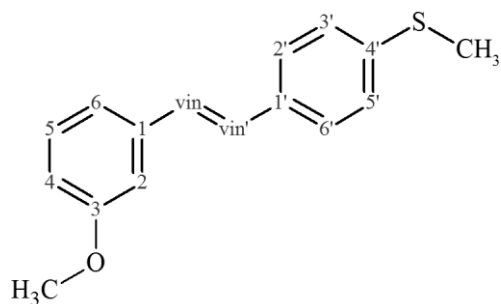
Tiopochodne RSV

(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2-metoksyfenylo)eten (S1)*(E)*-2-metoksy-4'-metylotiostilben

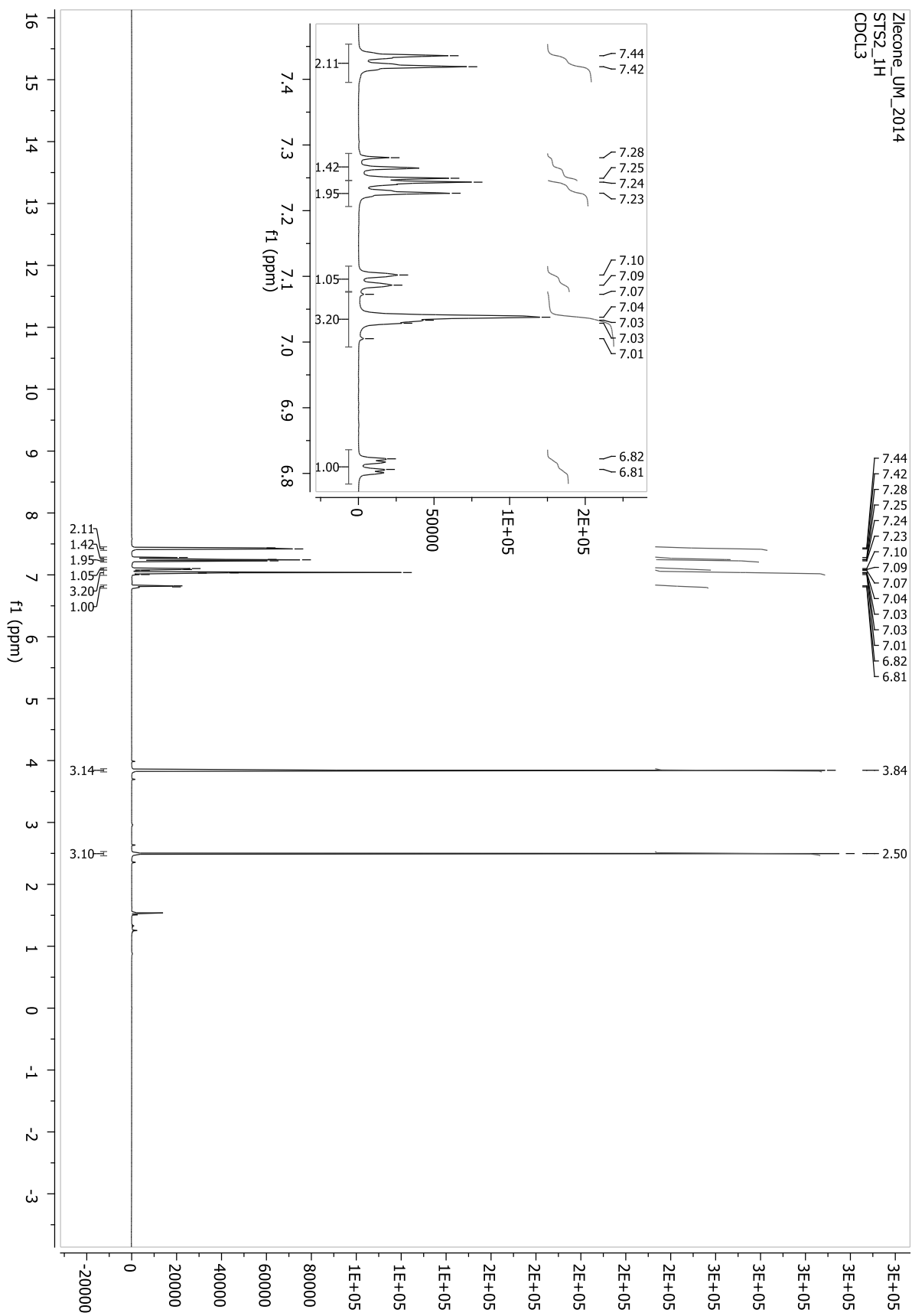
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	126.32
		C-2	156.85
OCH ₃	3.81 (s)	C-2-OCH ₃	55.51
H-3	6.83 (d, 8.2)	C-3	110.93
H-4	7.16 (t, 7.8)	C-4	128.59
H-5	6.89 (t, 7.3)	C-5	120.74
H-6	7.51 (d, 7.7)	C-6	122.90
H-vin	7.37 (d, 16.50)	C-vin	128.43
H-vin'	6.99 (d, 16.50)	C-vin'	126.41
		C-1'	135.02
H-2', 6'	7.47 (d, 8.3)	C-2', 6'	126.94
H-3', 5'	7.16 (d, 8.4)	C-3', 5'	126.74
		C-4'	137.38
SCH ₃	2.42 (s)	C-4'-SCH ₃	15.92

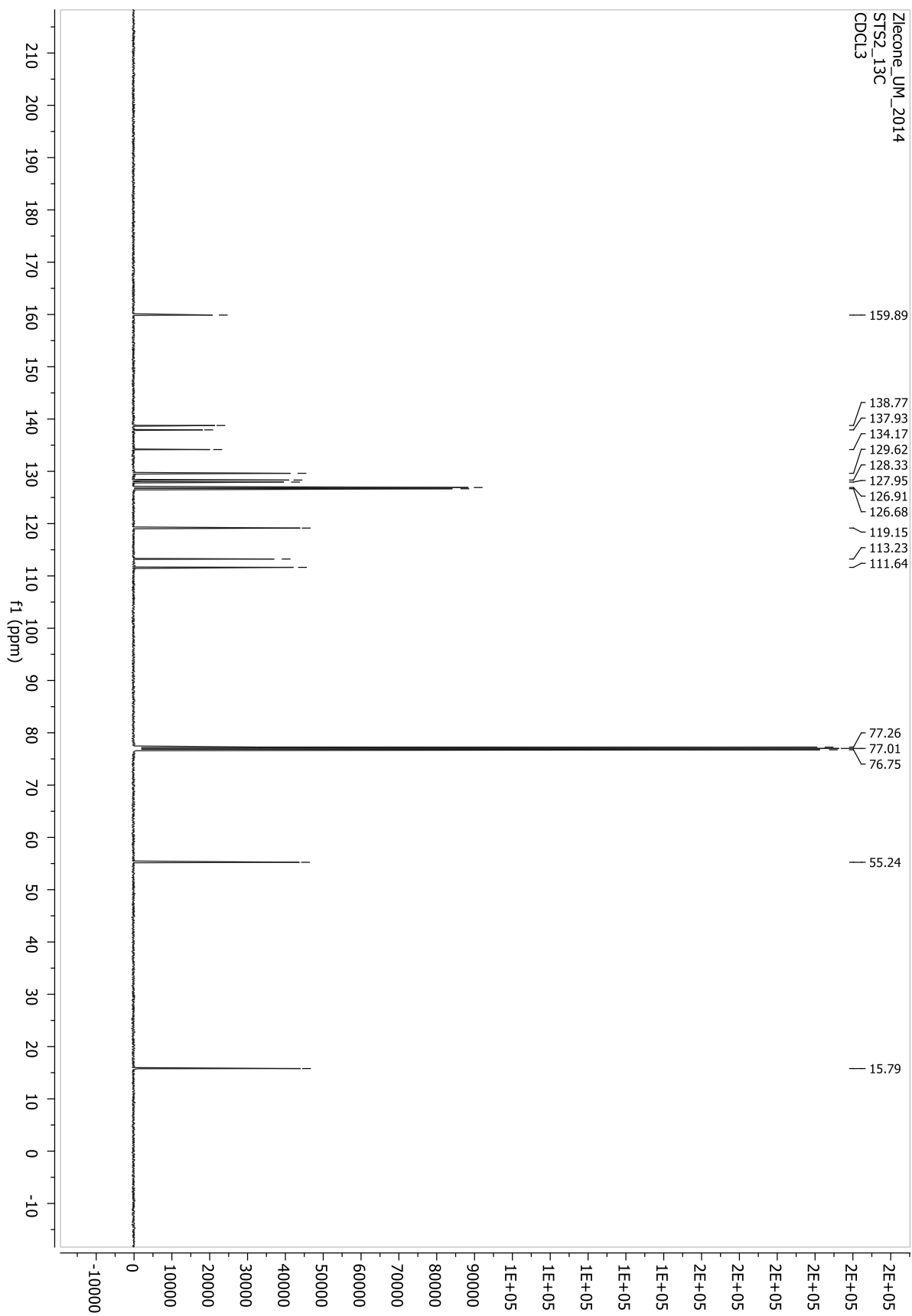


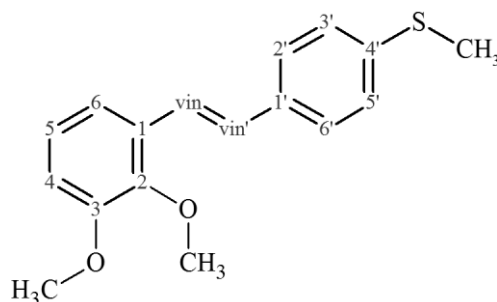


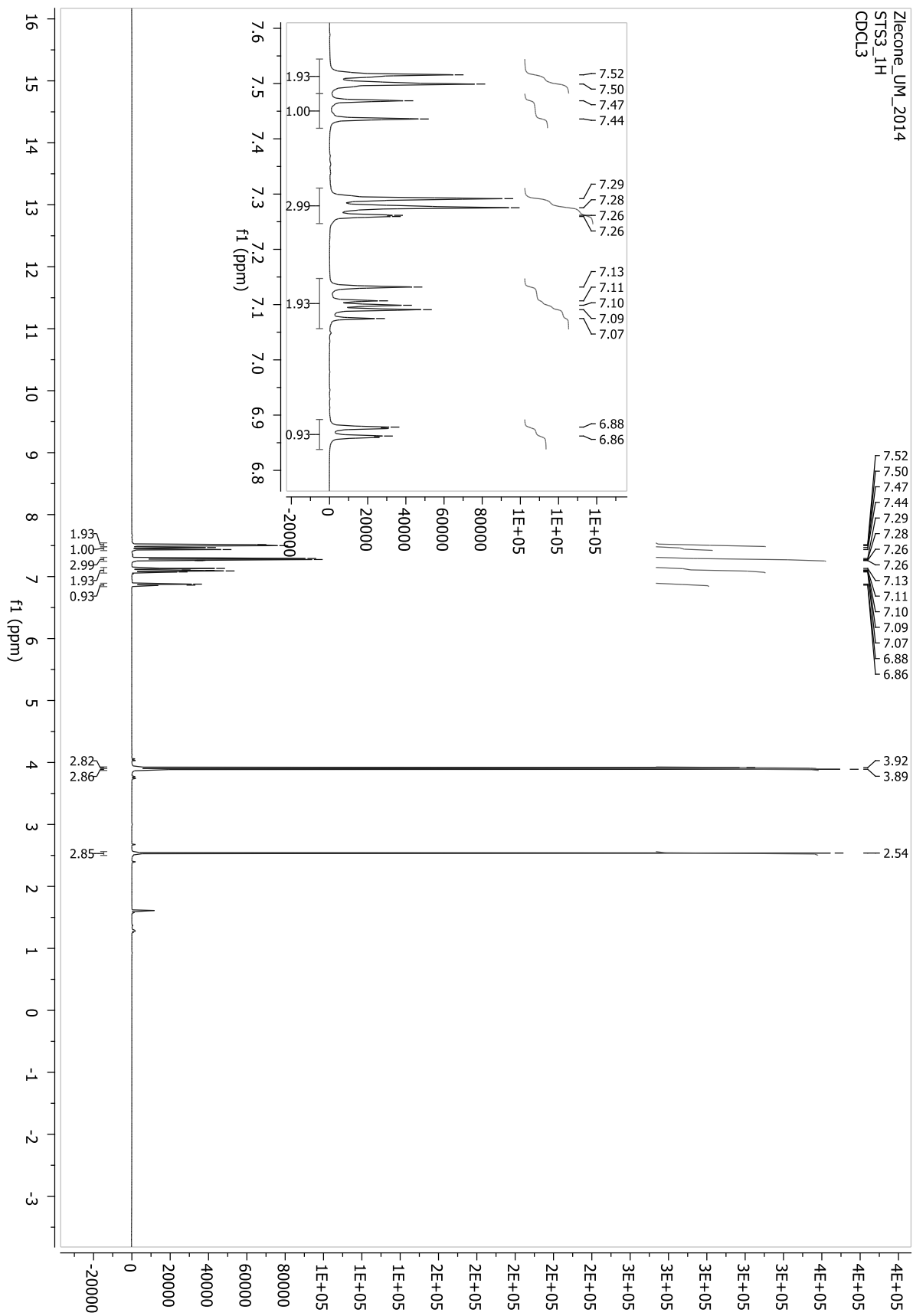
(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3-metoksyfenylo)eten (S2)*(E)*-3-metoksy-4'-metylotiostilben

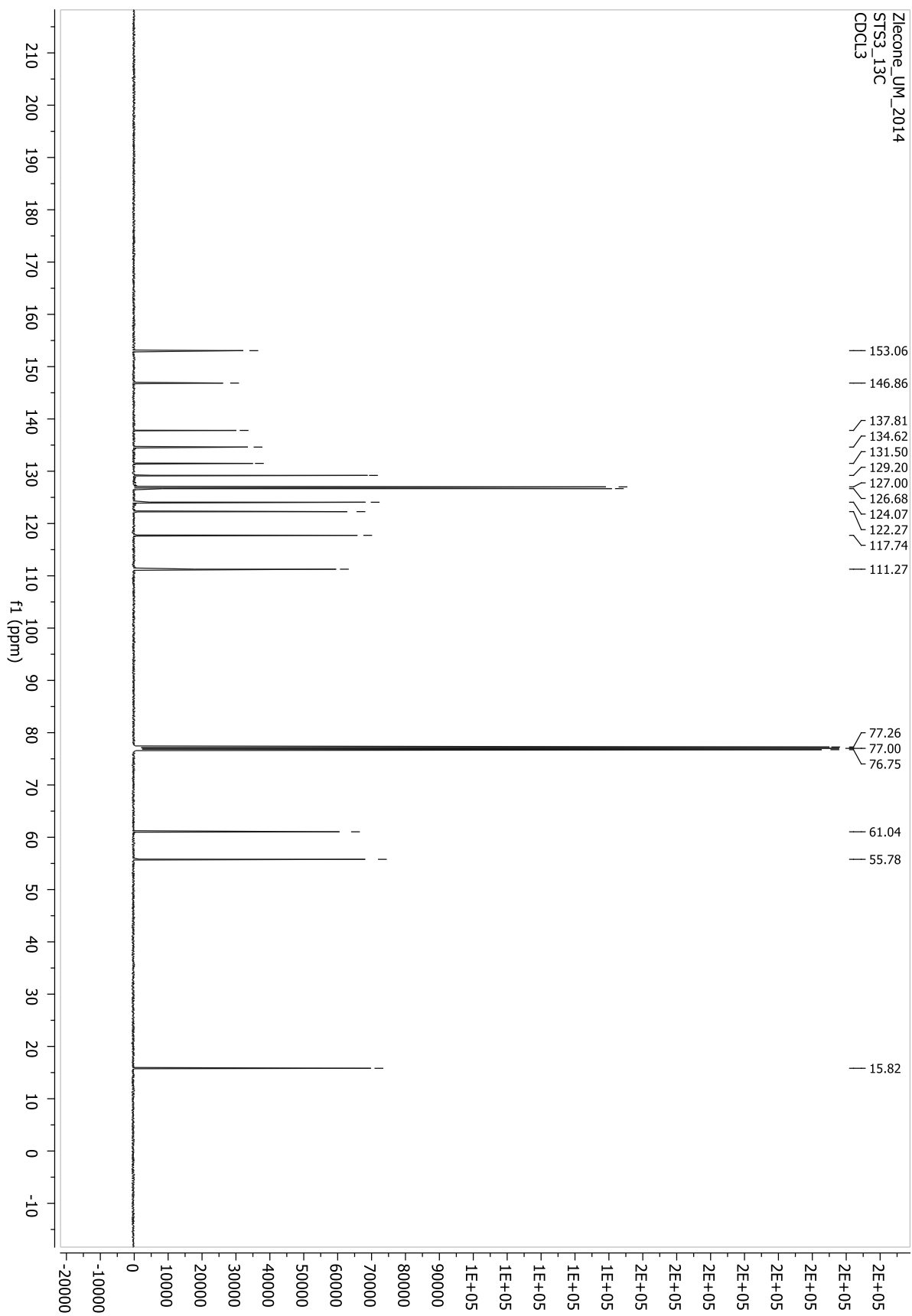
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	137.93
H-2	7.08-6.99 (m)	C-2	113.23
		C-3	159.89
OCH ₃	3.84 (s)	C-3-OCH ₃	55.24
H-4	6.81 (d, 8.1)	C-4	111.64
H-5	7.08-6.99 (m)	C-5	129.62
H-6	7.09 (d, 7.7)	C-6	119.15
H-vin	7.08-6.99 (m)	C-vin	128.33
H-vin'	7.26 (d, 15.60)	C-vin'	127.95
		C-1'	134.17
H-2', 6'	7.43 (d, 8.4)	C-2', 6'	126.91
H-3', 5'	7.23 (d, 8.4)	C-3', 5'	126.68
		C-4'	138.77
SCH ₃	2.50 (s)	C-4'-SCH ₃	15.79

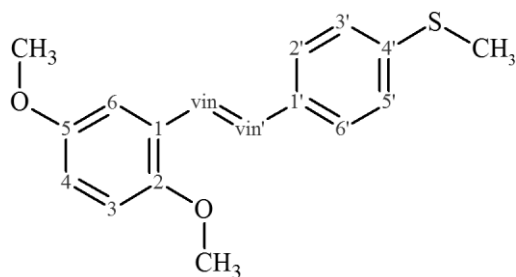




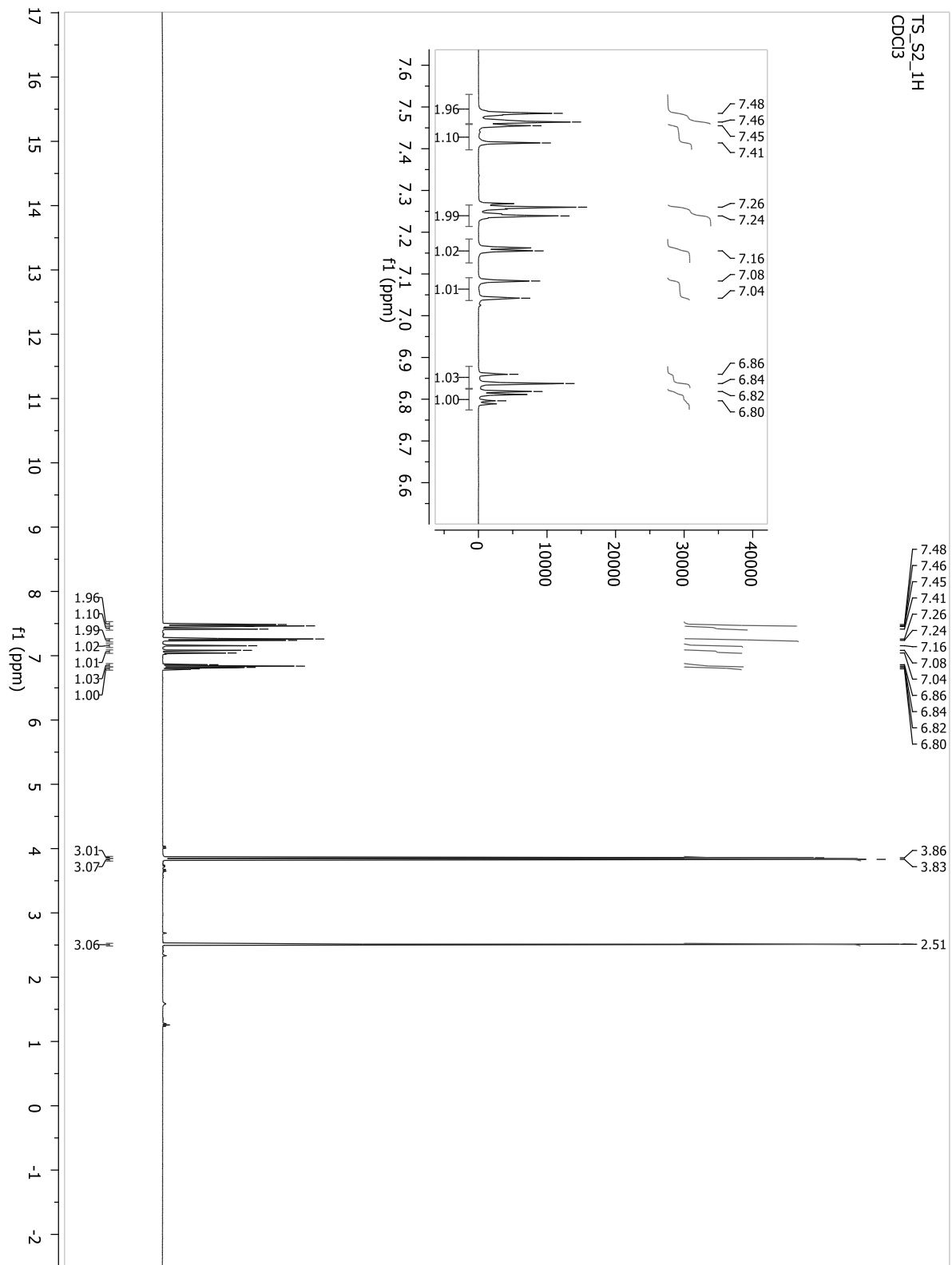
(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,3-dimetoksyfenylo)eten (S3)*(E)*-2,3-dimetoksy-4'-metylotiosilben

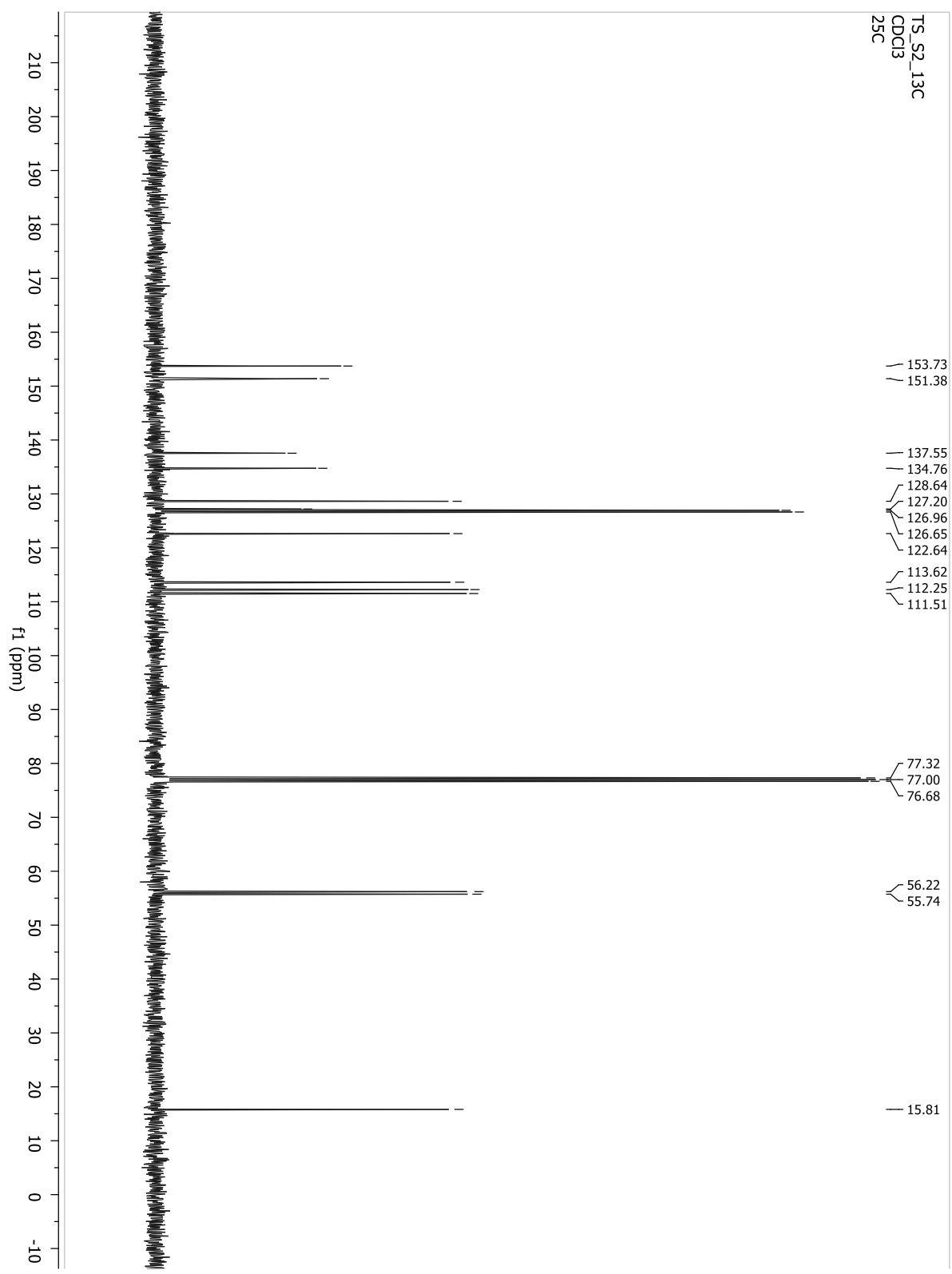


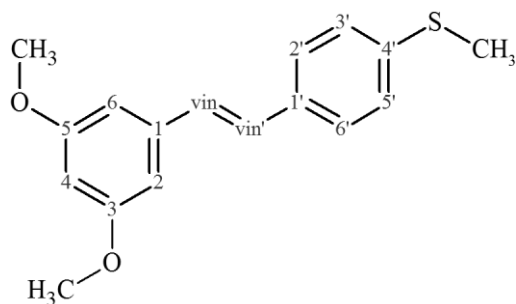


(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,5-dimetoksyfenylo)eten (S4)*(E)*-2,5-dimetoksy-4'-metylotiosilben

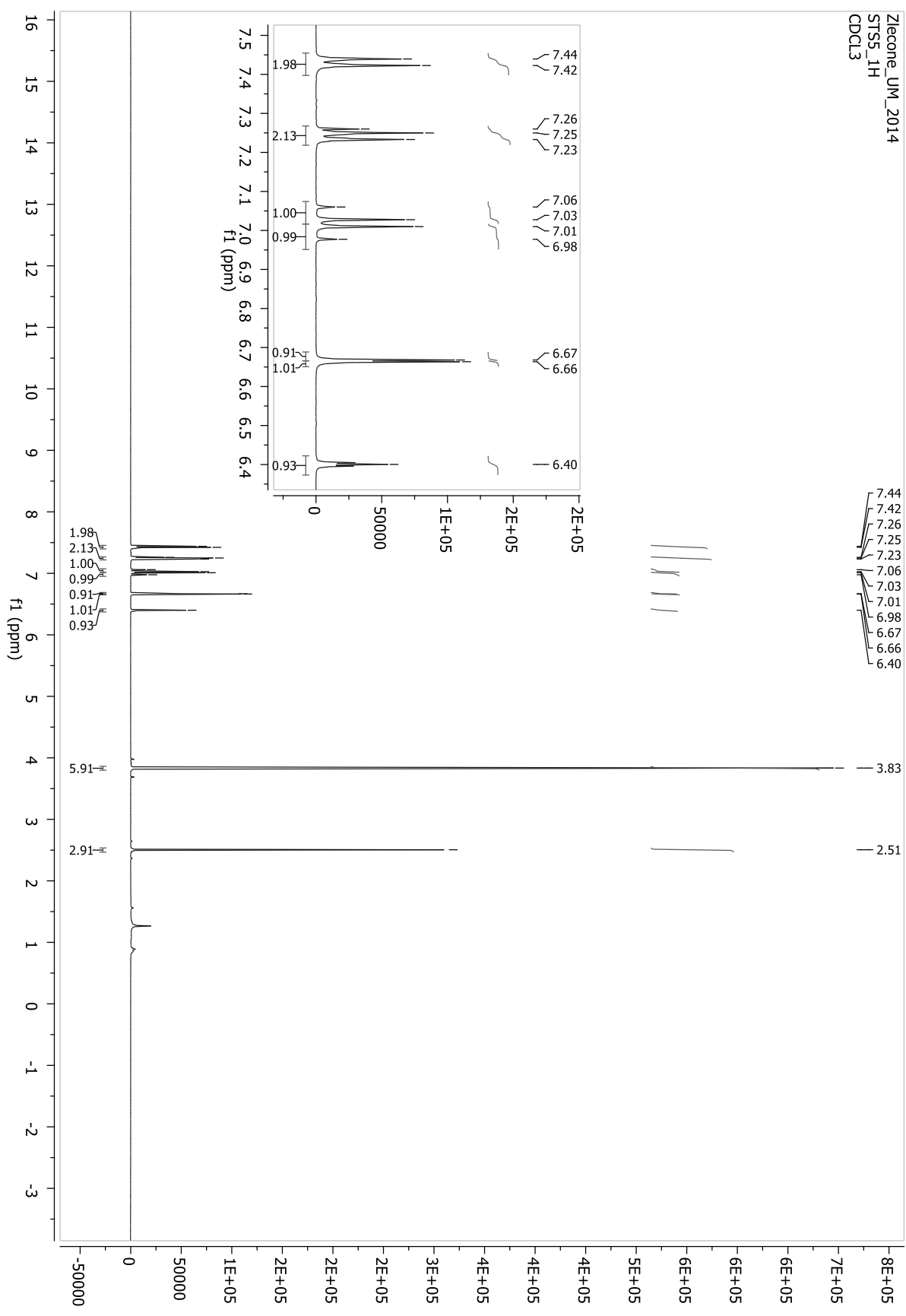
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	126.96
		C-2	153.76
OCH ₃	3.86 (s)	C-2-OCH ₃	56.22
H-3	6.85 (d, 8.9)	C-3	111.51
H-4	6.81 (d, 8.9)	C-4	113.62
		C-5	151.38
OCH ₃	3.83 (s)	C-5-OCH ₃	55.74
H-6	7.16 (s)	C-6	112.25
H-vin	7.43 (d, 16.5)	C-vin	128.64
H-vin'	7.06 (d, 16.37)	C-vin'	126.65
		C-1'	134.76
H-2', 6'	7.47 (d, 8.3)	C-2', 6'	127.20
H-3', 5'	7.25 (d, 8.4)	C-3', 5'	122.64
		C-4'	137.55
SCH ₃	2.51 (s)	C4'-SCH ₃	15.81

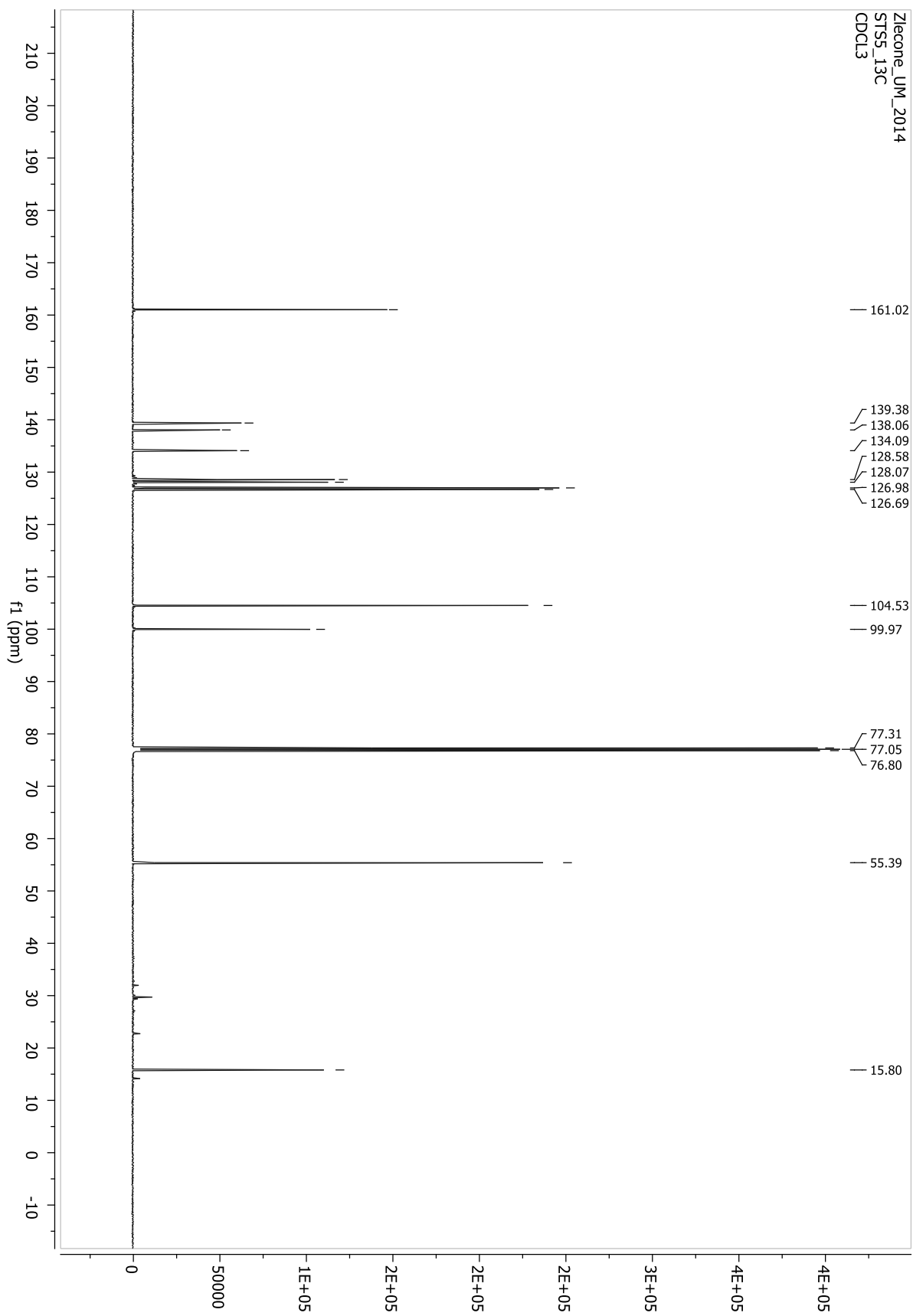


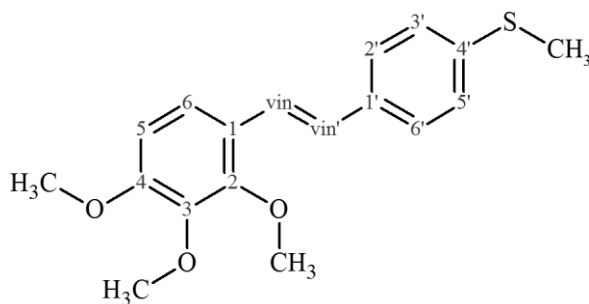


(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3,5-dimetoksyfenylo)eten (S5)*(E)*-3,5-dimetoksy-4'-metylotiosilben

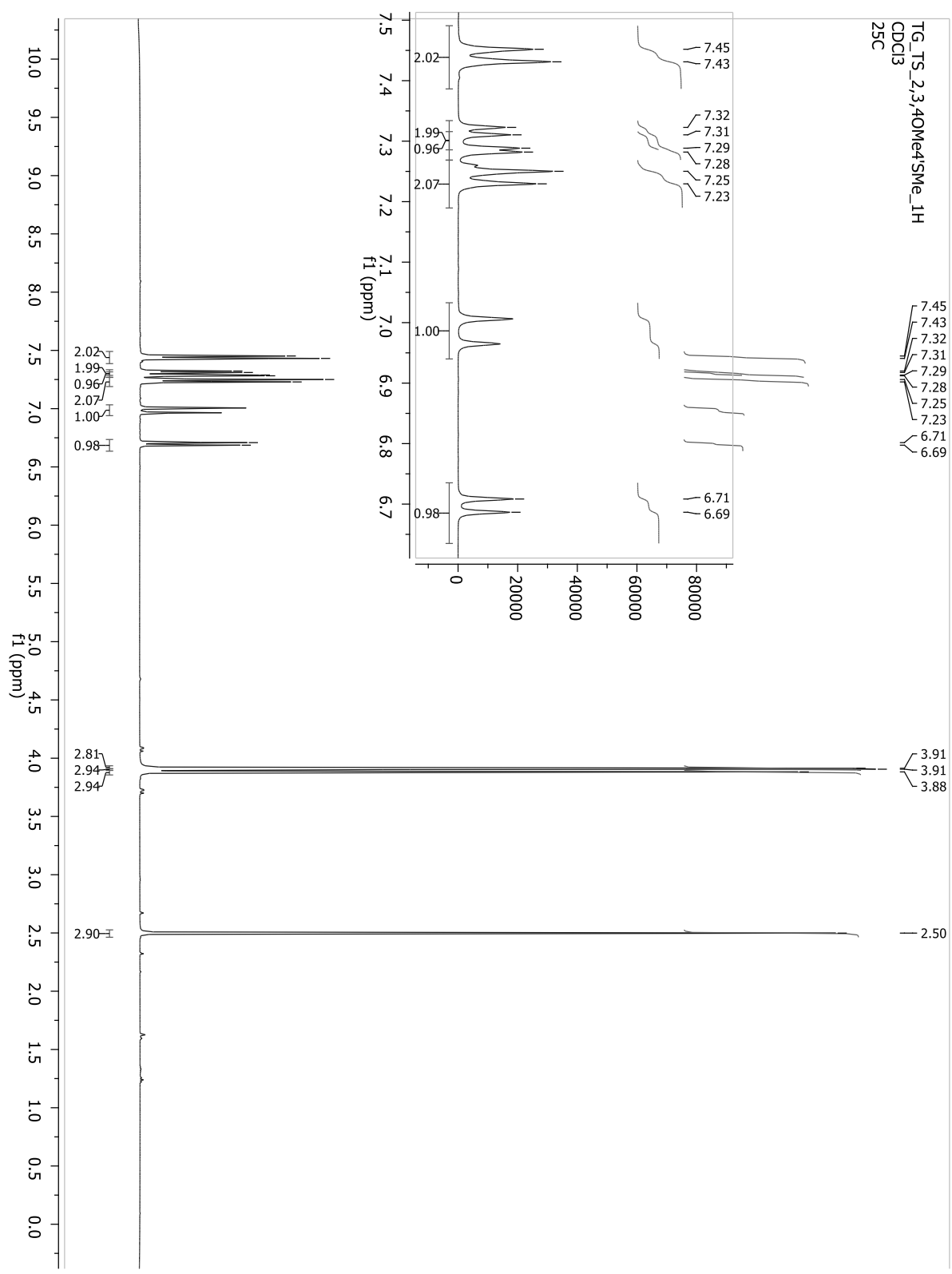
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	138.06
H-2	6.66 (s)	C-2	104.53
		C-3, 5	161.02
OCH ₃	3.83 (s)	C-3-OCH ₃ ,	55.39
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
H-4	6.40 (s)	C-4	99.97
H-6	6.67 (s)	C-6	105.53
H-vin	6.99 (d, 16.30)	C-vin	128.58
H-vin'	7.04 (d, 16.30)	C-vin'	128.07
		C-1'	134.09
H-2', 6'	7.24 (d, 8.4)	C-2', 6'	126.98
H-3', 5'	7.43 (d, 8.4)	C-3', 5'	126.69
		C-4'	139.38
SCH ₃	2.51 (s)	C4'-SCH ₃	15.80

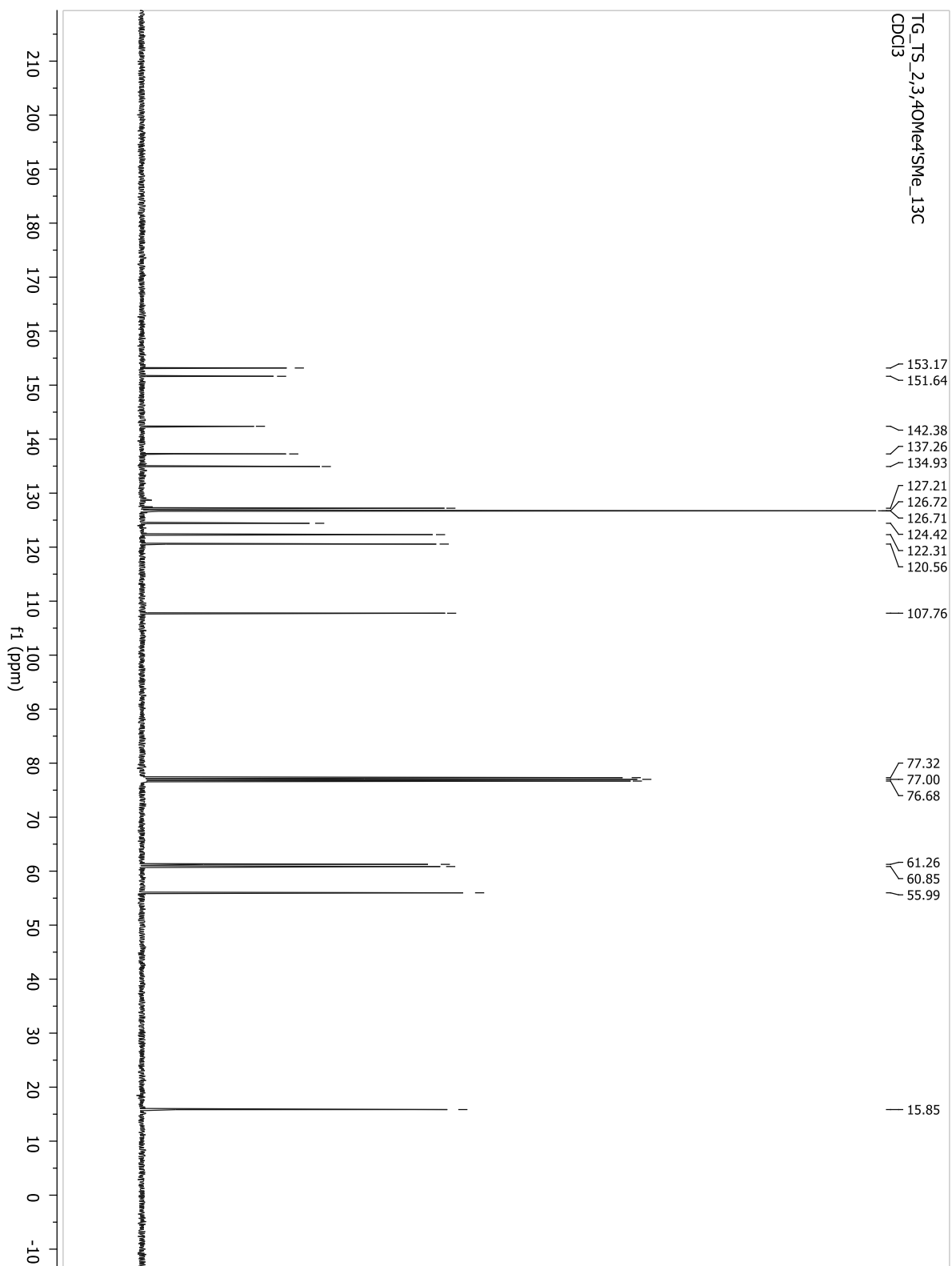


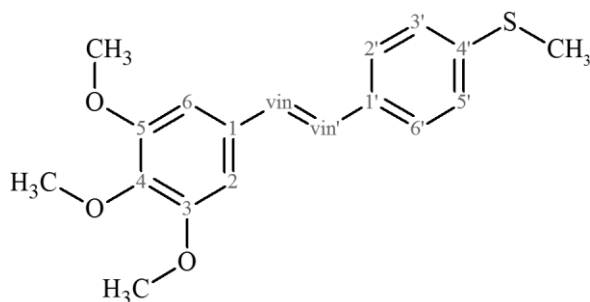


(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,3,4-trimetoksyfenylo)eten (S6)*(E)*-2,3,4-trimetoksy-4'-metylotiostilben

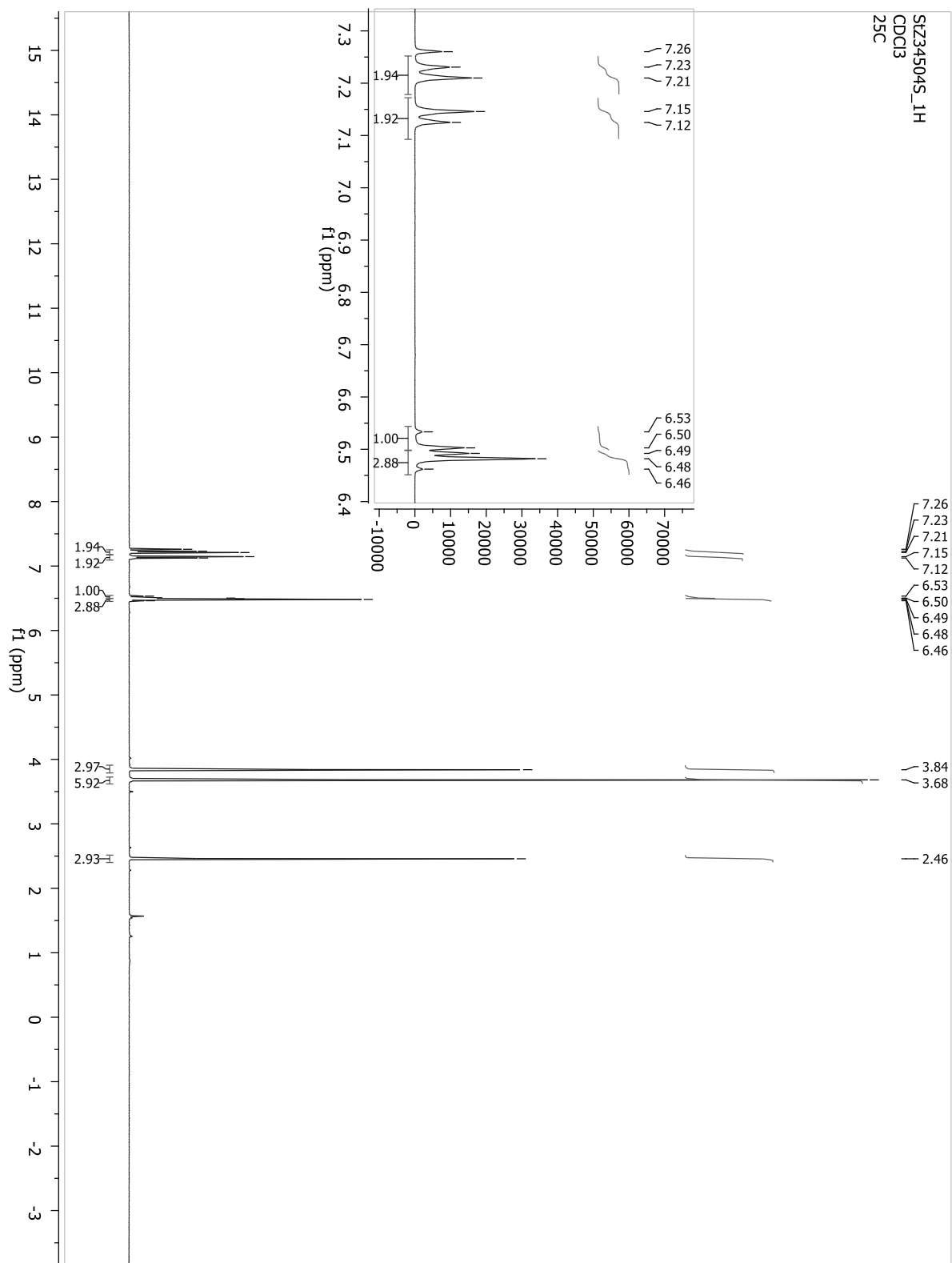
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	120.56
		C-2	153.17
OCH ₃	3.88 (s)	C-2-OCH ₃	60.85
		C-3	142.38
OCH ₃	3.91 (s)	C-3-OCH ₃	61.26
		C-4	151.64
OCH ₃	3.91 (s)	C-4-OCH ₃	55.99
H-5	6.70 (d, 8.8)	C-5	107.76
H-6	7.30 (d, 8.8)	C-6	122.31
H-vin	7.30 (d, 16.3)	C-vin	126.72
H-vin'	6.99 (d, 16.5)	C-vin'	124.42
		C-1'	134.93
H-2', 6'	7.44 (d, 8.4)	C-2', 6'	127.21
H-3', 5'	7.24 (d, 8.4)	C-3', 5'	126.71
		C-4'	136.26
SCH ₃	2.50 (s)	C4'-SCH ₃	15.85

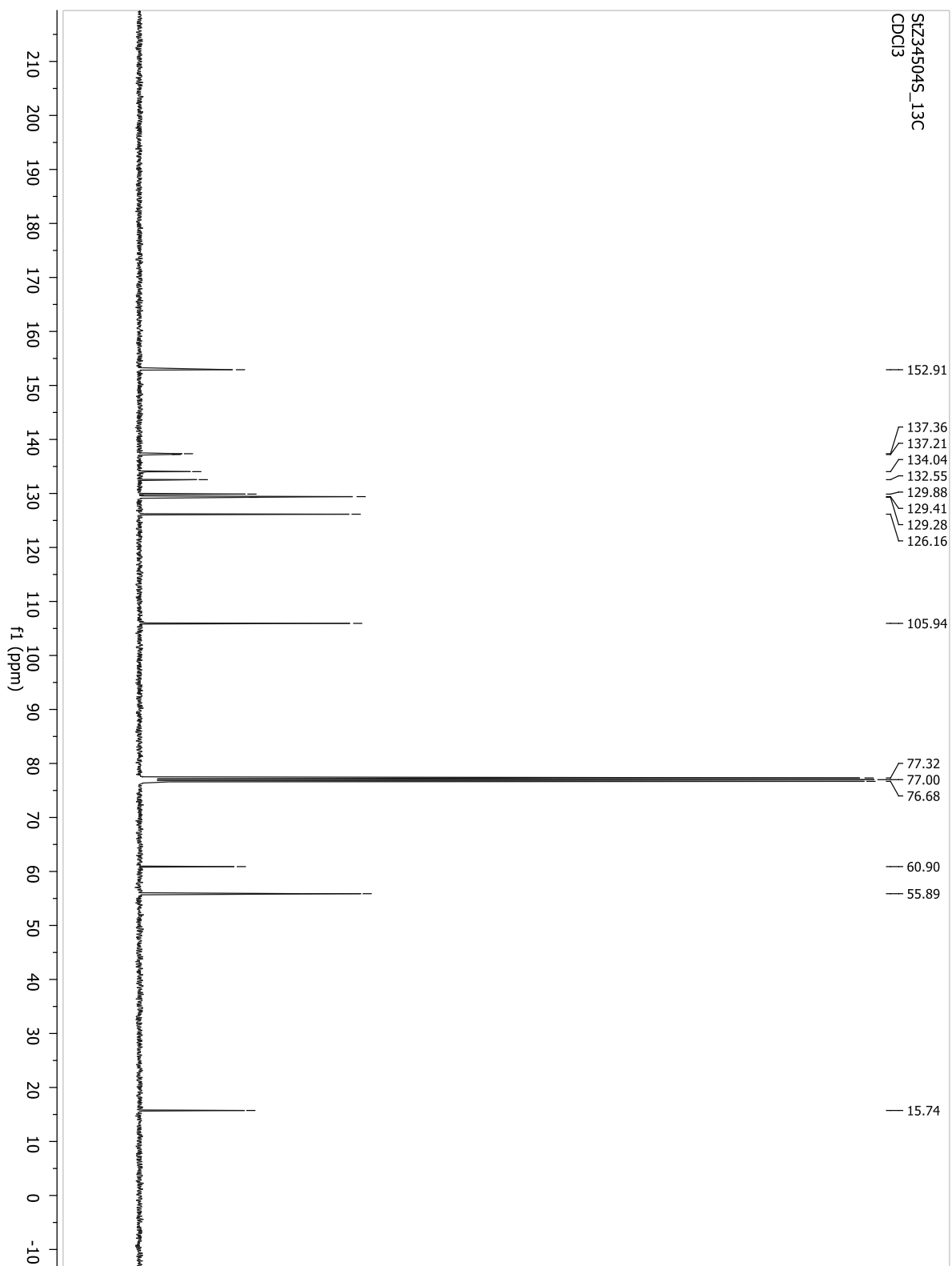


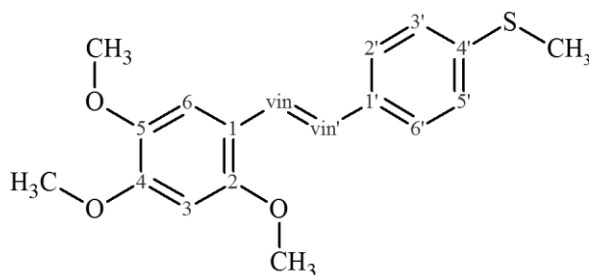


(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten (S7)*(E)*-3,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben

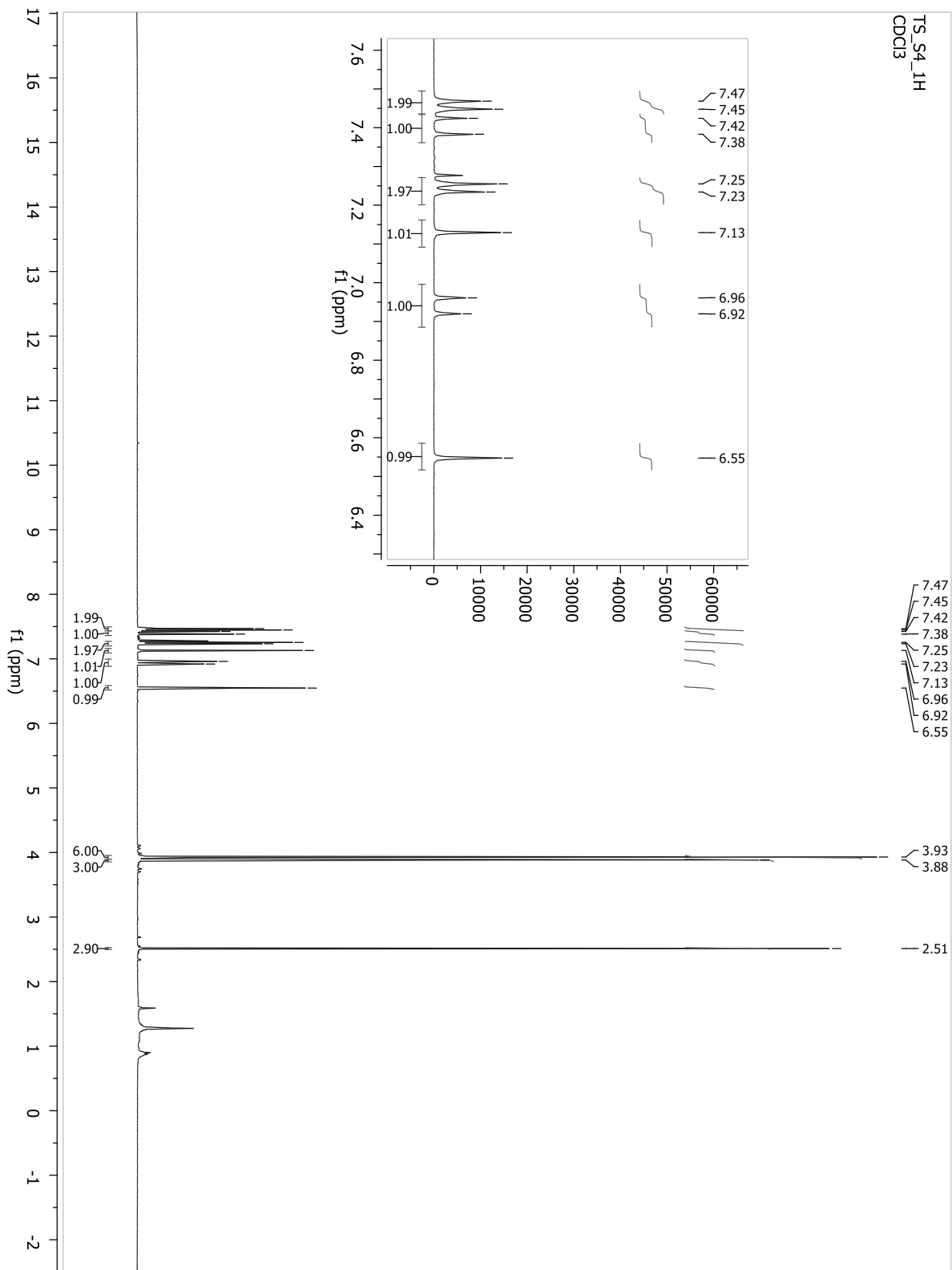
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	132.55
H-2, 6	6.48 (s)	C-2, 6	105.94
C-3-OCH ₃ ,	3.68 (s)	C-3, 5	152.91
C-5-OCH ₃		C-3-OCH ₃ ,	55.89
		C-5-OCH ₃	
		C-4	137.36
C-4-OCH ₃	3.84 (s)	C-4-OCH ₃	60.90
H-vin	6.51 (d, 16.5)	C-vin	129.88
H-vin'	6.48 (d, 16.3)	C-vin'	129.28
		C-1'	1364.04
H-2', 6'	7.22 (d, 8.3)	C-2', 6'	126.41
H-3', 5'	7.14 (d, 8.3)	C-3', 5'	126.16
		C-4'	137.21
SCH ₃	2.46 (s)	C4'-SCH ₃	15.74

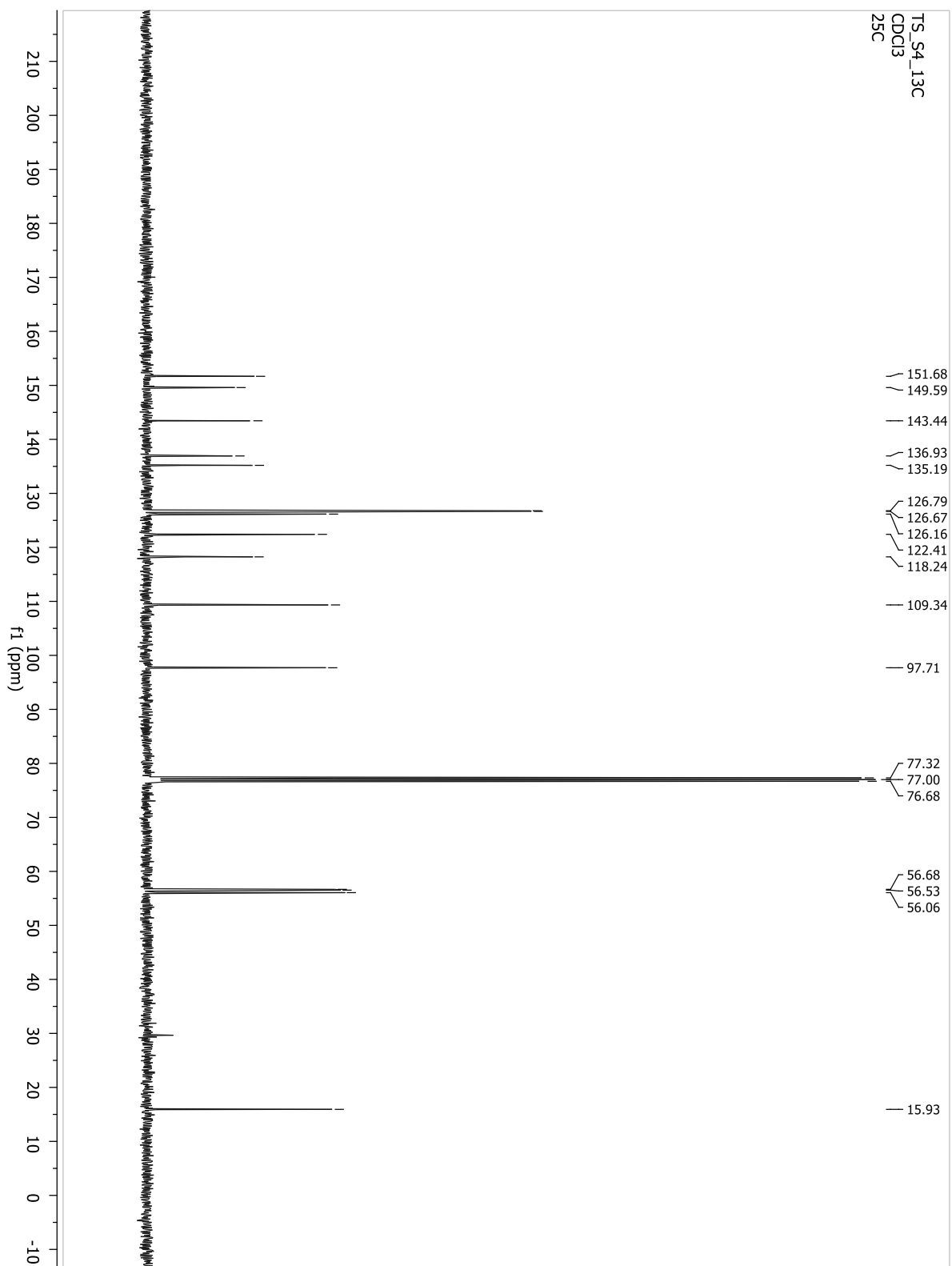


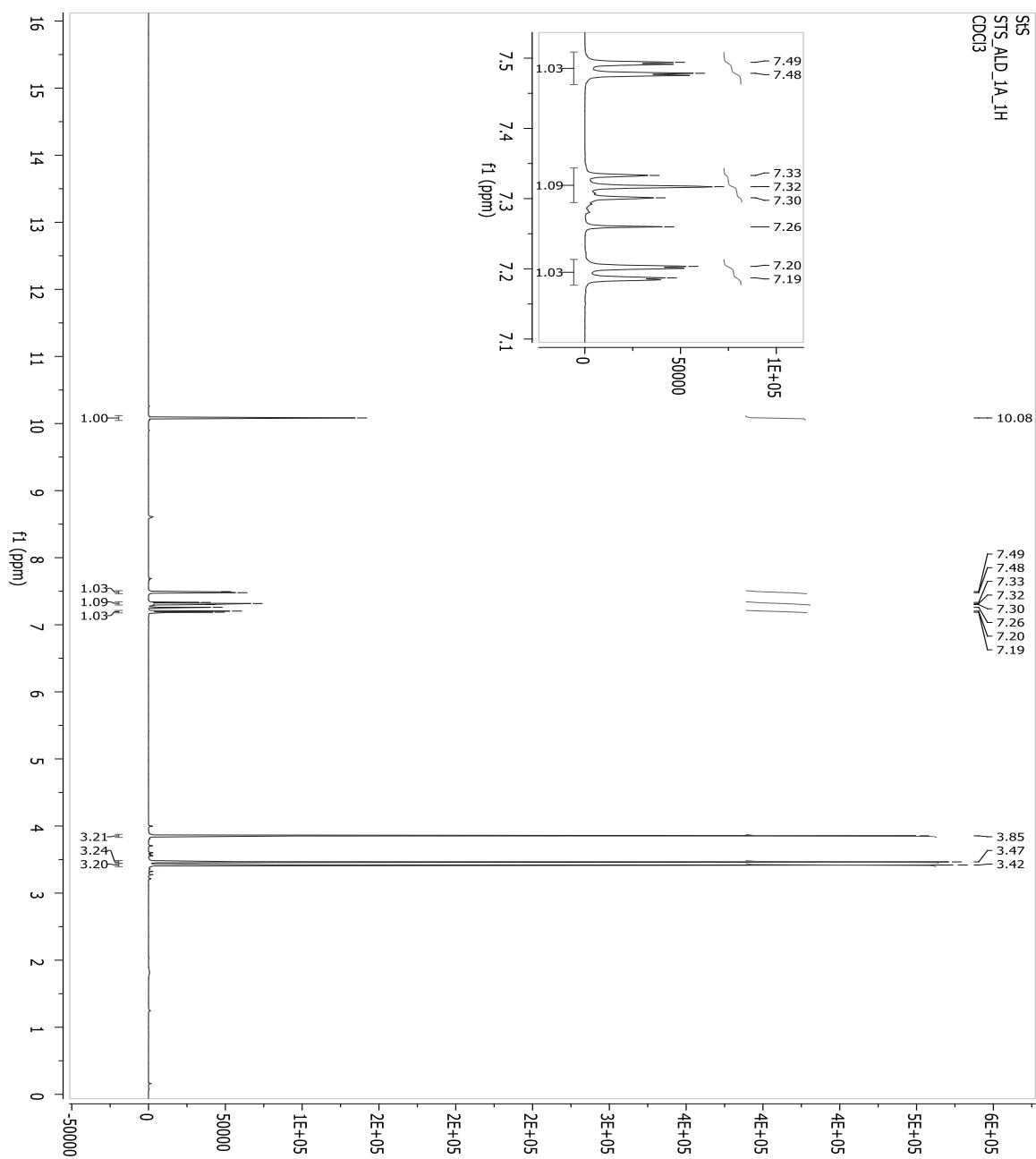
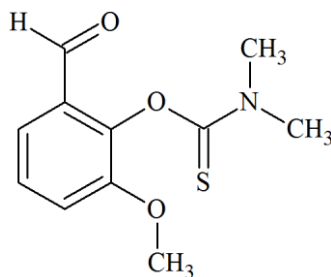


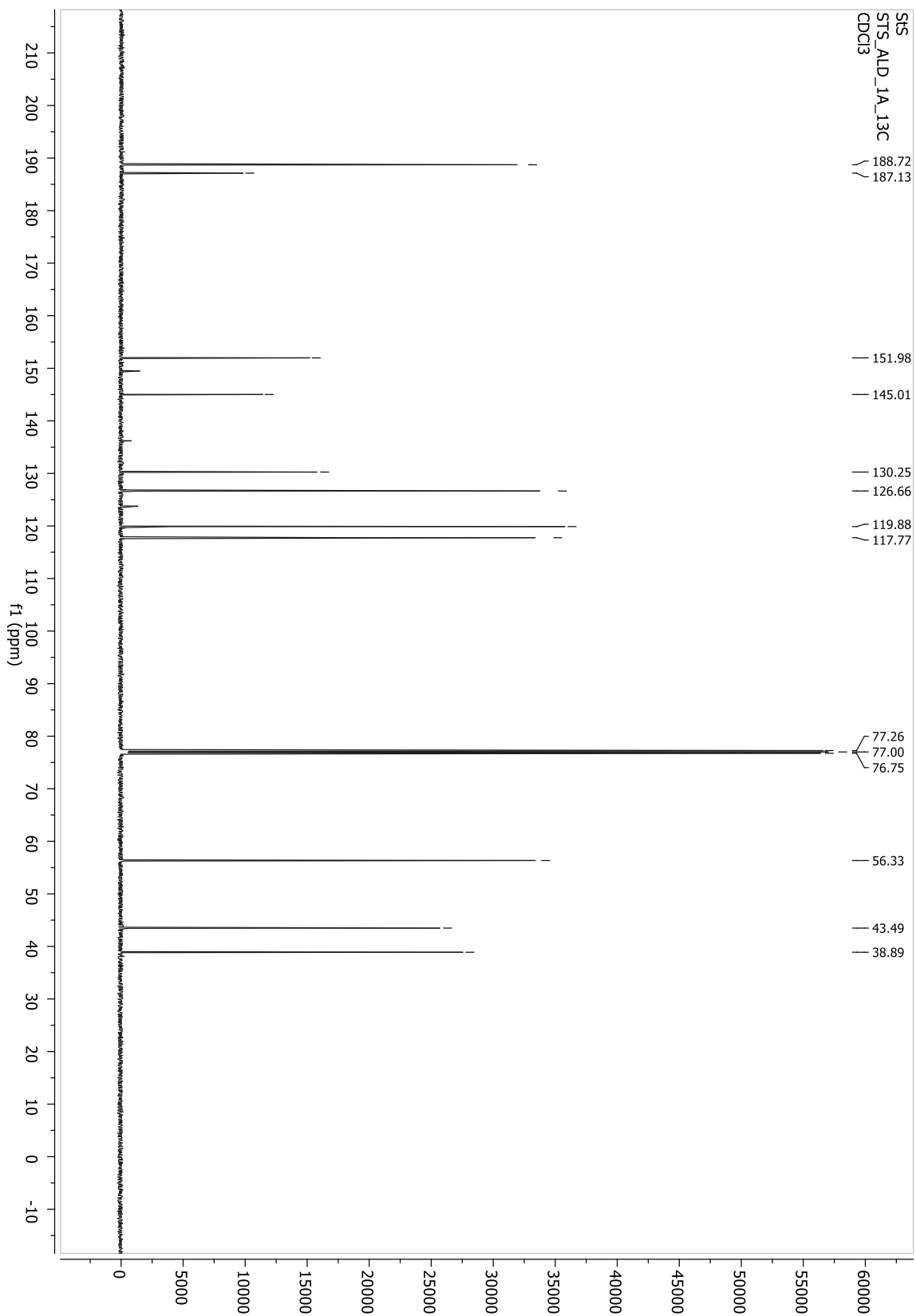
(E)-1-(4-metylotiofenylo)-2-(2,4,5-trimetoksyfenylo)eten (S8)*(E)*-2,4,5-trimetoksy-4'-metylotiostilben

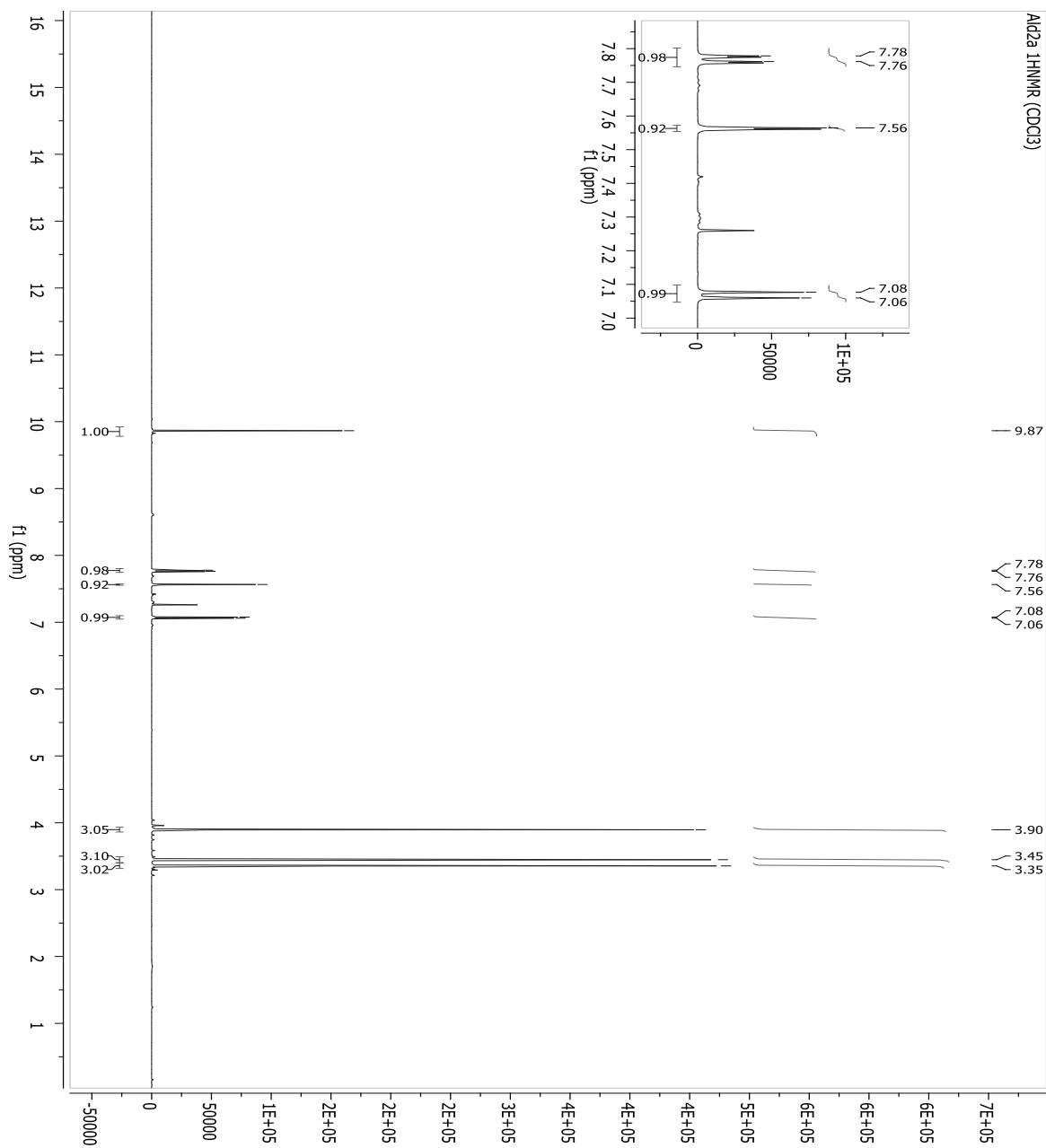
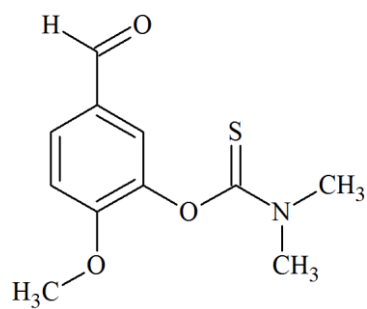
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	118.24
		C-2	151.68
OCH ₃	3.88 (s)	C-2-OCH ₃	56.06
H-3	6.55 (s)	C-3	97.71
		C-4	149.59
OCH ₃	3.93 (s)	C-4-OCH ₃	56.68
		C-5	143.44
OCH ₃	3.93 (s)	C-5-OCH ₃	56.53
H-6	7.13 (s)	C-6	109.34
H-vin	7.40 (d, 16.5)	C-vin	126.16
H-vin'	6.94 (d, 16.4)	C-vin'	122.41
		C-1'	135.19
H-2', 6'	7.46 (d, 8.3)	C-2', 6'	126.79
H-3', 5'	7.24 (d, 8.4)	C-3', 5'	126.67
		C-4'	136.93
SCH ₃	2.51 (s)	C4'-SCH ₃	15.93

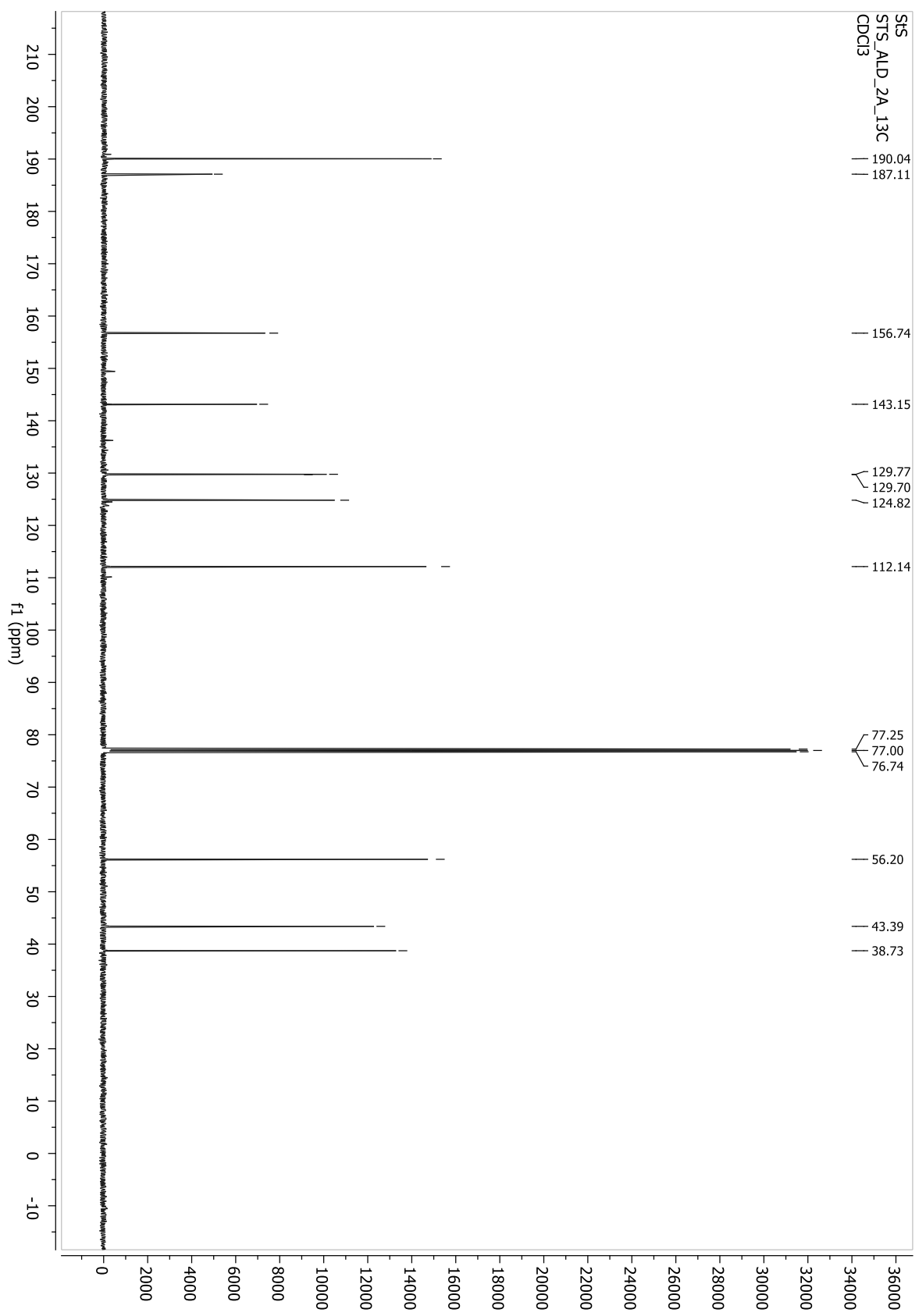


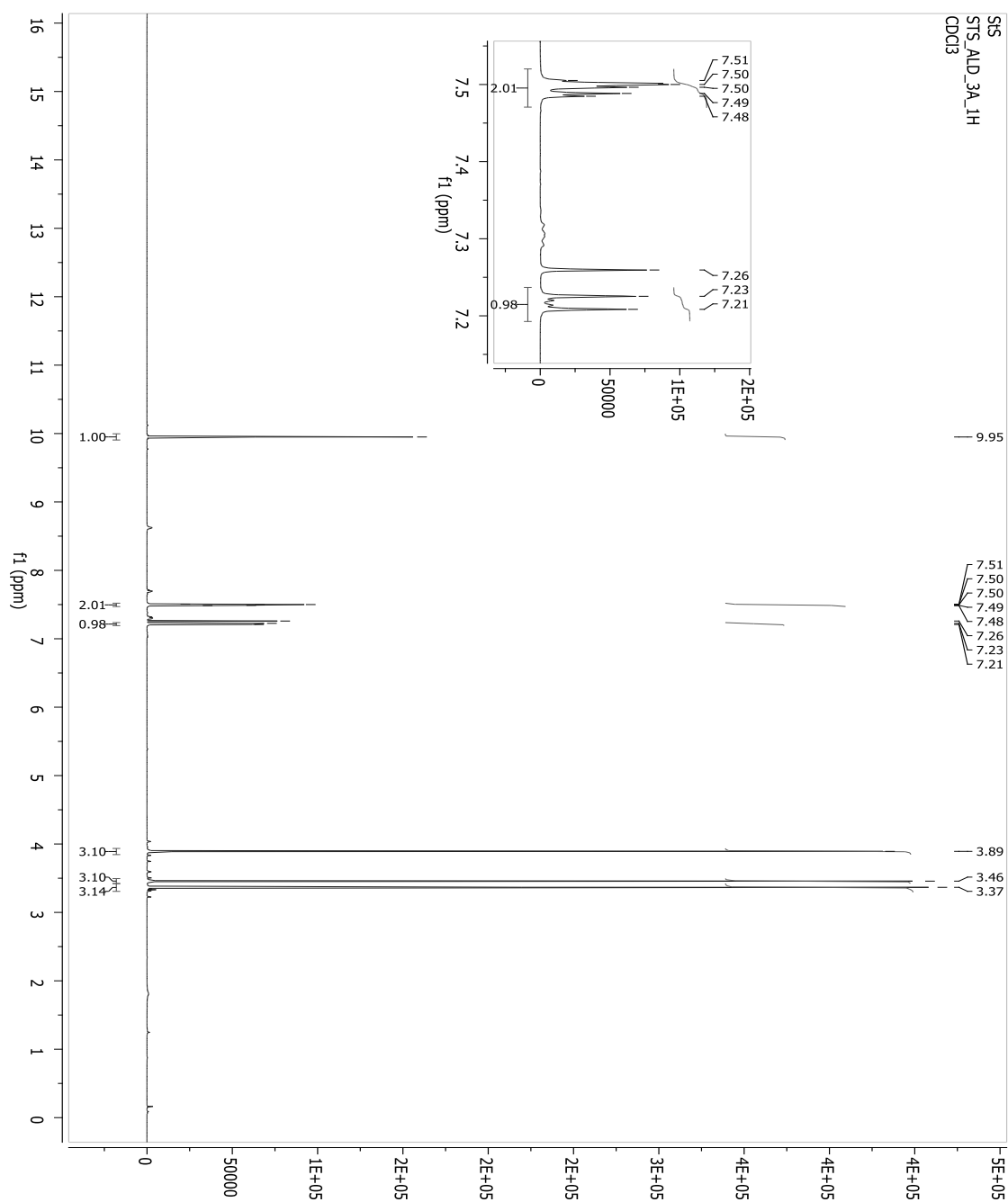
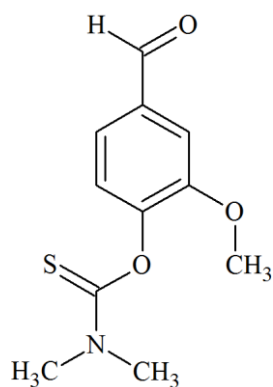


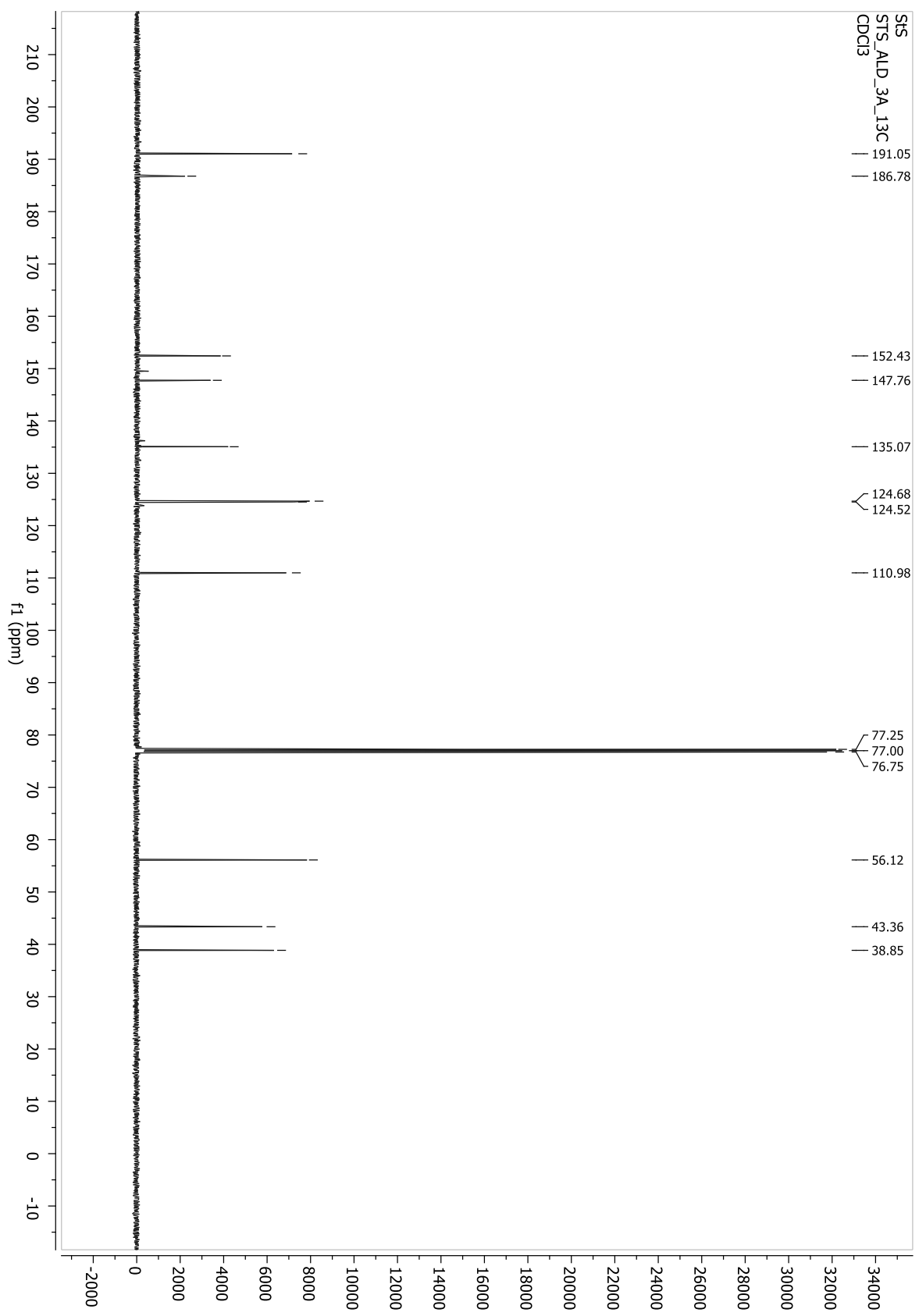
O-tiokarbaminowe pochodne benzaldehydów (Ald seria a)*O*-(2-formylo-6-metoksyfenilo)-*N,N*-dimetylotiokarbaminian (Ald 1a)

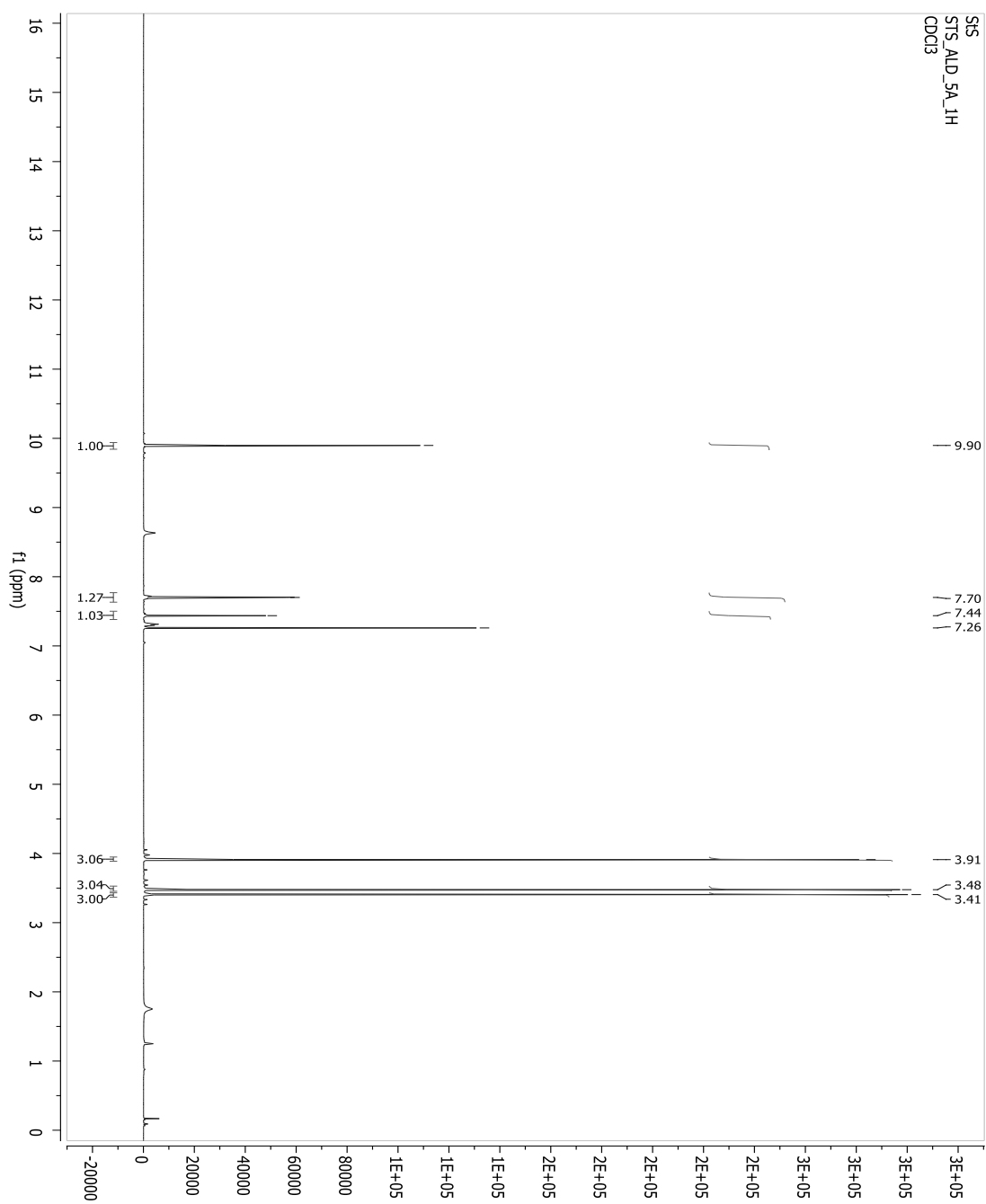
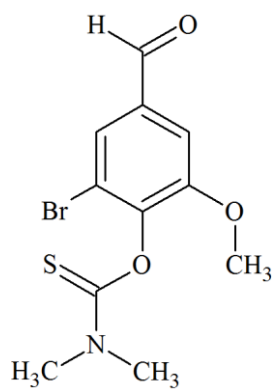


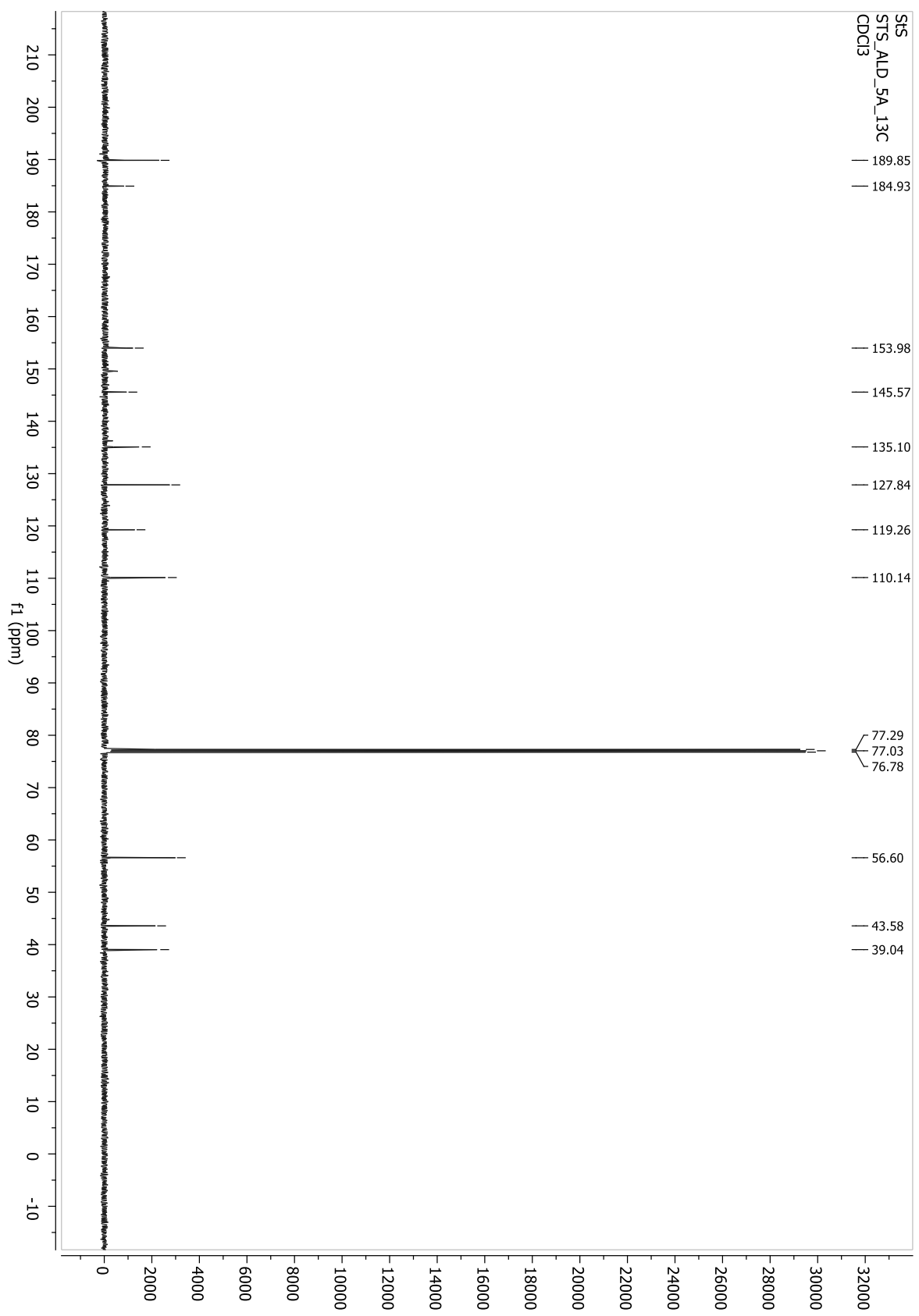
O-(5-formylo-2-metoksyfenilo)-*N,N*-dimetylotiokarbaminian (Ald 2a)

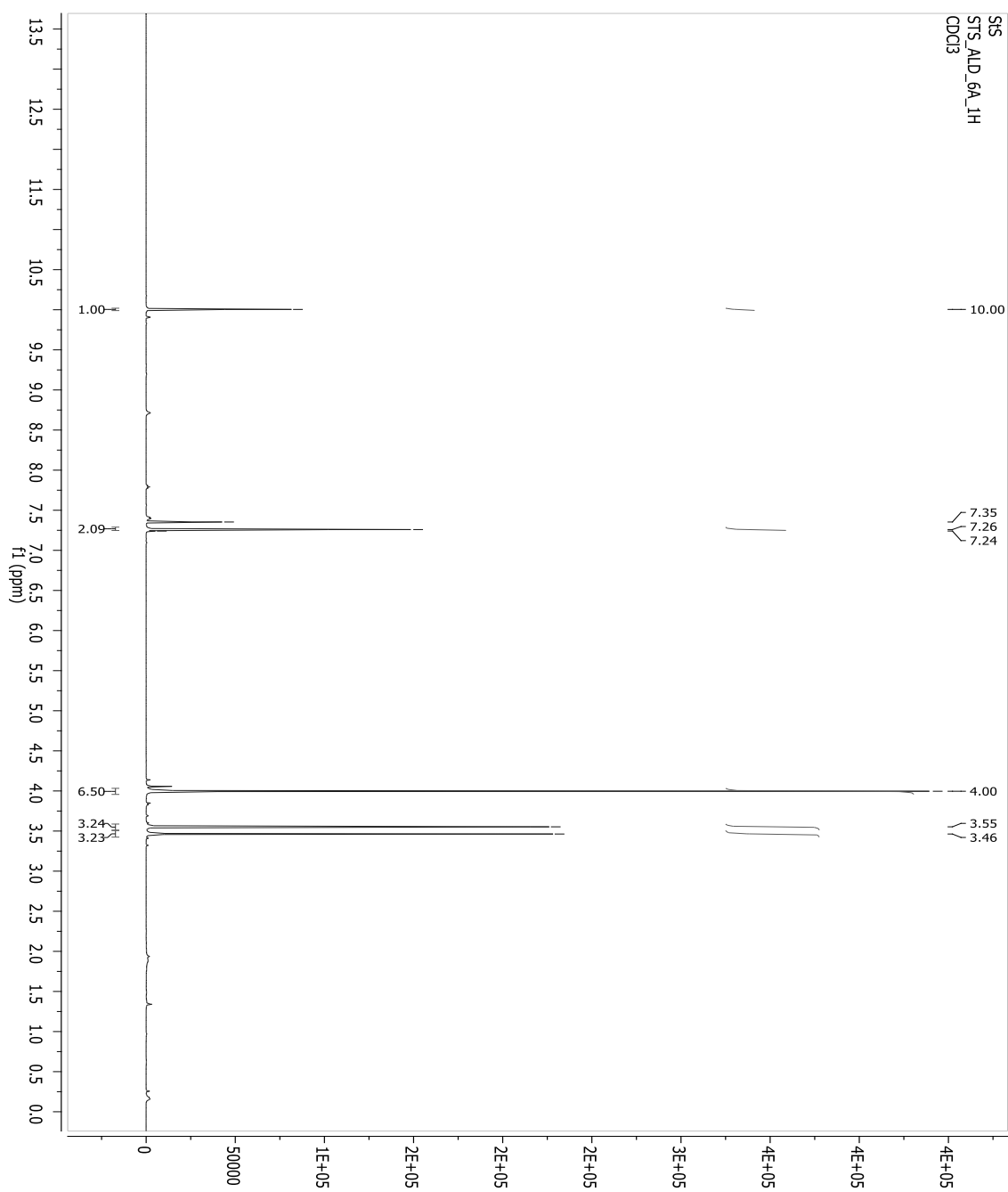
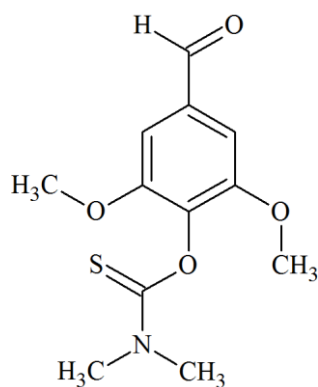


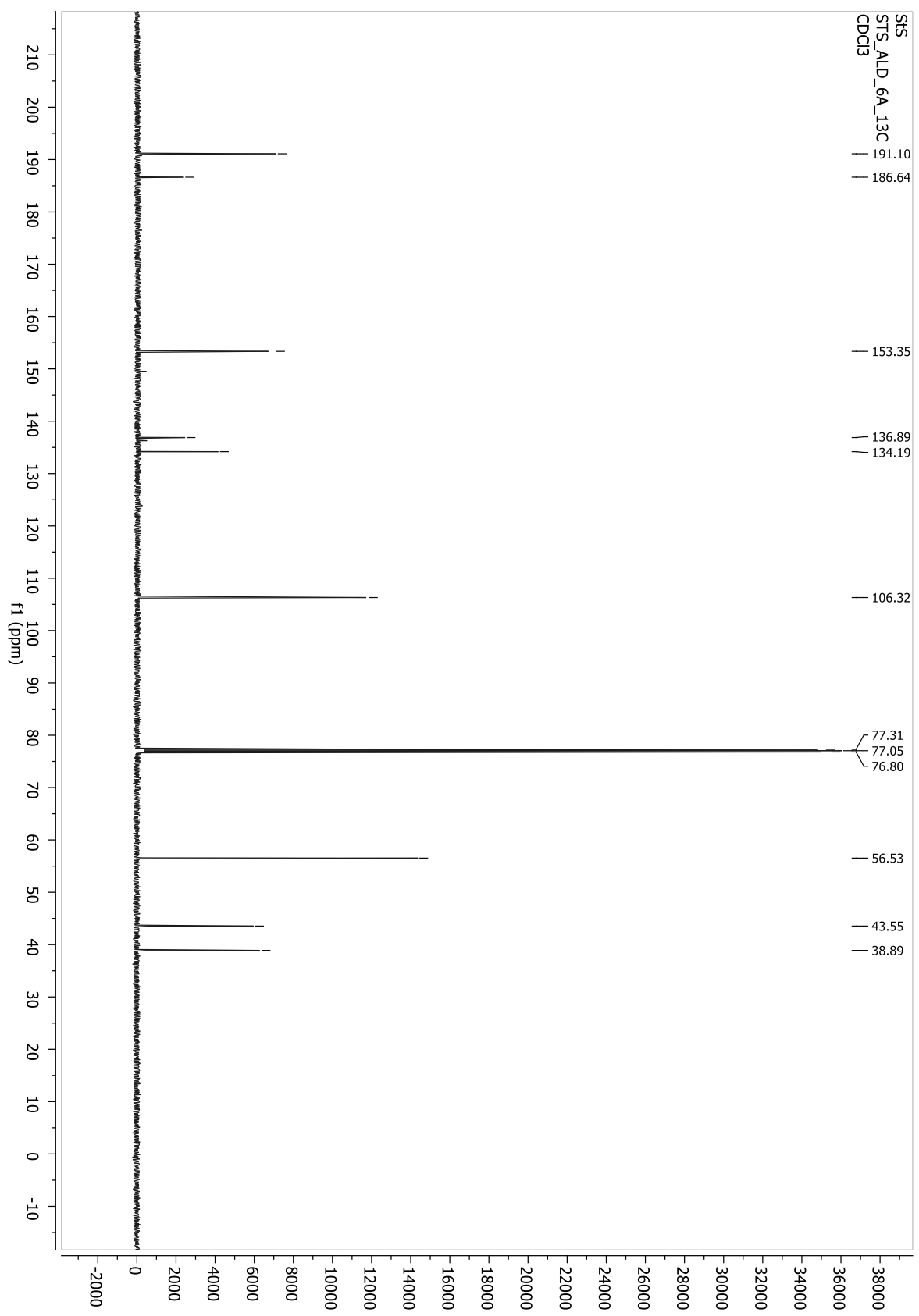
O-(4-formyl-2-metoksyfenilo)-*N,N*-dimetylotiokarbaminian (Ald 3a)

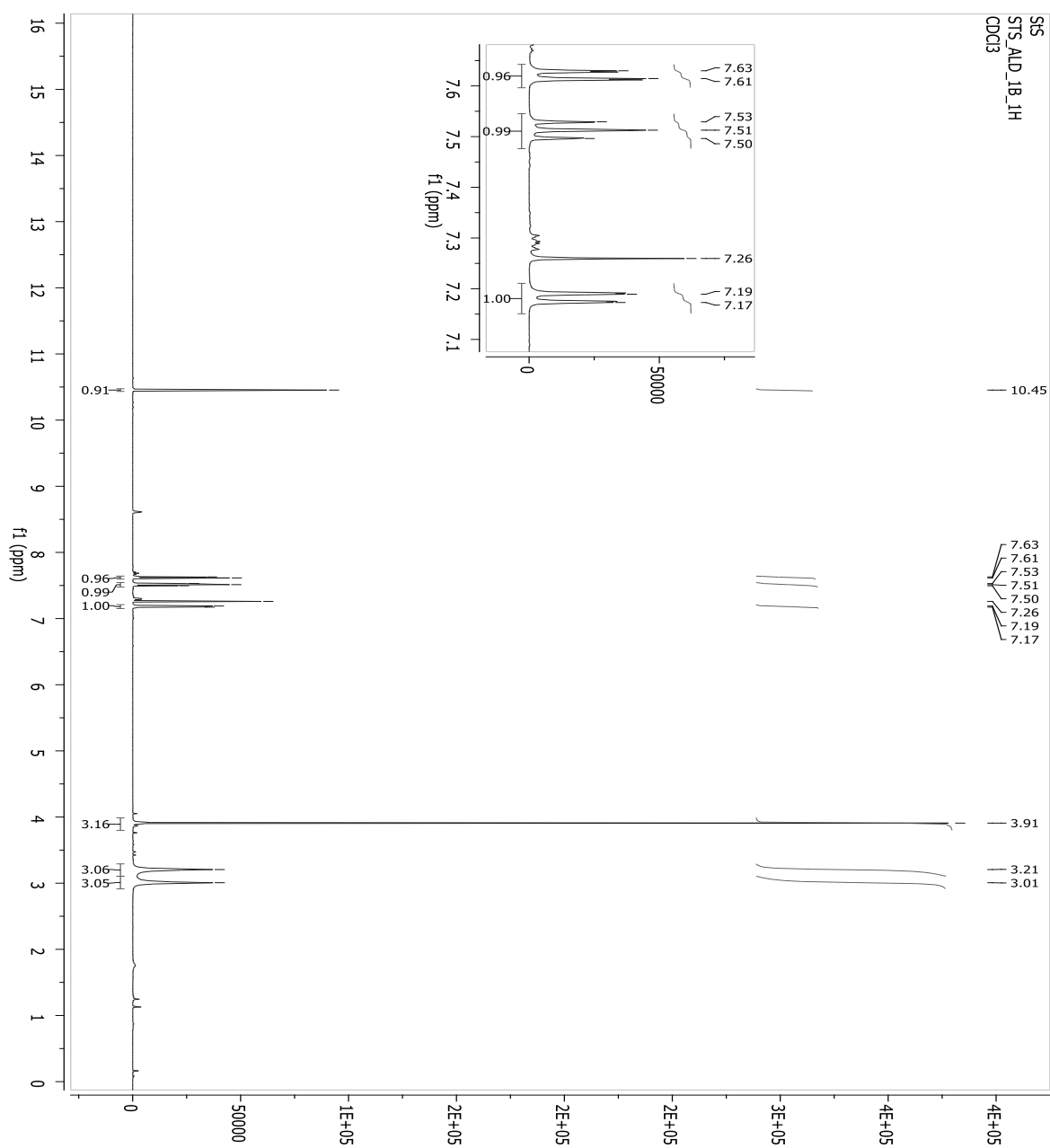
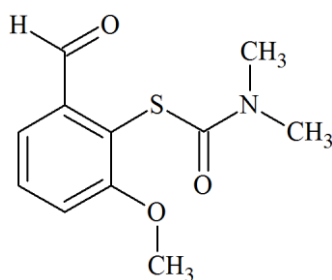


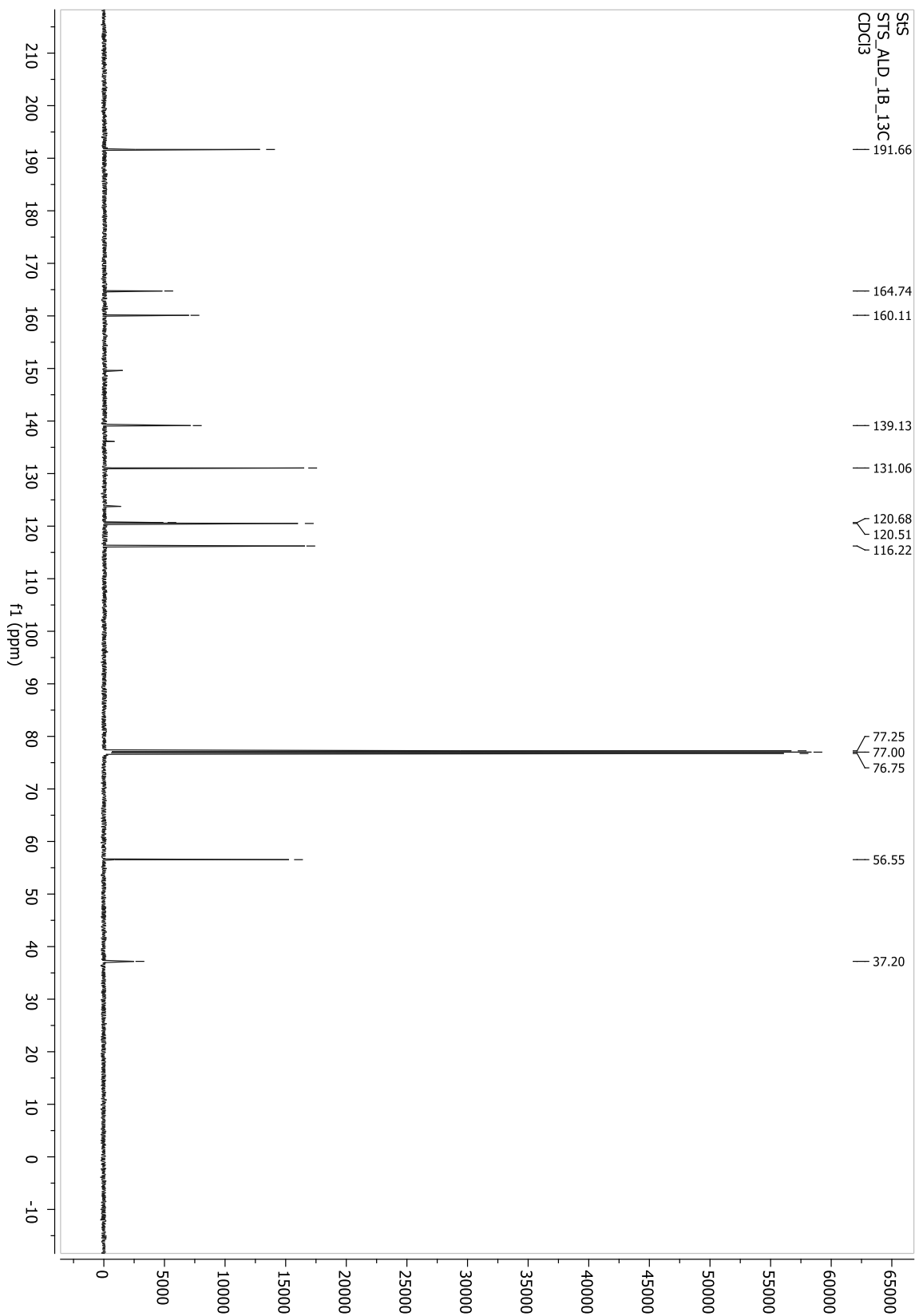
O-(4-formylo-2-bromo-6-metoksyfenilo)-*N,N*-dimetylotiokarbaminian (Ald 4a)

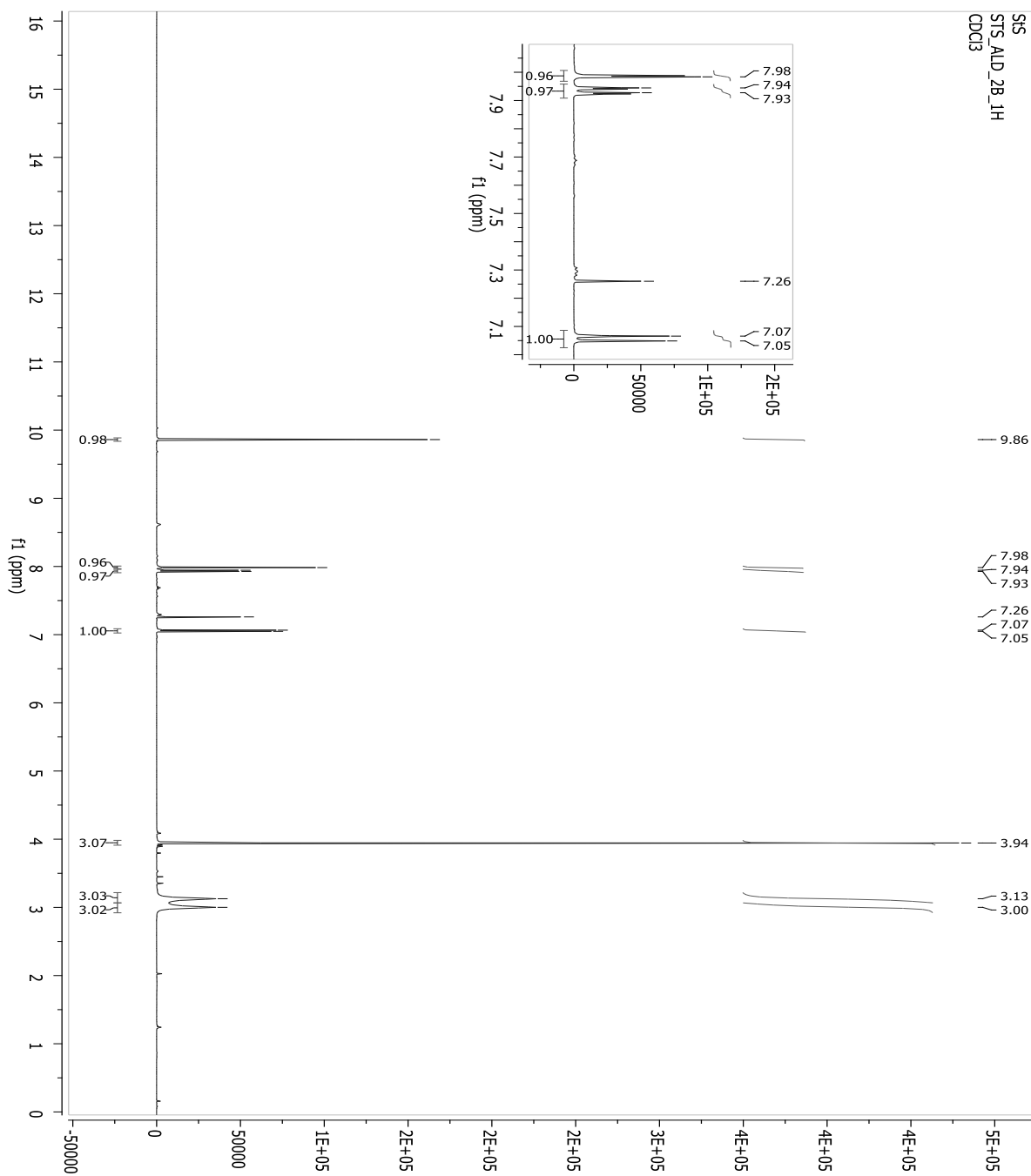
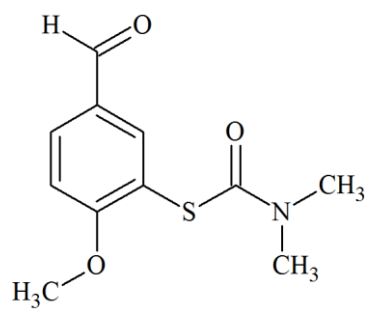


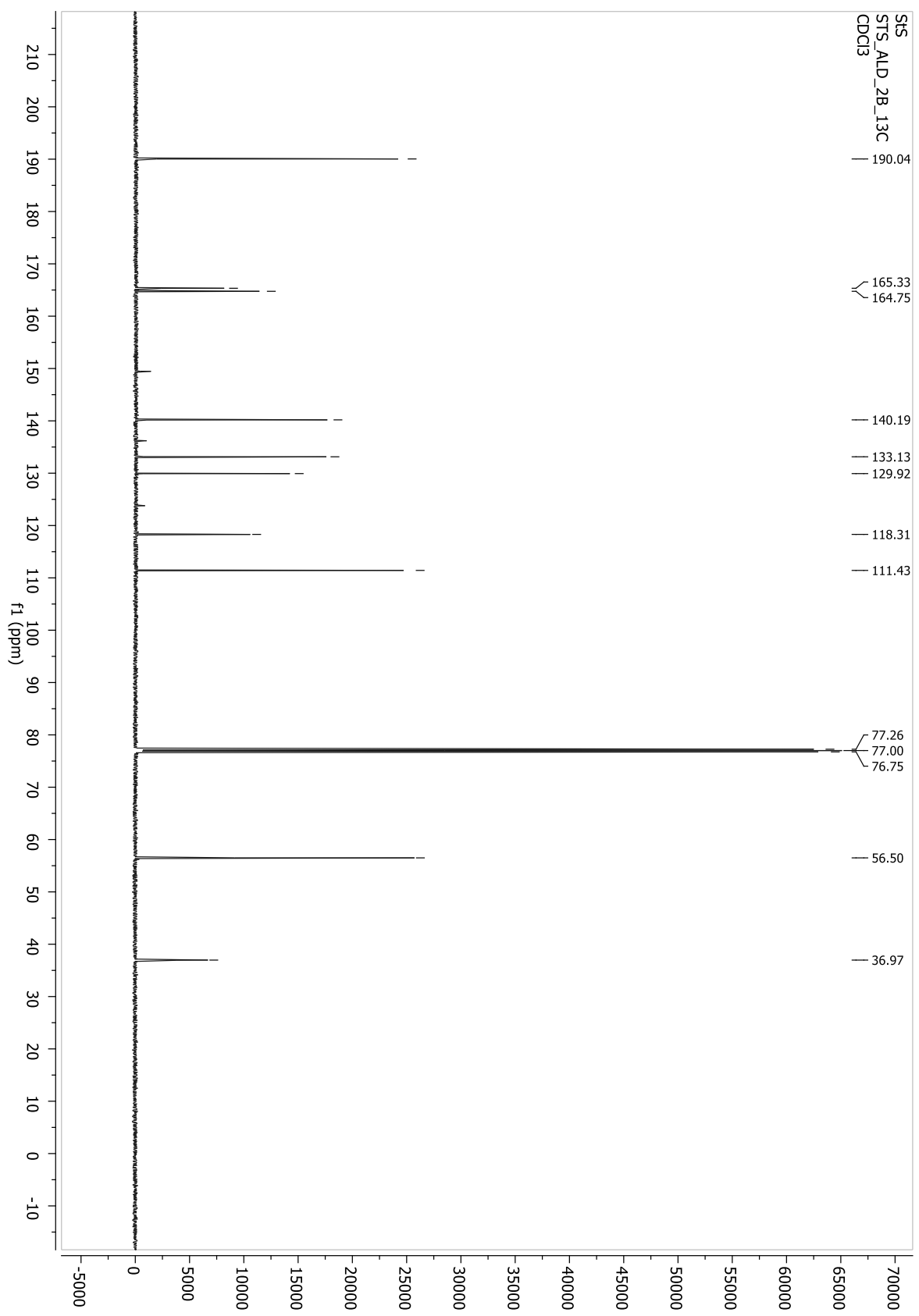
O-(4-formylo-2,6-dimetoksyfenylo)-*N,N*-dimetylotiokarbaminian (Ald 5a)

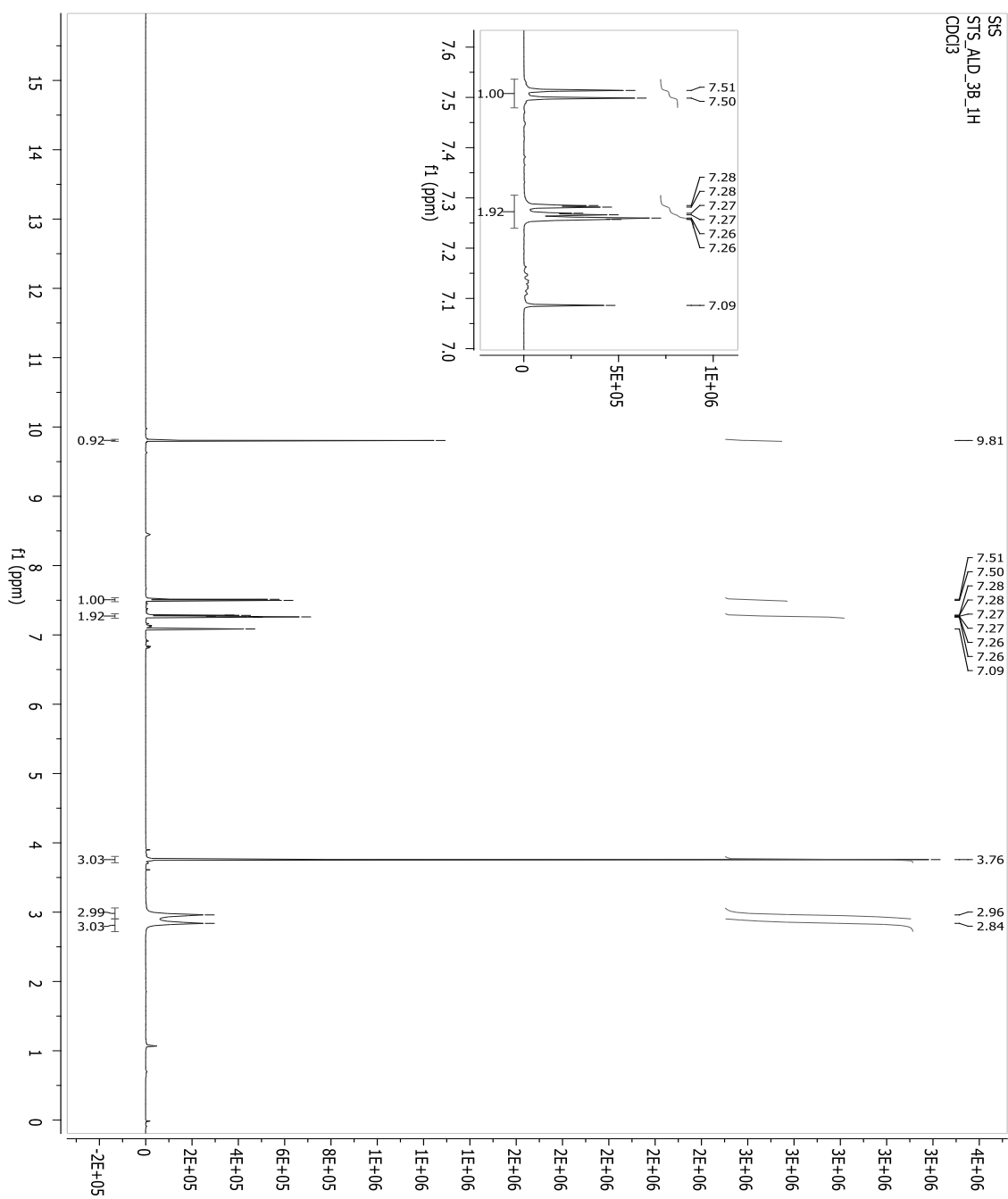
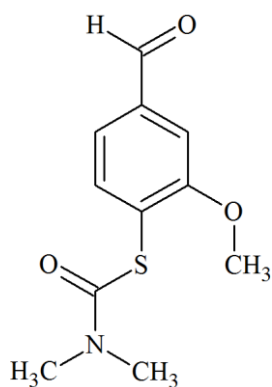


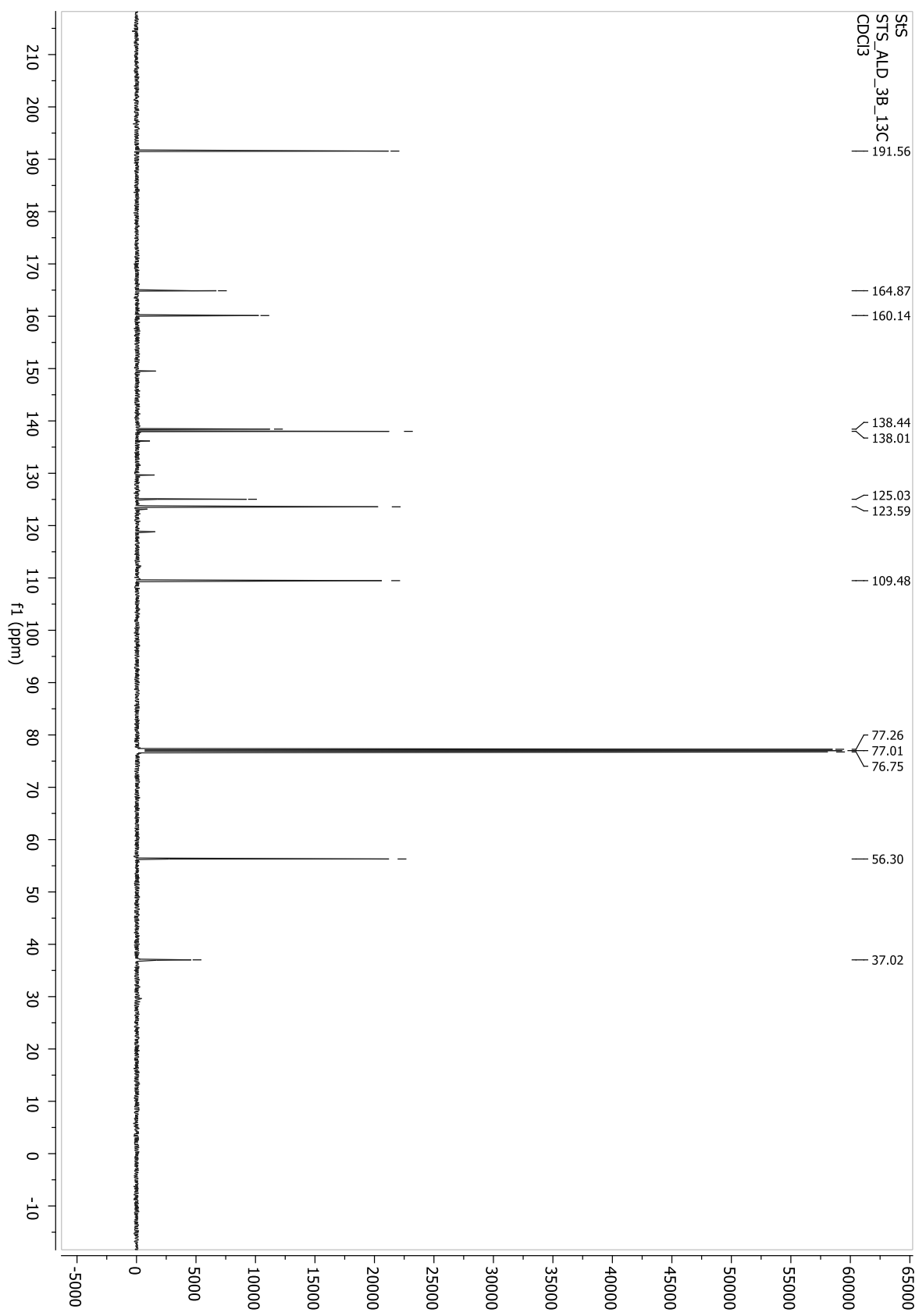
S-tiokarbaminowe pochodne benzaldehydów (Ald seria b)***S*-(2-formylo-6-metoksyfenylo)-*N,N*-dimetylotiokarbaminian (Ald 1b)**

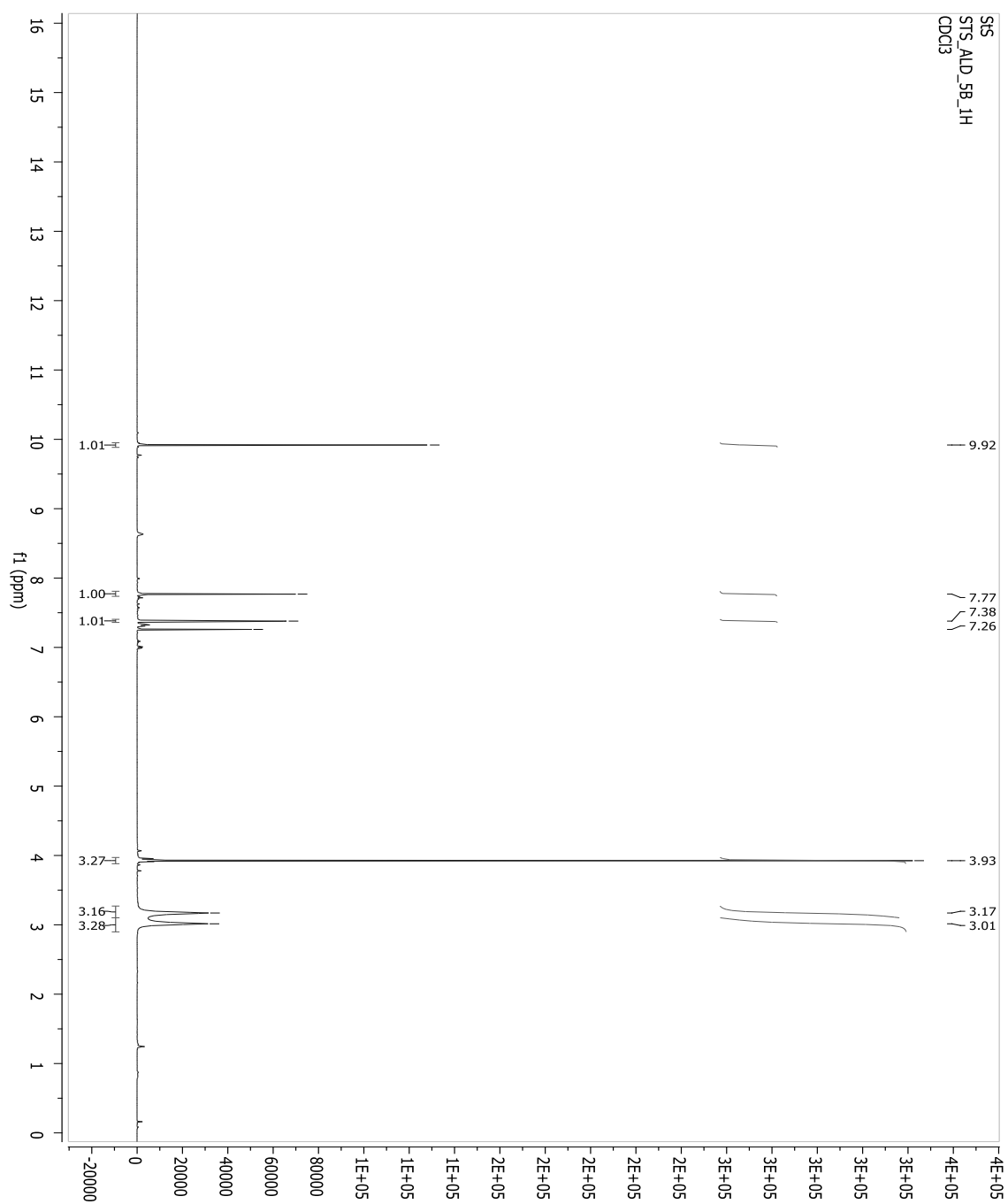
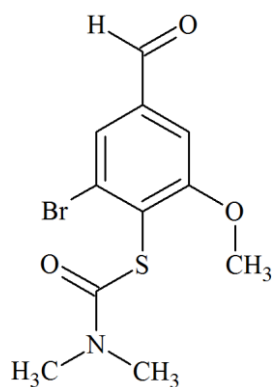


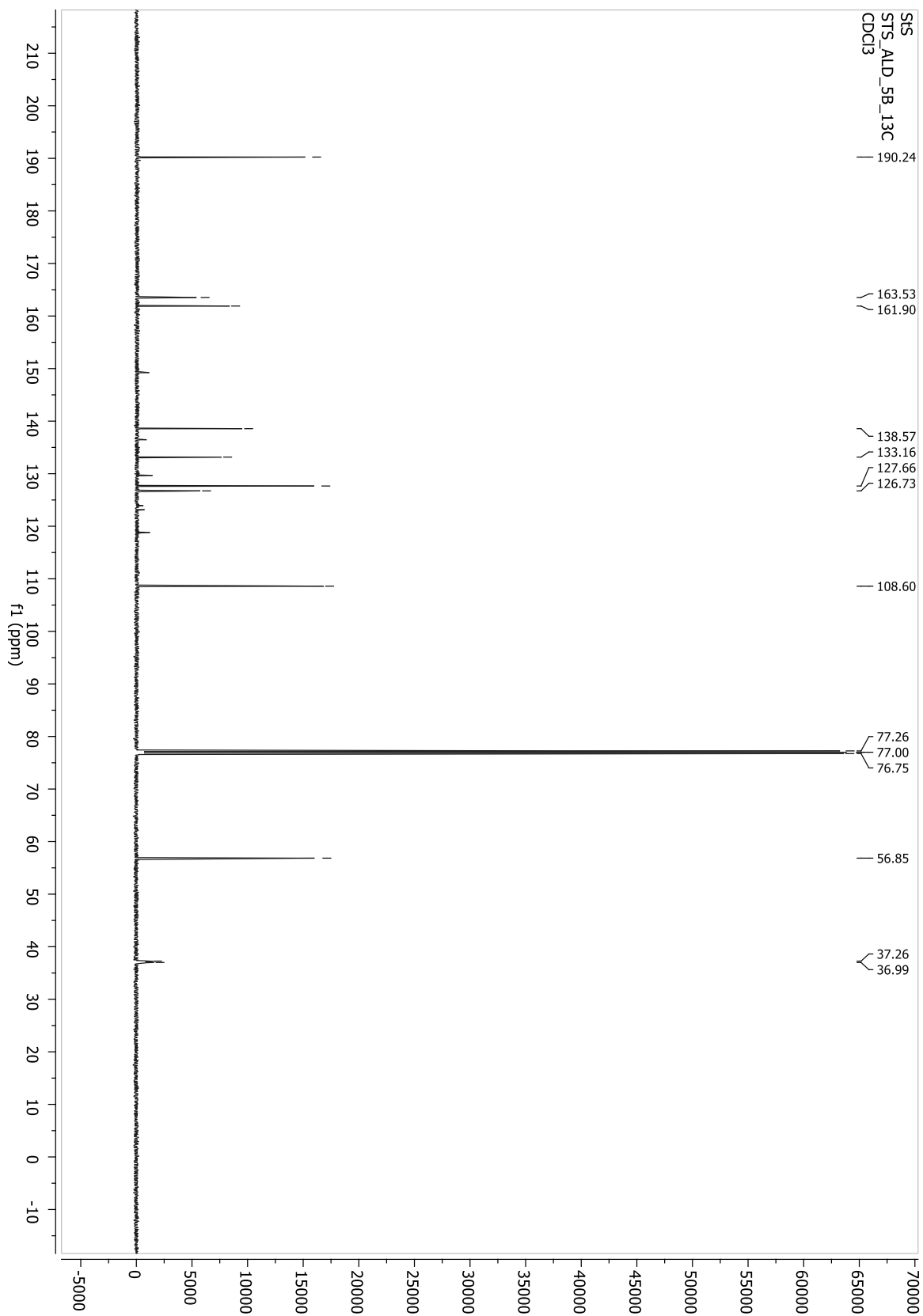
S-(5-formylo-2-metoksyfenilo)-*N,N*-dimetilotiokarbaminan (Ald 2b)

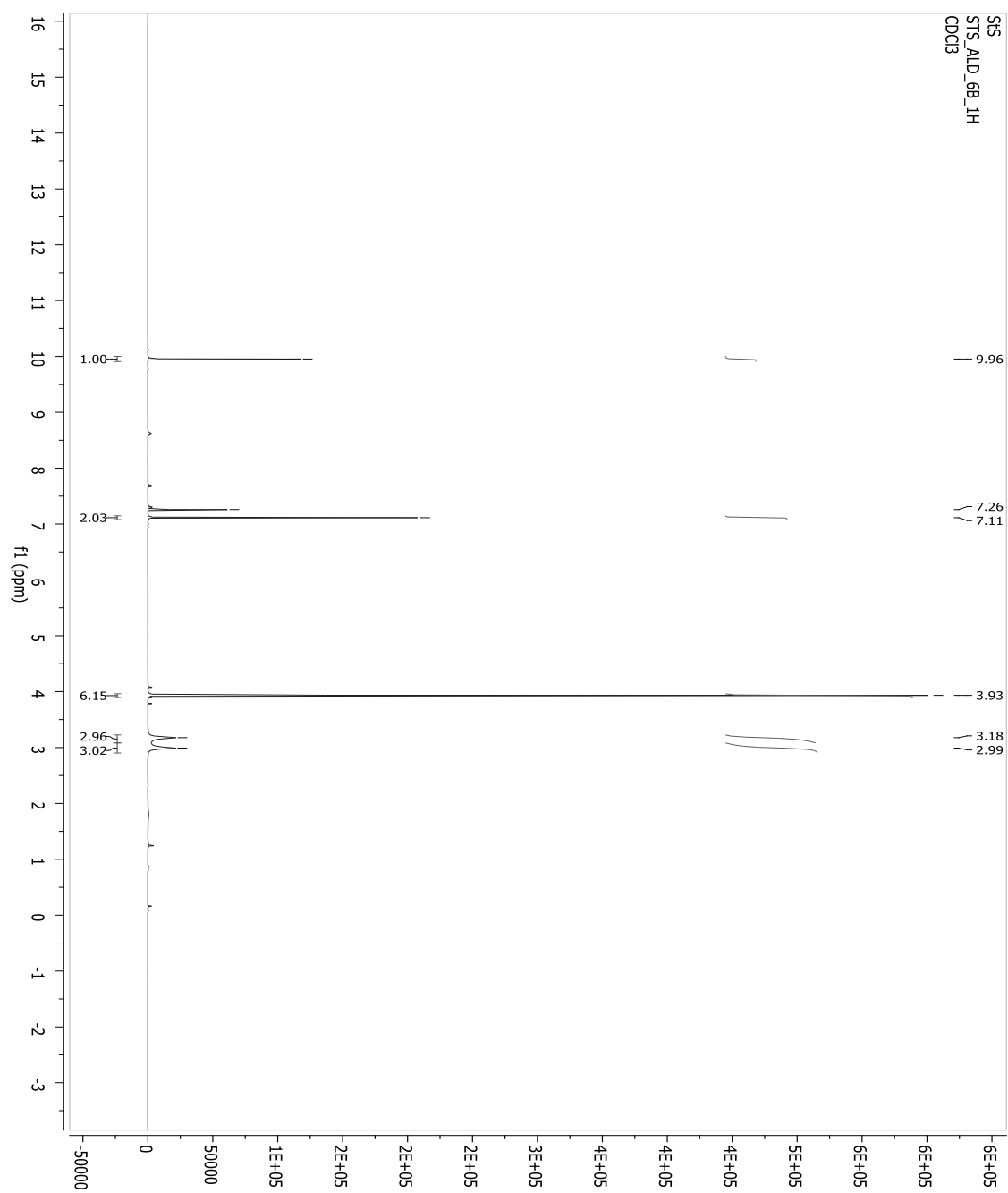
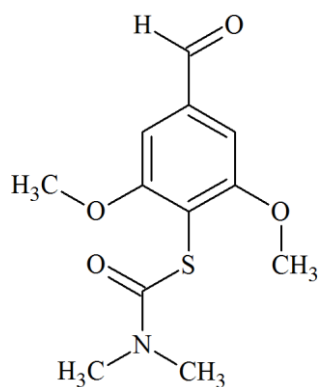


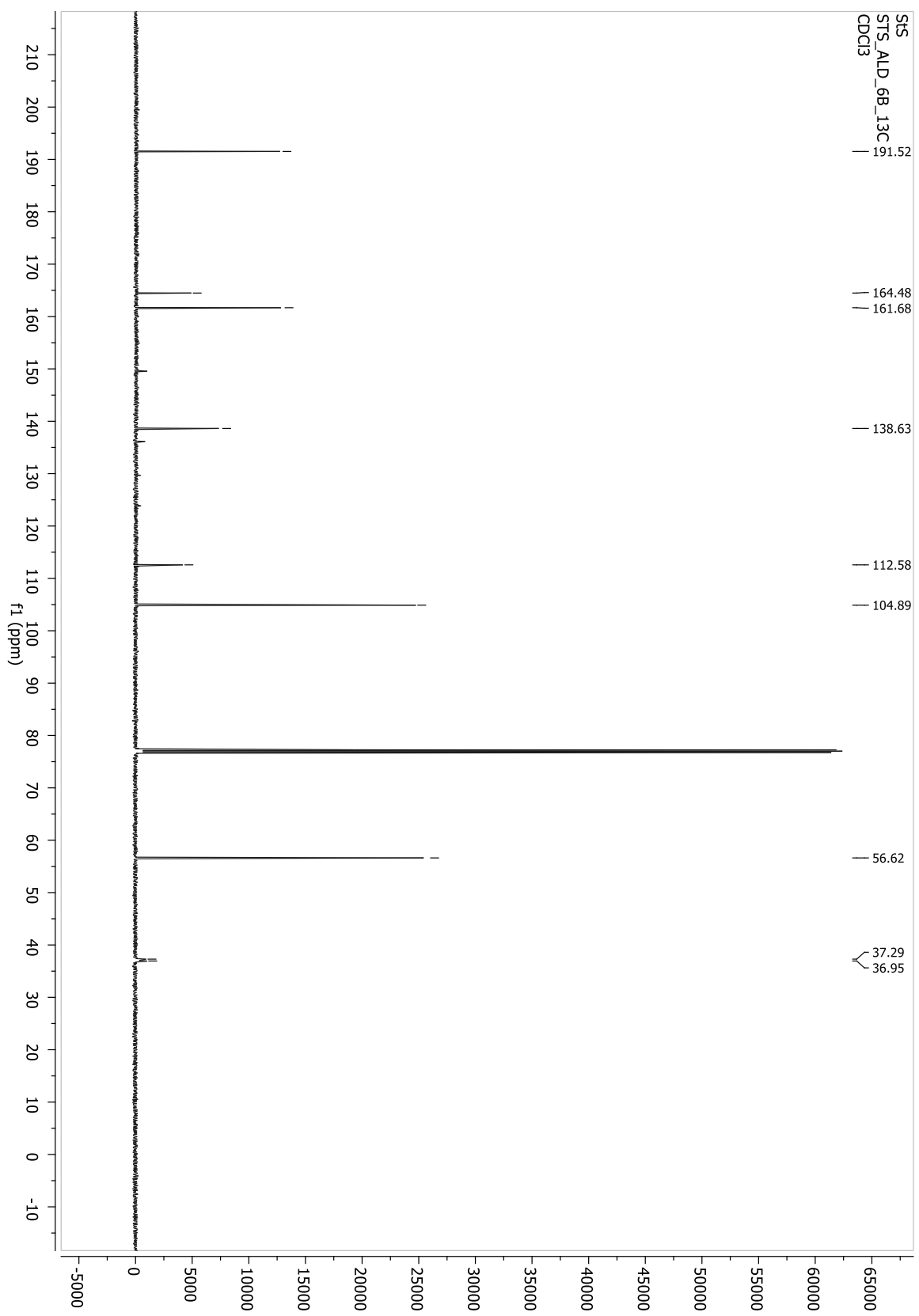
S-(4-formylo-2-metoksyfenylo)-*N,N*-dimetylkotiokarbaminian (Ald 3b)



S-(4-formylo-2-bromo-6-metoksyfenylo)-*N,N*-dimetylotiokarbaminian (Ald 4b)



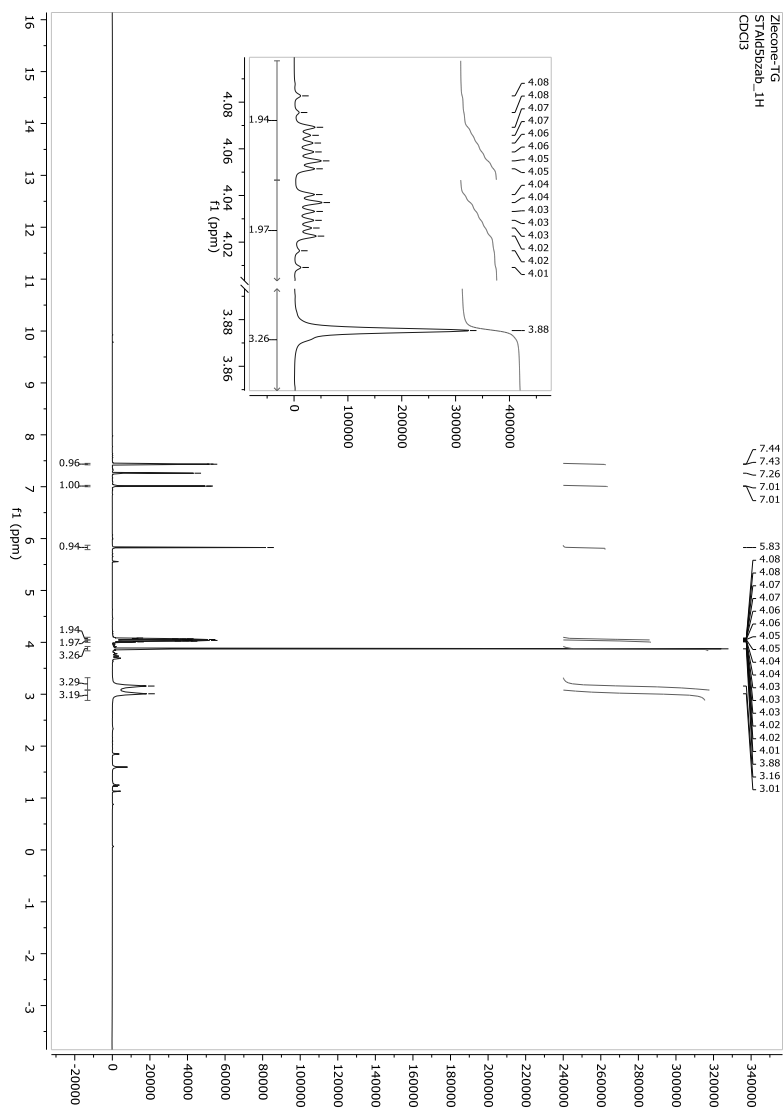
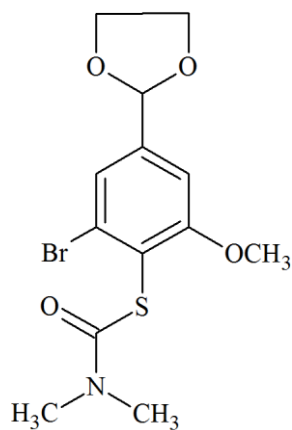
S-(4-formyl-2,6-dimetoksyfenylo)-*N,N*-dimetylotiokarbaminian (Ald 5b)

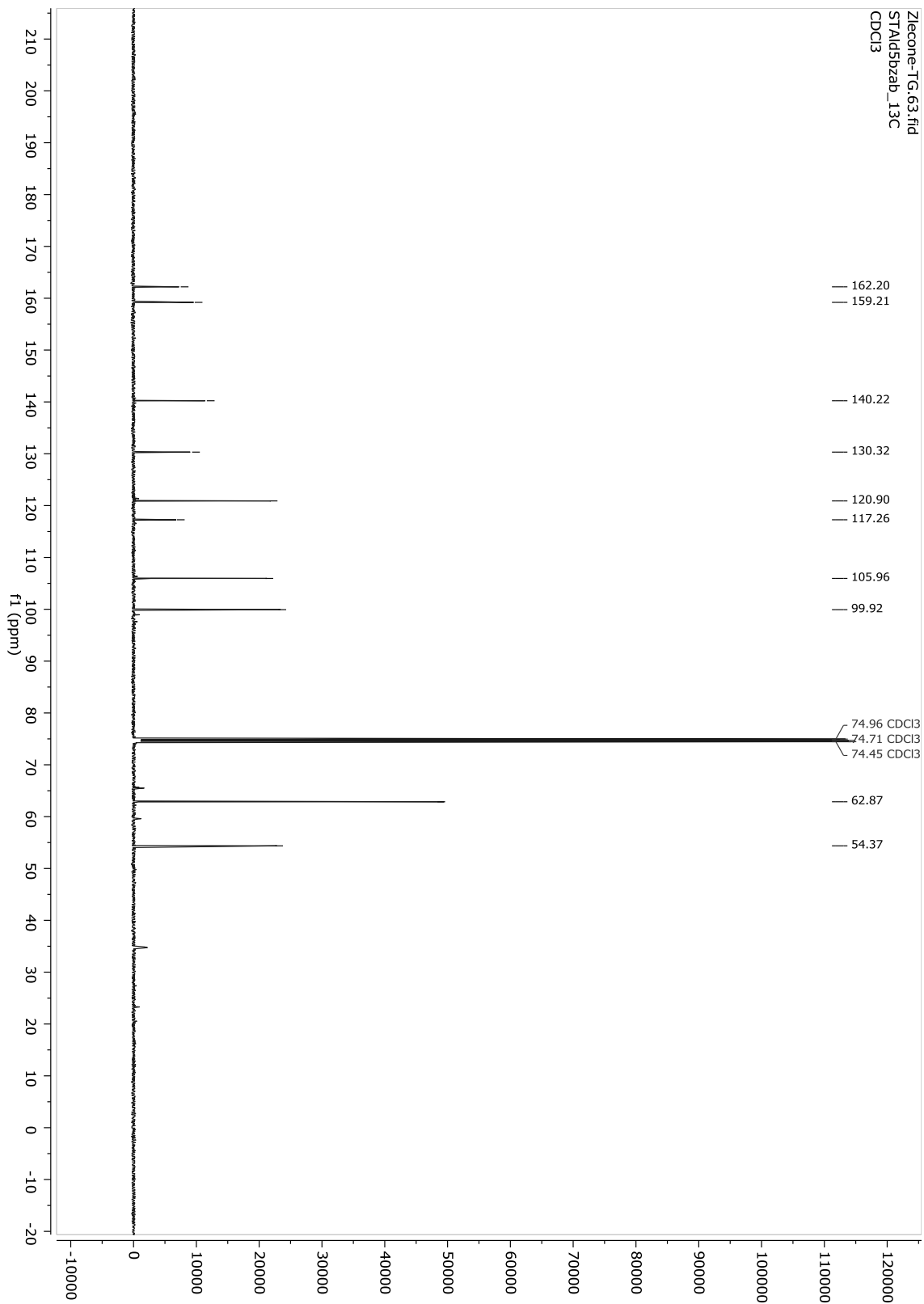


1,3-dioksolany S-tiokarbaminowych pochodnych benzaldehydów (Ald seria bzab)

S-[2-bromo-4-(1,3-dioksolano-2-yl)-6-metoksyfenylo]-*N,N*-dimetylotiokarbaminian

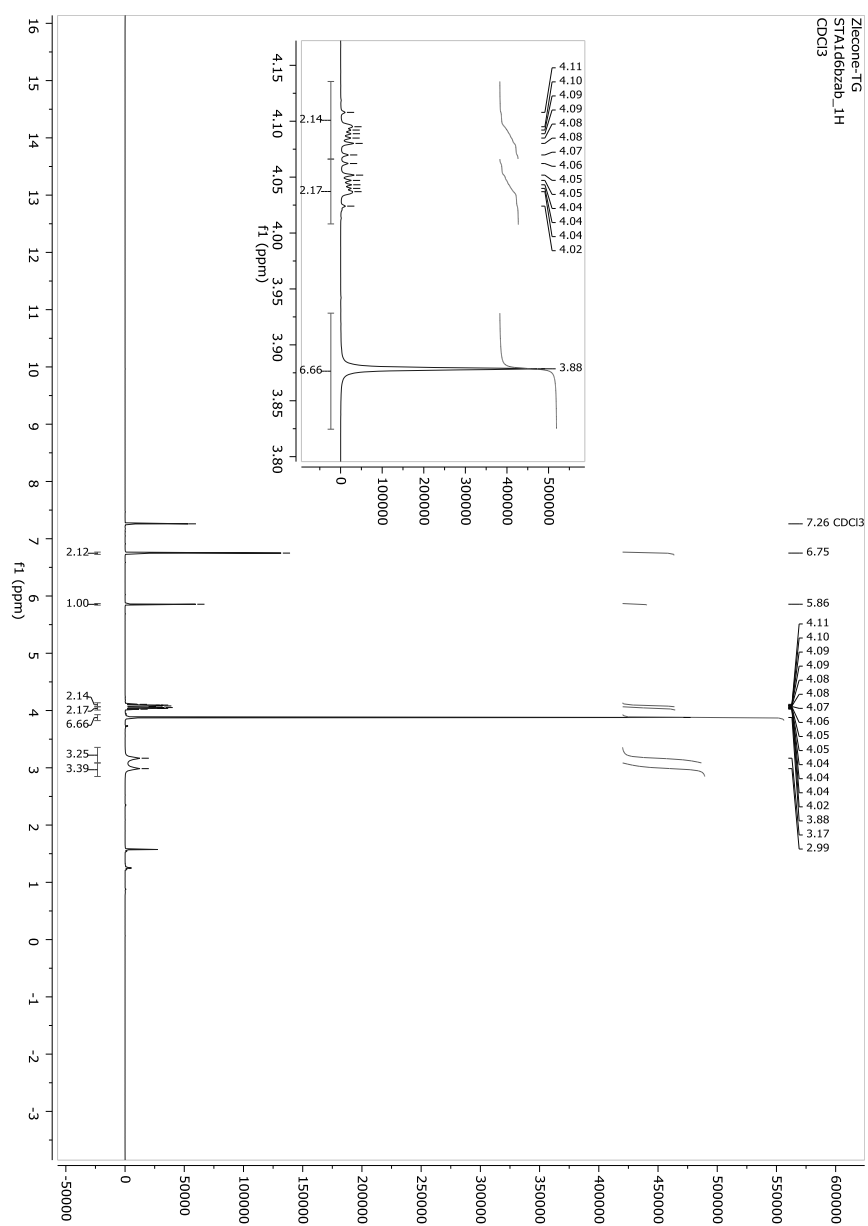
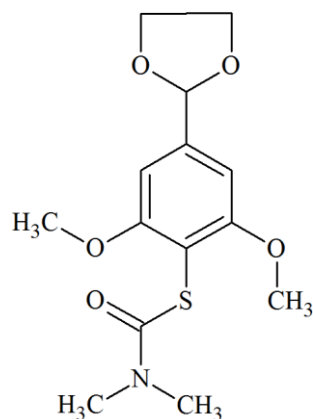
(Ald 4bzab)

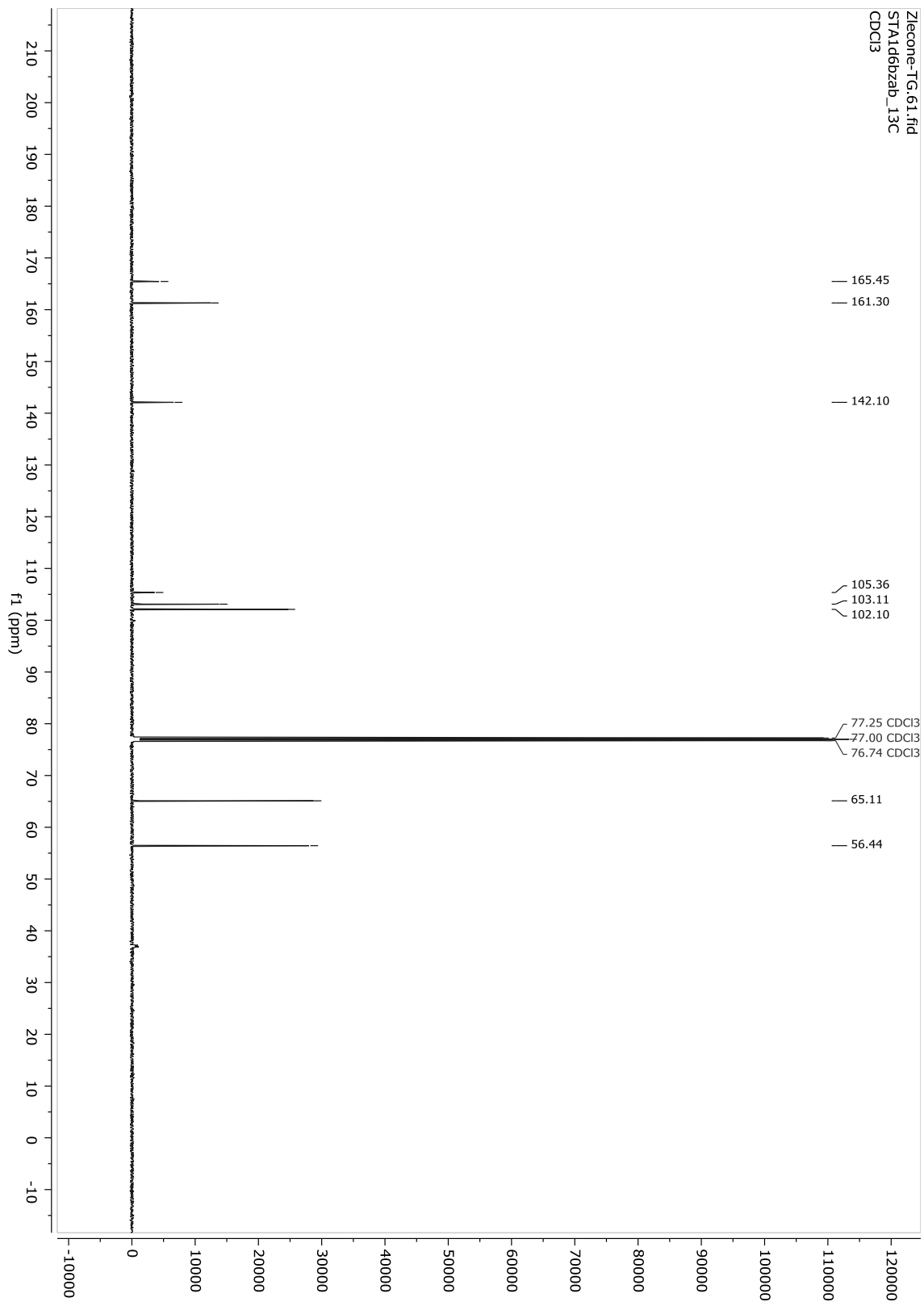




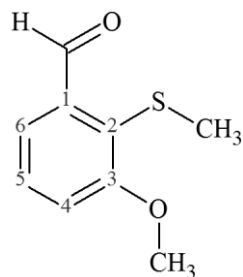
S-[4-(1,3-dioxolano-2-ylo)-2,6-dimetoksyfenylo]-*N,N*-dimetylotiokarbaminian

(Ald 5bzab)

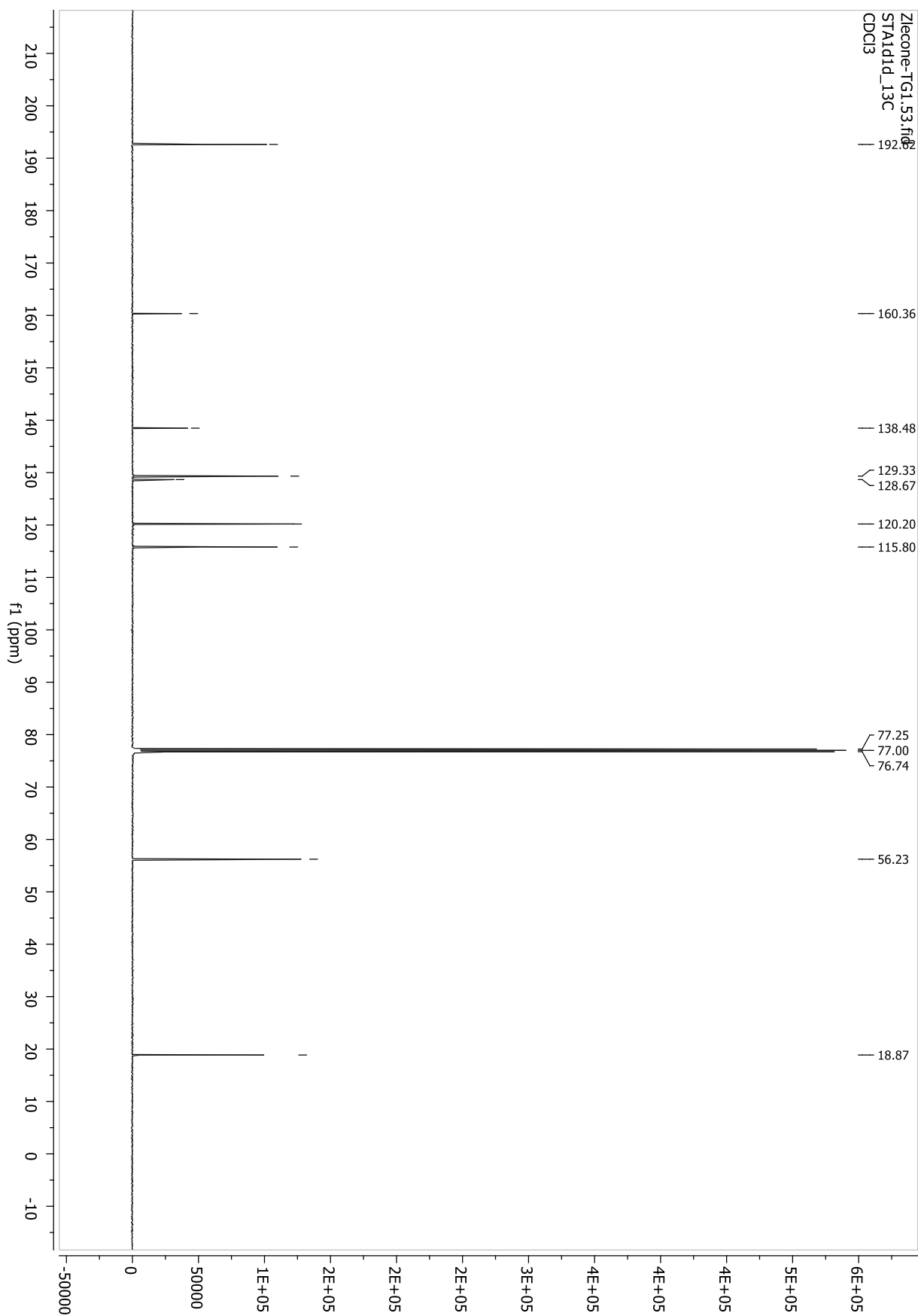


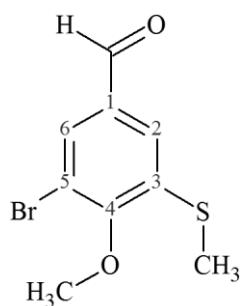


Metylotiobenzaldehyd (Ald seria d)

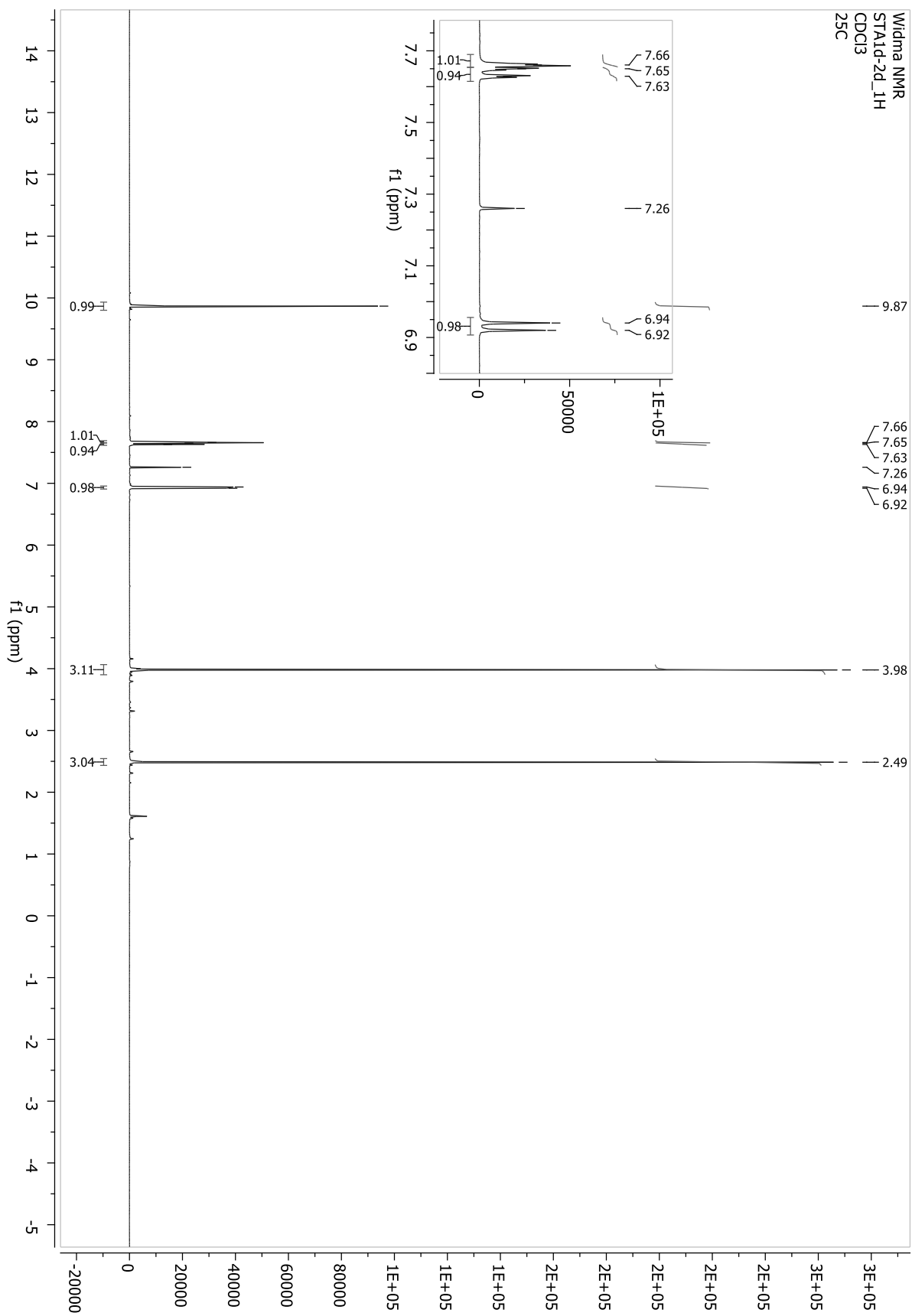
3-metoksy-2-metylotiobenzaldehyd (Ald 1d)

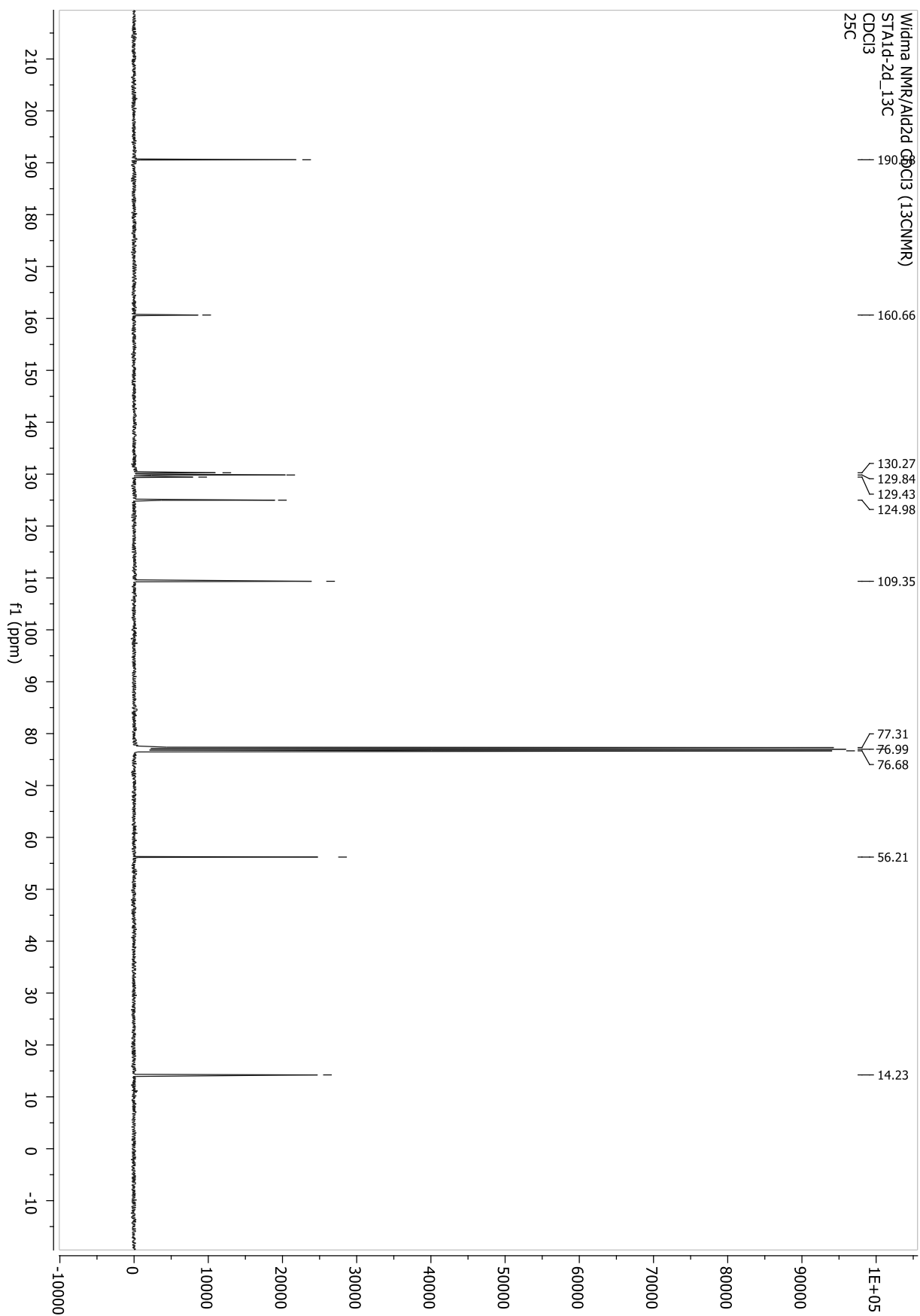
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	138.48
CHO	10.79 (s)	C-1-CHO	192.62
		C-2	128.67
SCH ₃	2.42 (s)	C-2-SCH ₃	18.87
		C-3	160.36
OCH ₃	3.97 (s)	C-3-OCH ₃	56.23
H-4	7.12 (d, 8.1)	C-4	115.80
H-5	7.4 (t, 7.9)	C-5	129.33
H-6	7.52 (d, 7.7)	C-6	120.20

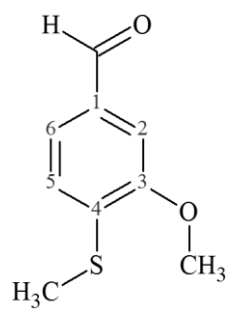


4-metoksy-3-metylotiobenzaldehyd (Ald 2d)

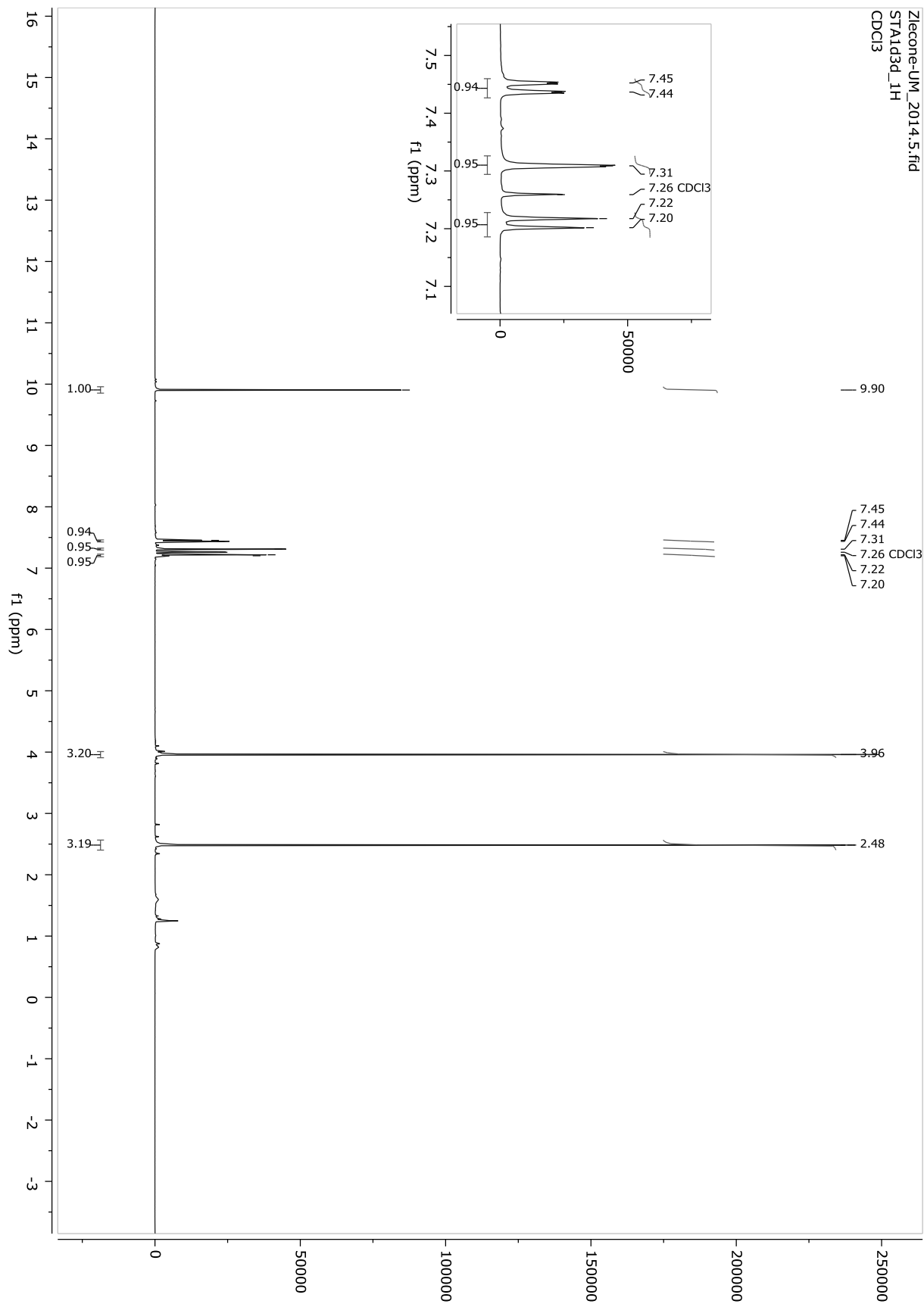
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	130.27
CHO	9.87 (s)	C-1-CHO	190.58
H-2	7.66 (s)	C-2	124.98
		C-3	129.43
SCH ₃	2.49 (s)	C-3-SCH ₃	14.23
		C-4	160.66
OCH ₃	3.98 (s)	C-4-OCH ₃	56.21
H-5	6.93 (d, 8.2)	C-5	109.35
H-6	7.64 (d, 8.4)	C-6	129.84

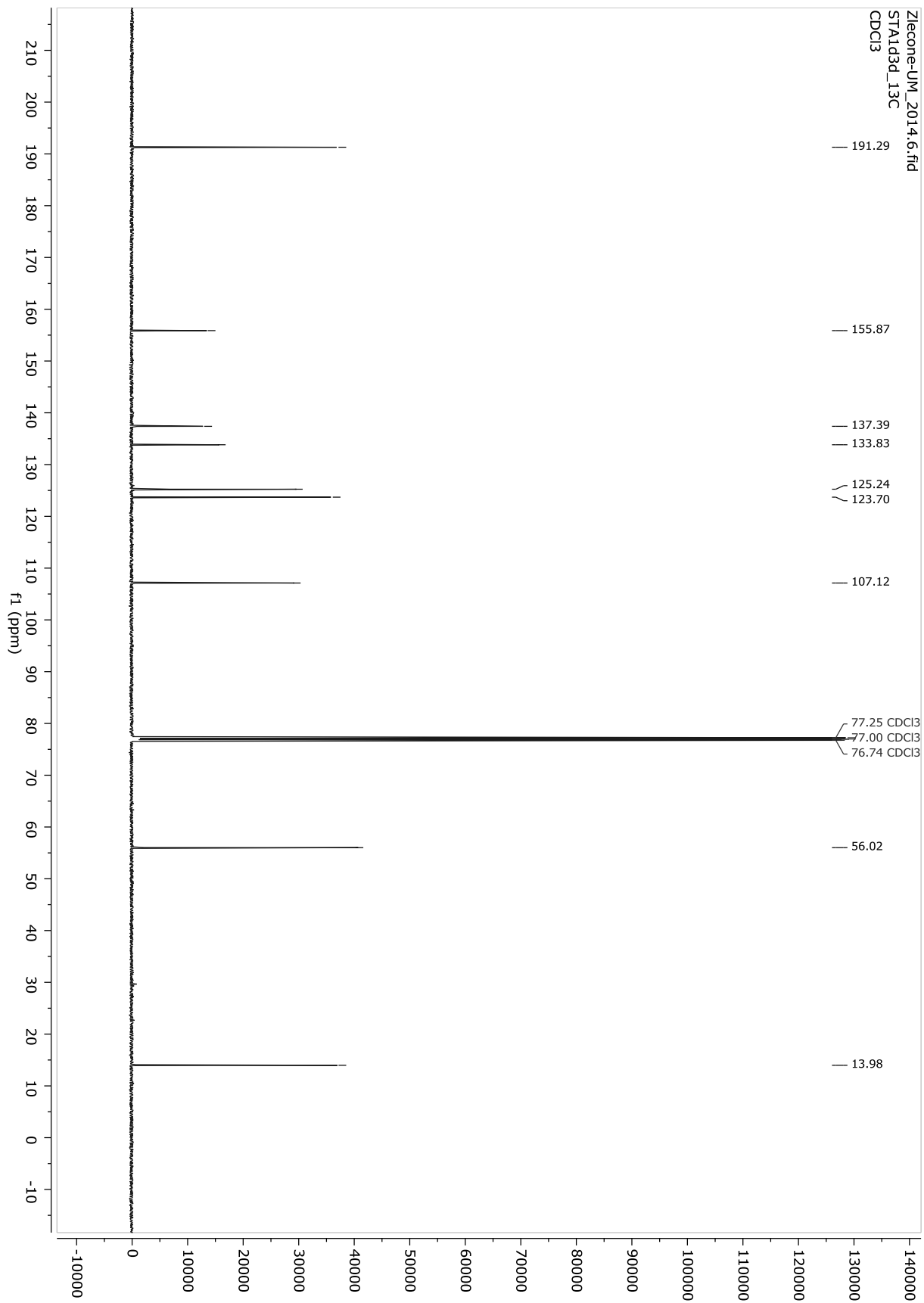


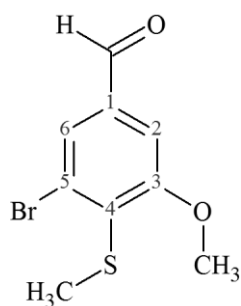


3-metoksy-4-metylotiobenzaldehyd (Ald 3d)

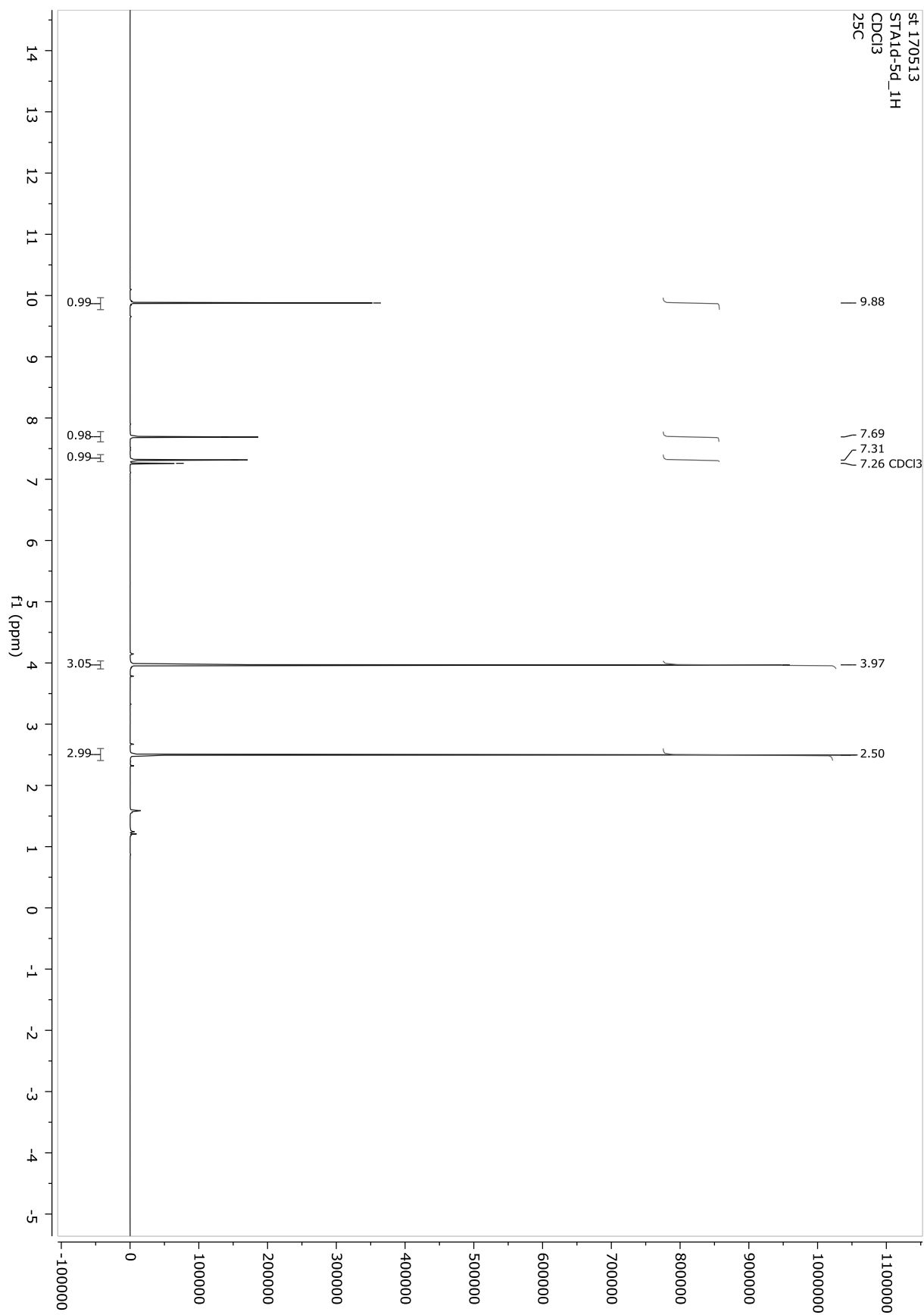
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	137.39
CHO	9.90 (s)	C-1-CHO	191.29
H-2	7.31 (s)	C-2	125.24
		C-3	155.87
OCH ₃	3.96 (s)	C-3-OCH ₃	56.02
		C-4	133.83
SCH ₃	2.48 (s)	C-4-SCH ₃	13.98
H-5	7.21 (d, 7.9)	C-5	107.12
H-6	7.44 (d, 7.9)	C-6	123.70

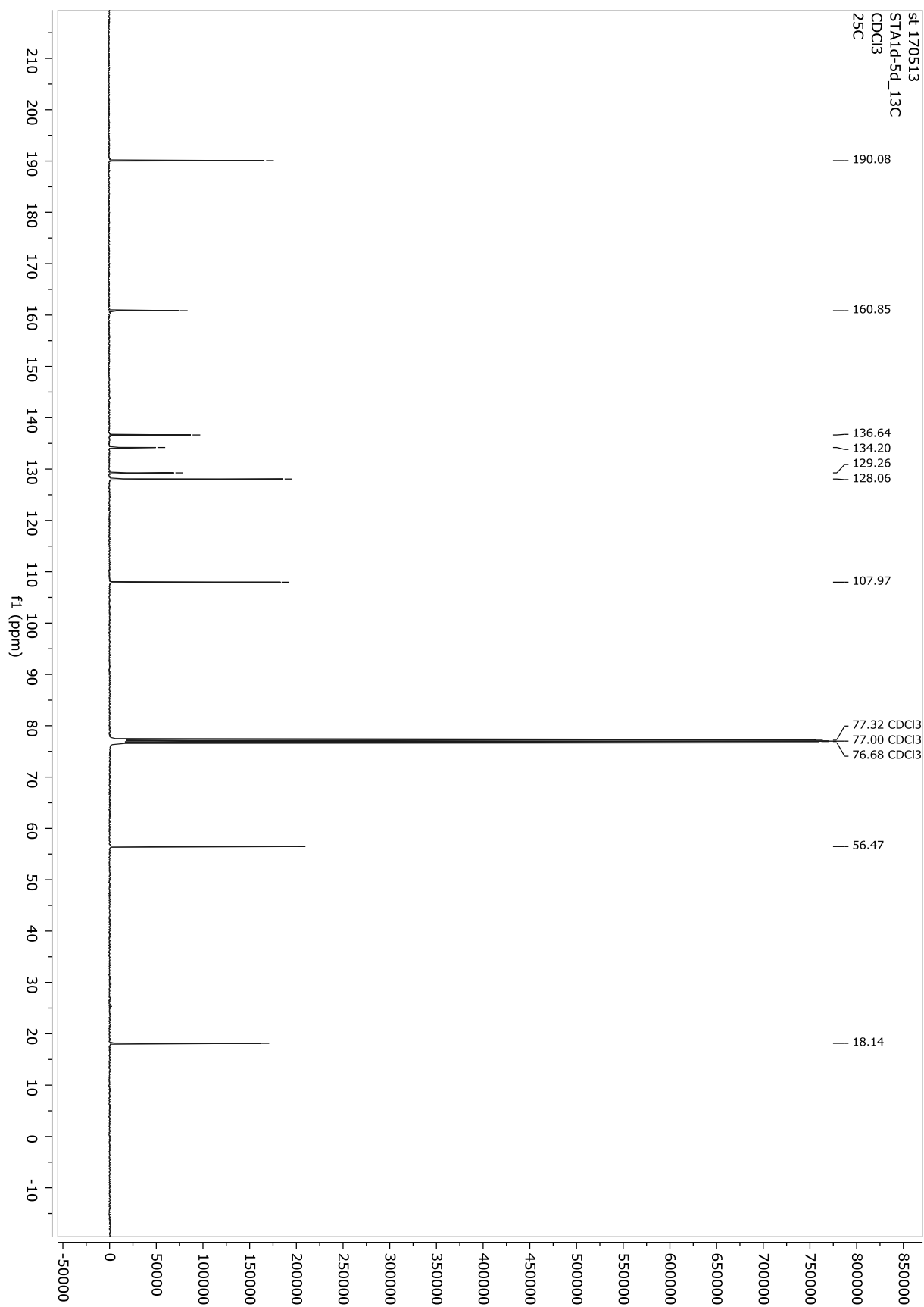


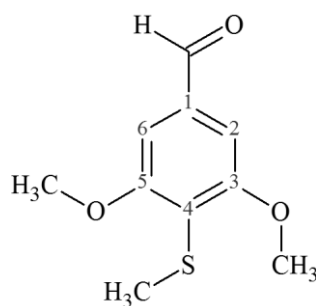


5-bromo-3-metoksy-4-metylotiobenzaldehyd (Ald 4d)

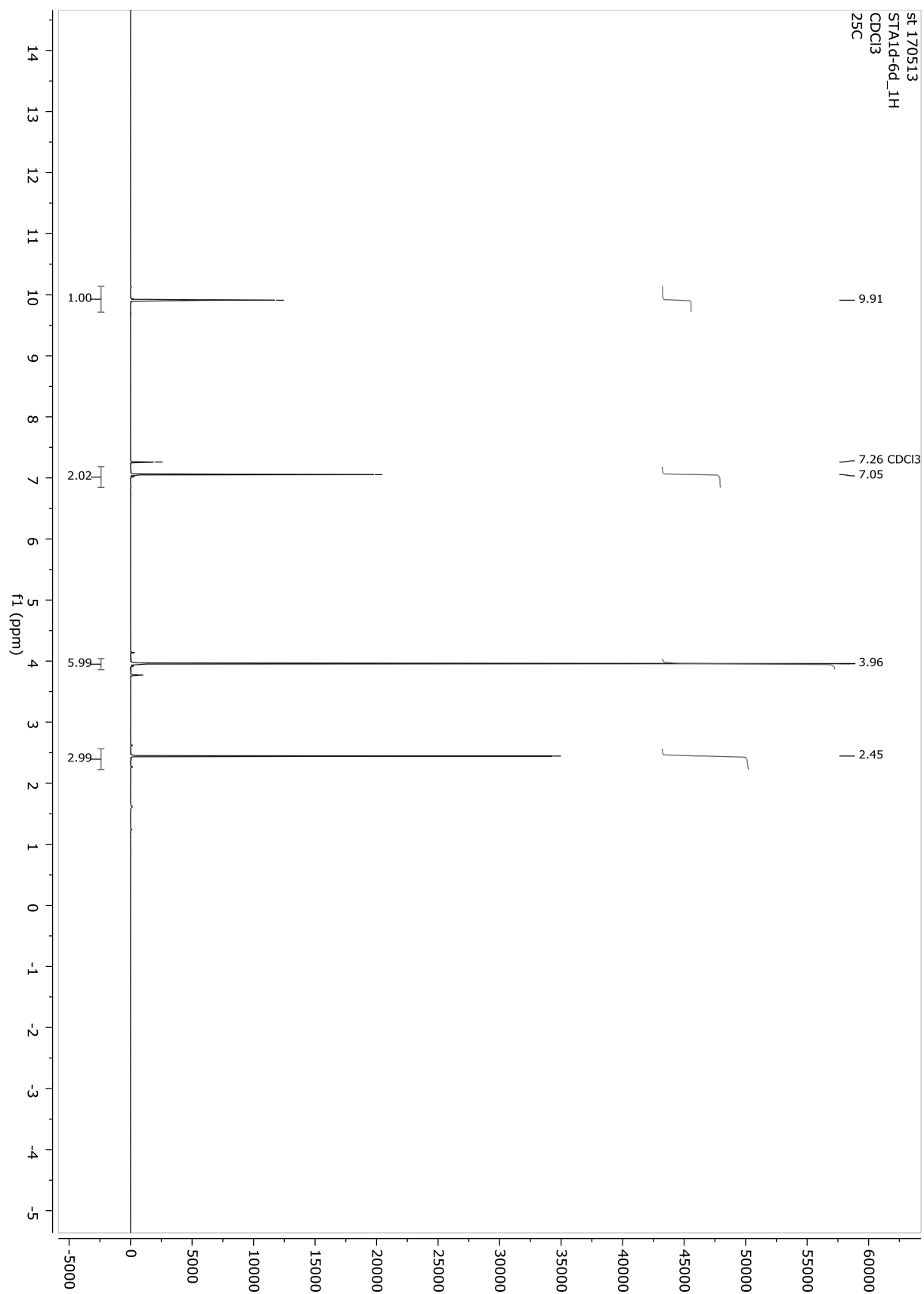
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	134.20
CHO	9.88 (s)	C-1-CHO	190.08
H-2	7.31 (s)	C-2	107.96
		C-3	160.85
OCH ₃	3.97 (s)	C-3-OCH ₃	56.47
		C-4	129.27
SCH ₃	2.50 (s)	C-4-SCH ₃	18.14
		C-5	136.64
H-6	7.69 (s)	C-6	128.06

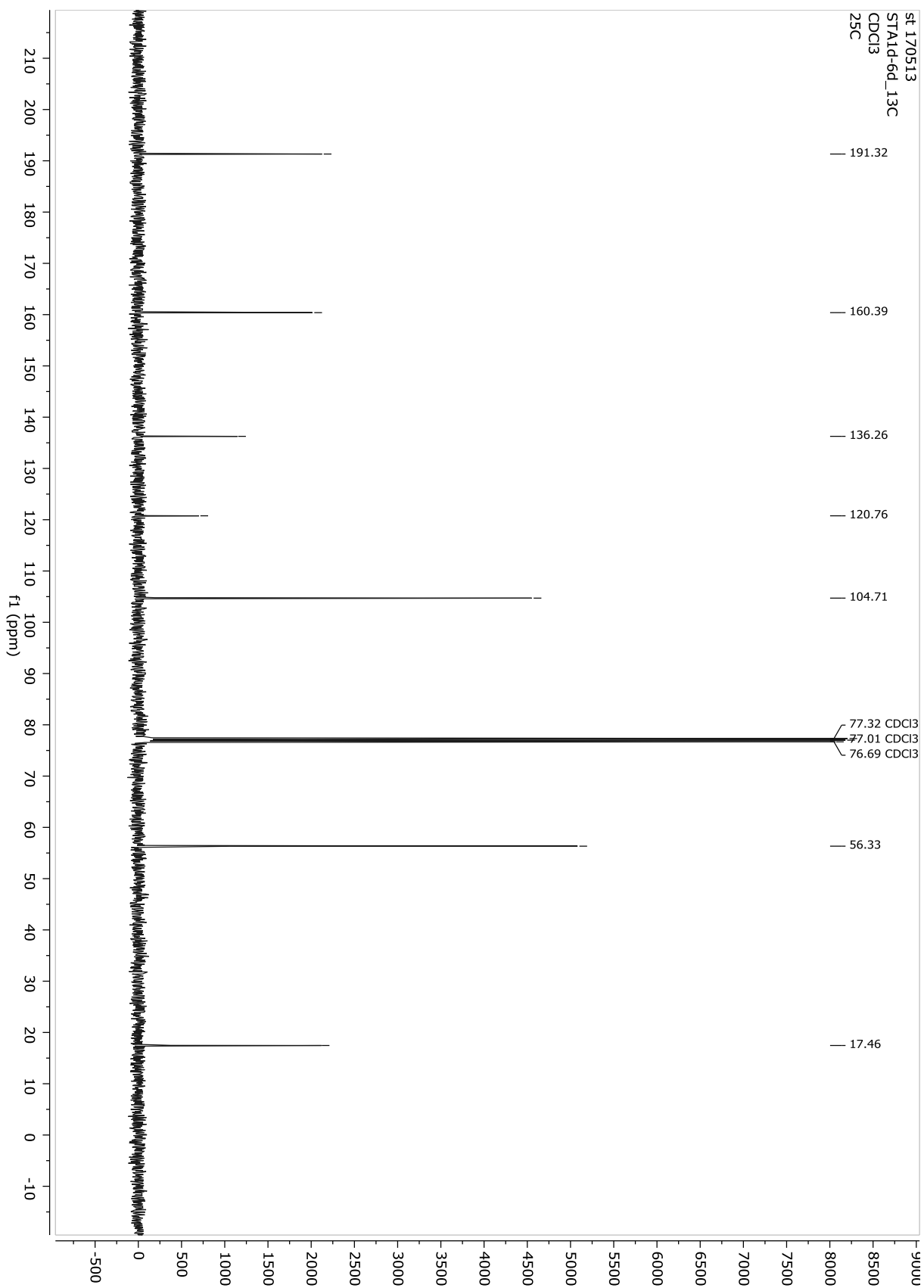




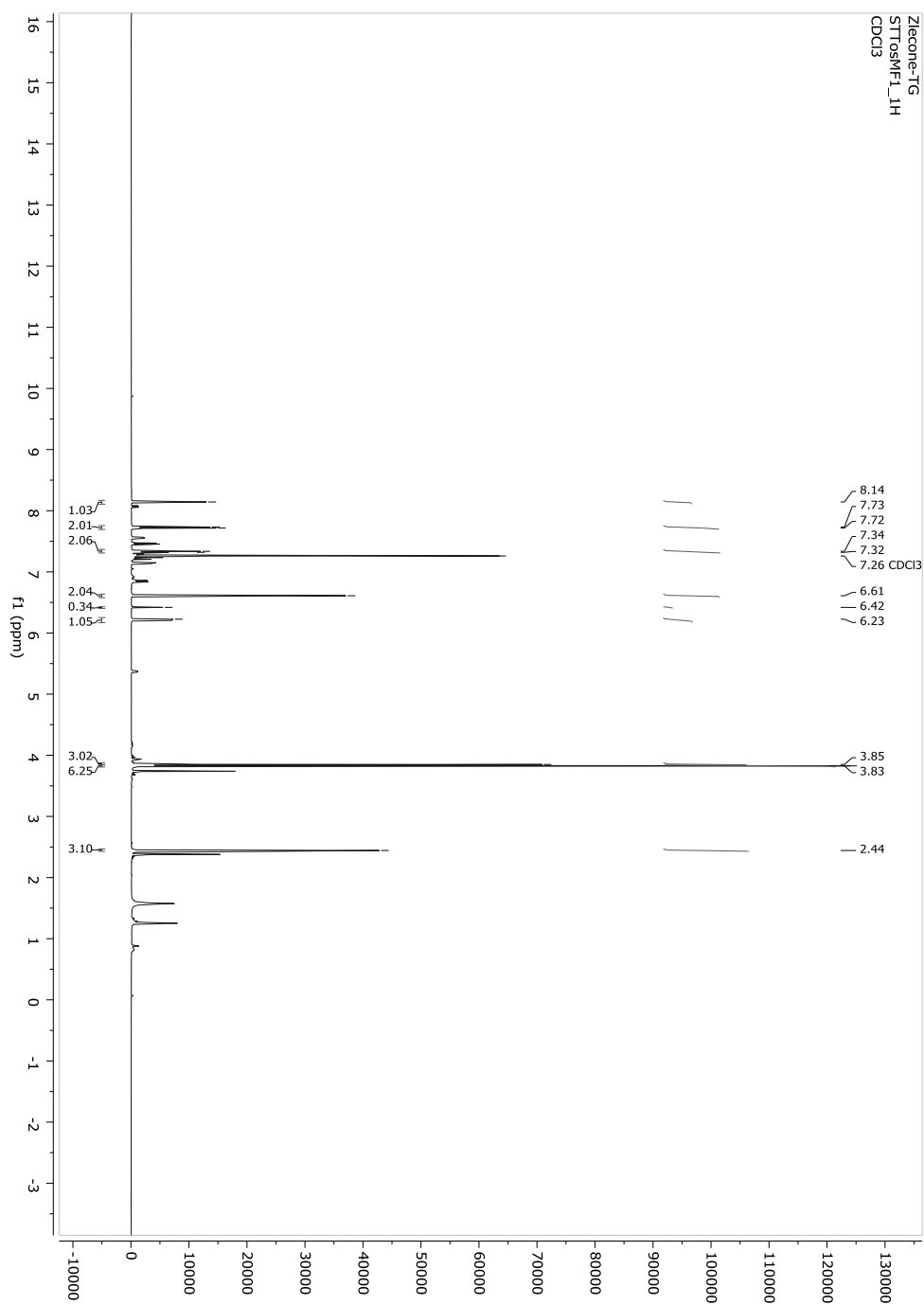
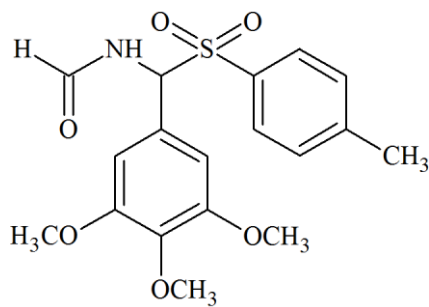
3,5-dimetoksy-4-metylotiobenzaldehyd (Ald 5d)

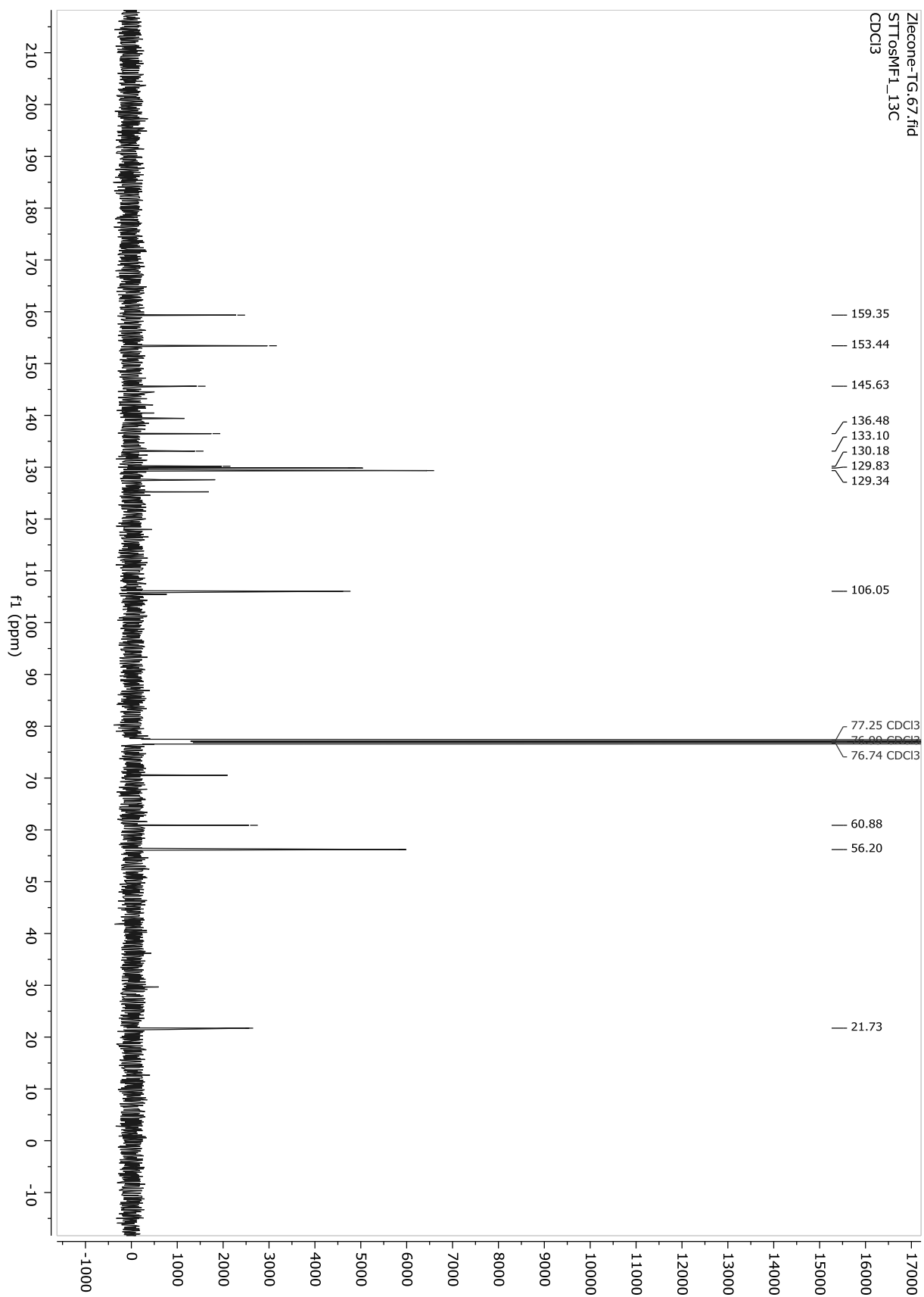
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	136.26
CHO	9.91 (s)	C-1-CHO	191.32
H-2, H-6	7.05 (s)	C-2, C-6	104.71
		C-3, C-5	160.39
OCH ₃	3.96 (s)	C-3-OCH ₃	56.33
OCH ₃		C-5-OCH ₃ ,	
		C-4	120.76
SCH ₃	2.45 (s)	C-4-SCH ₃	17.46

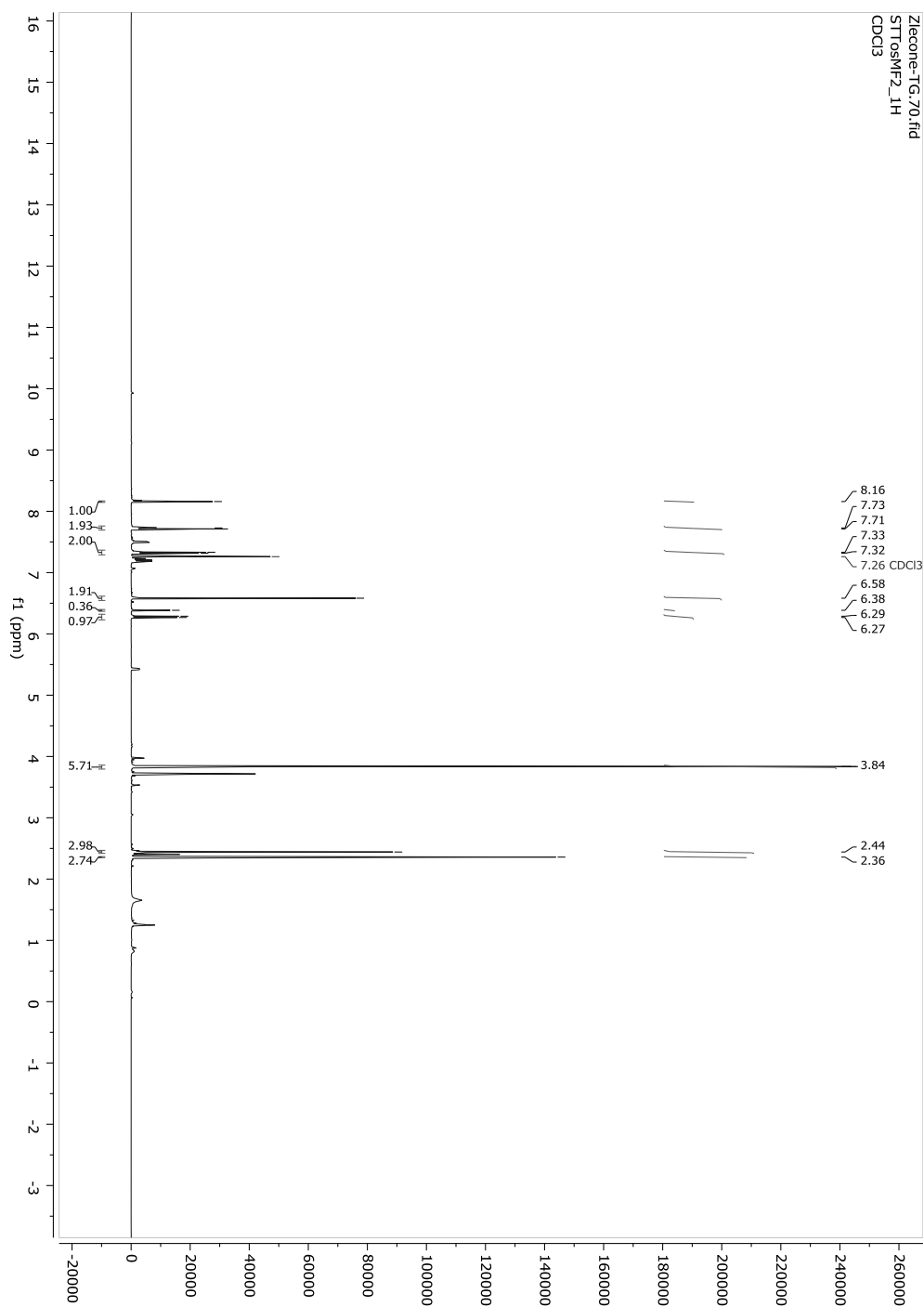
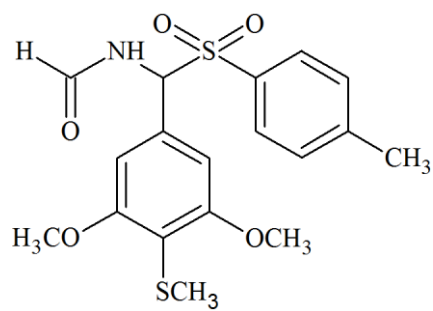


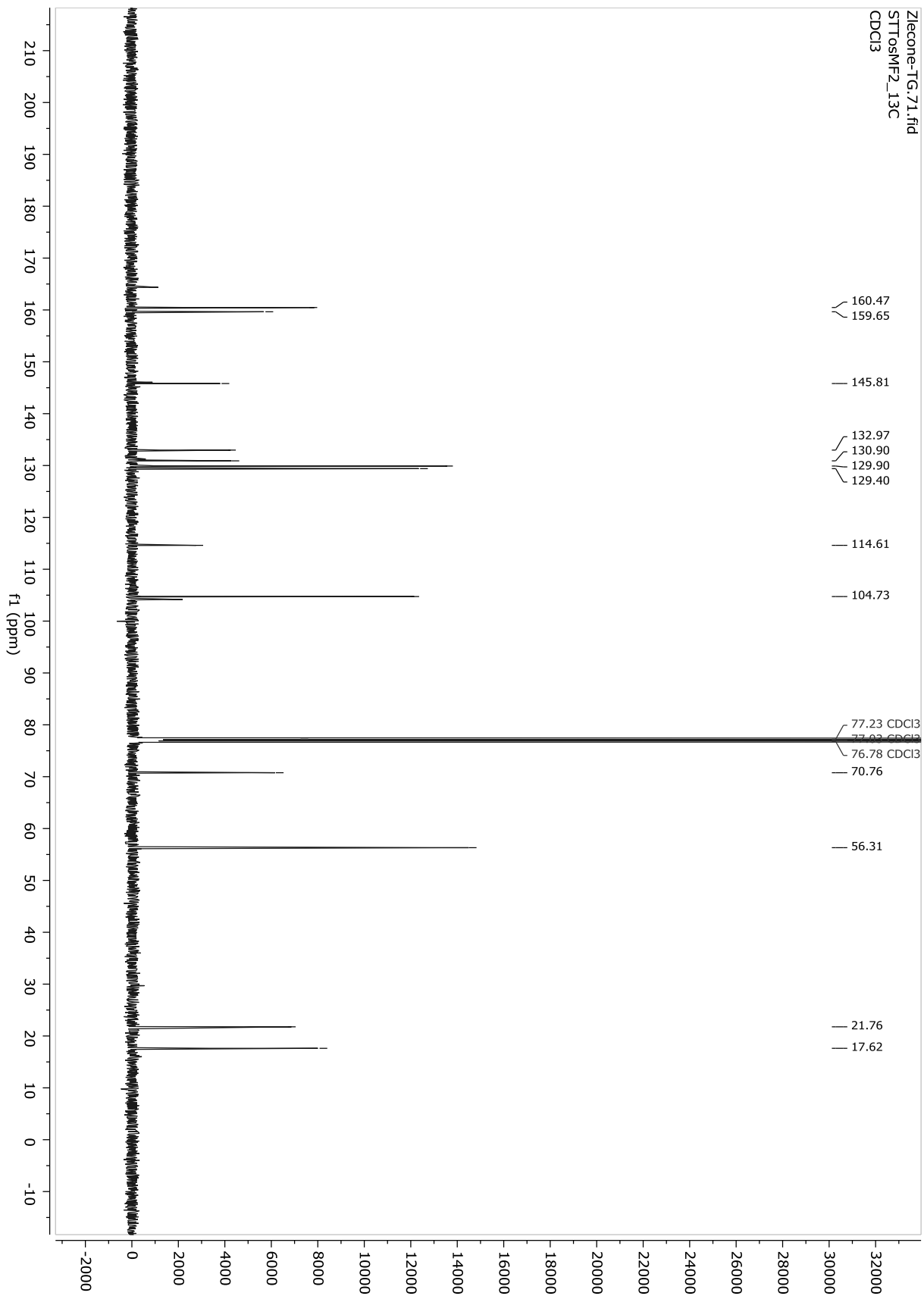


Tosylometylo formamidy (TosMF)

N-[(tolueno-4-sulfonyl)-(3,4,5-trimetoksyfenylo)metylo]formamid (TosMF1)

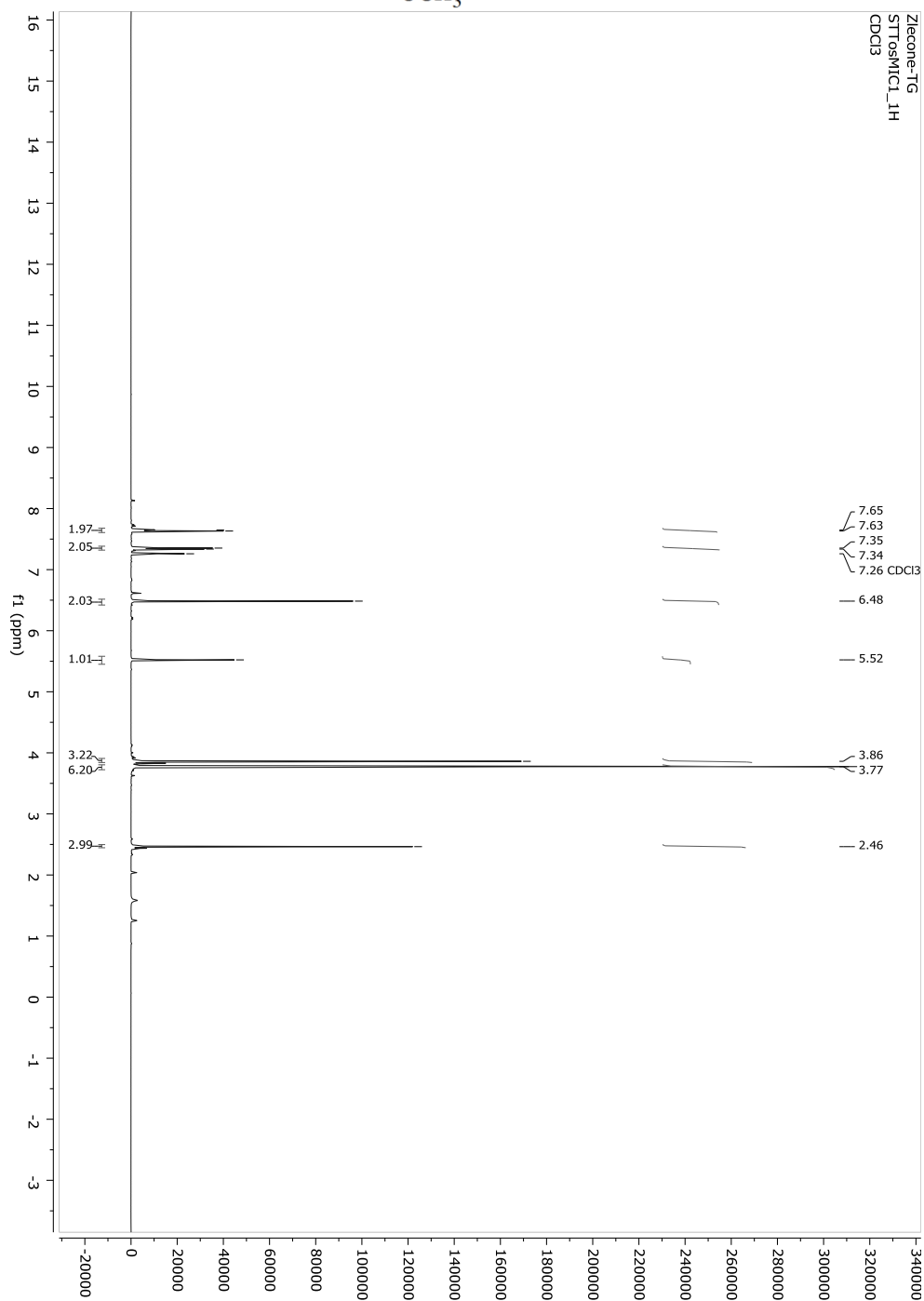
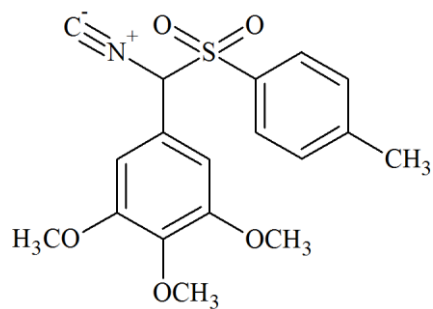


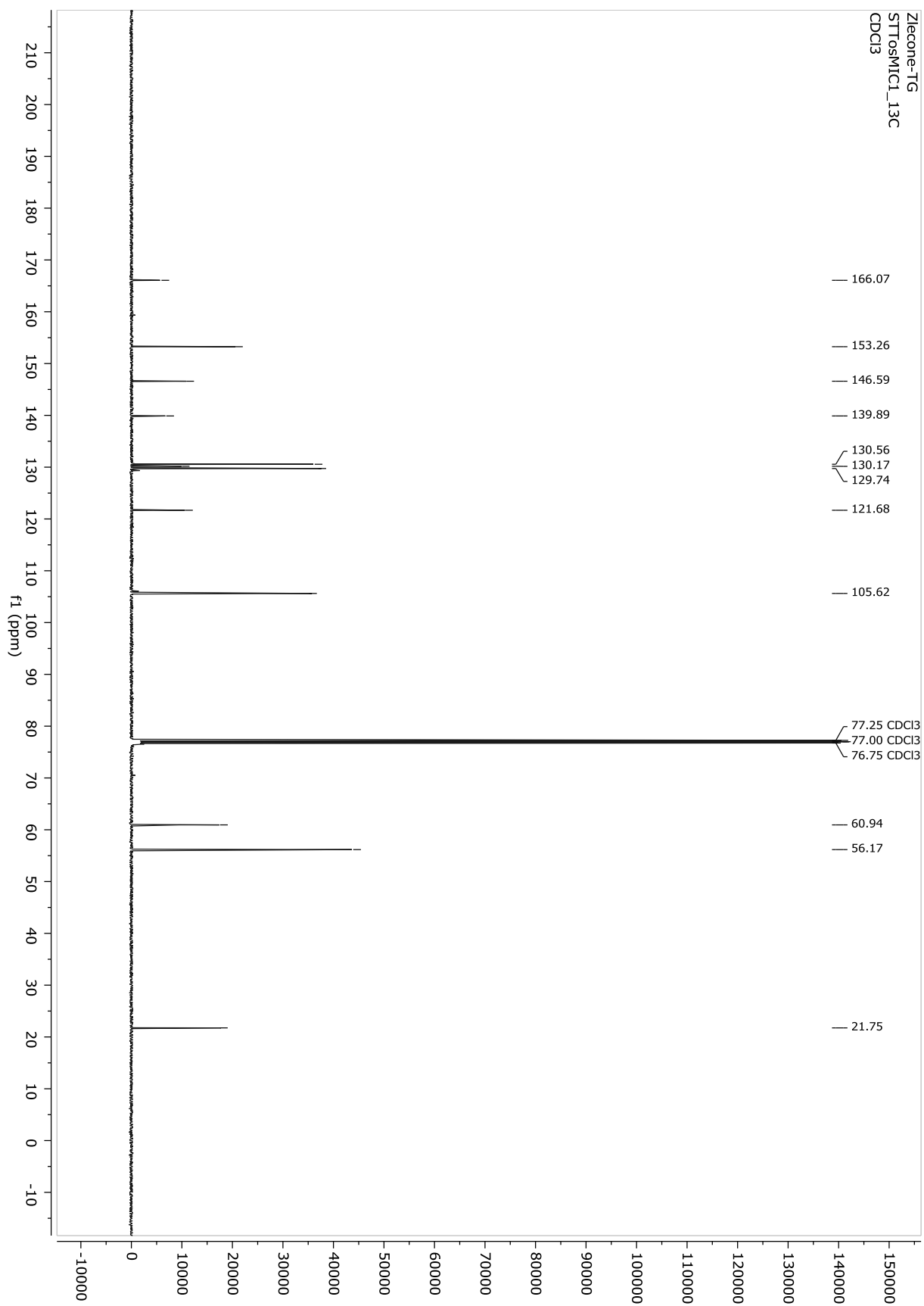
N-[(tolueno-4-sulfonylo)-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)metylo]formamid*(TosMF2)*

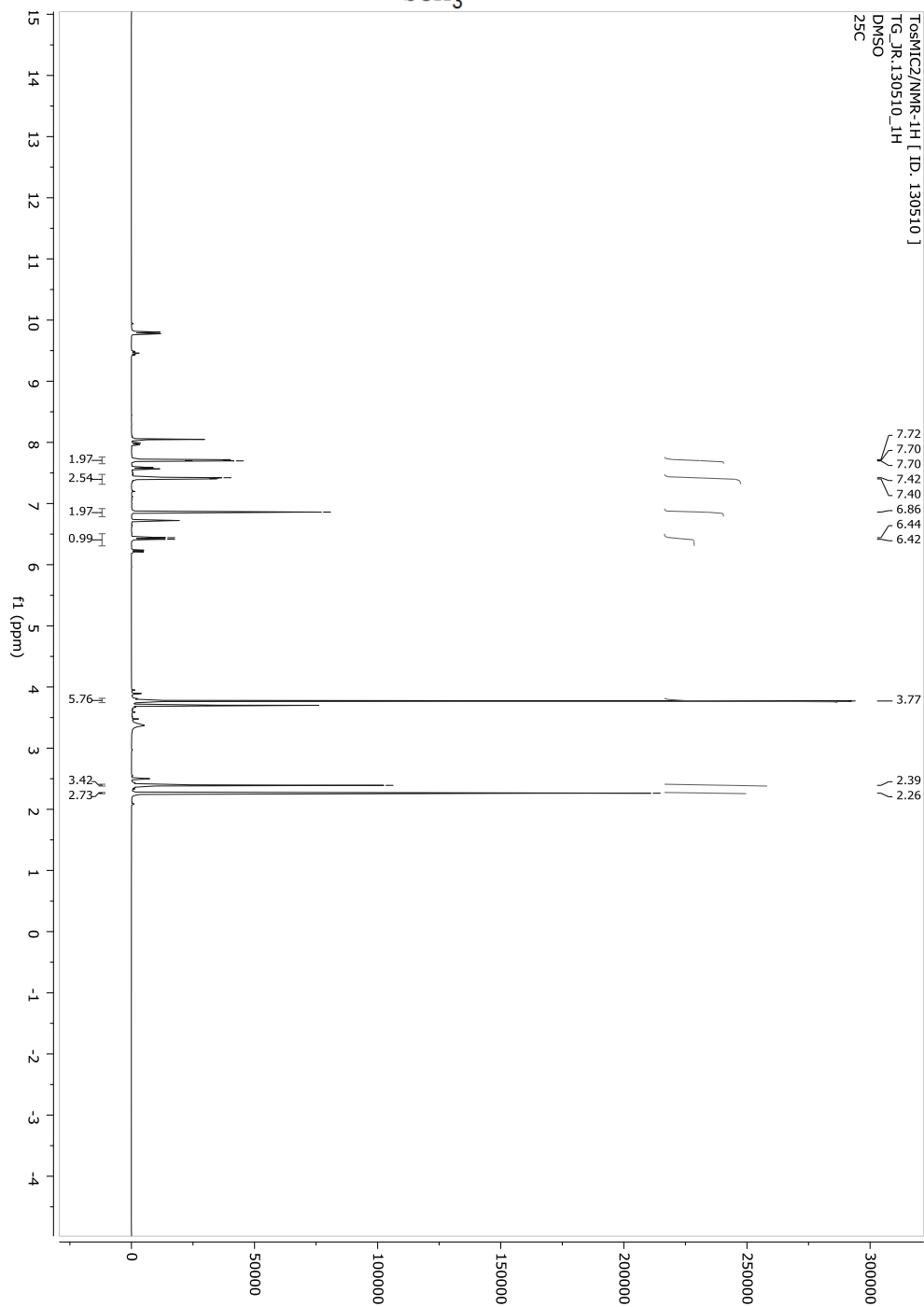
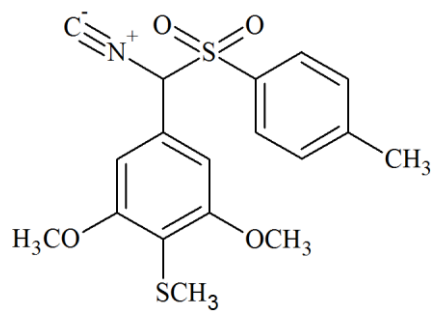


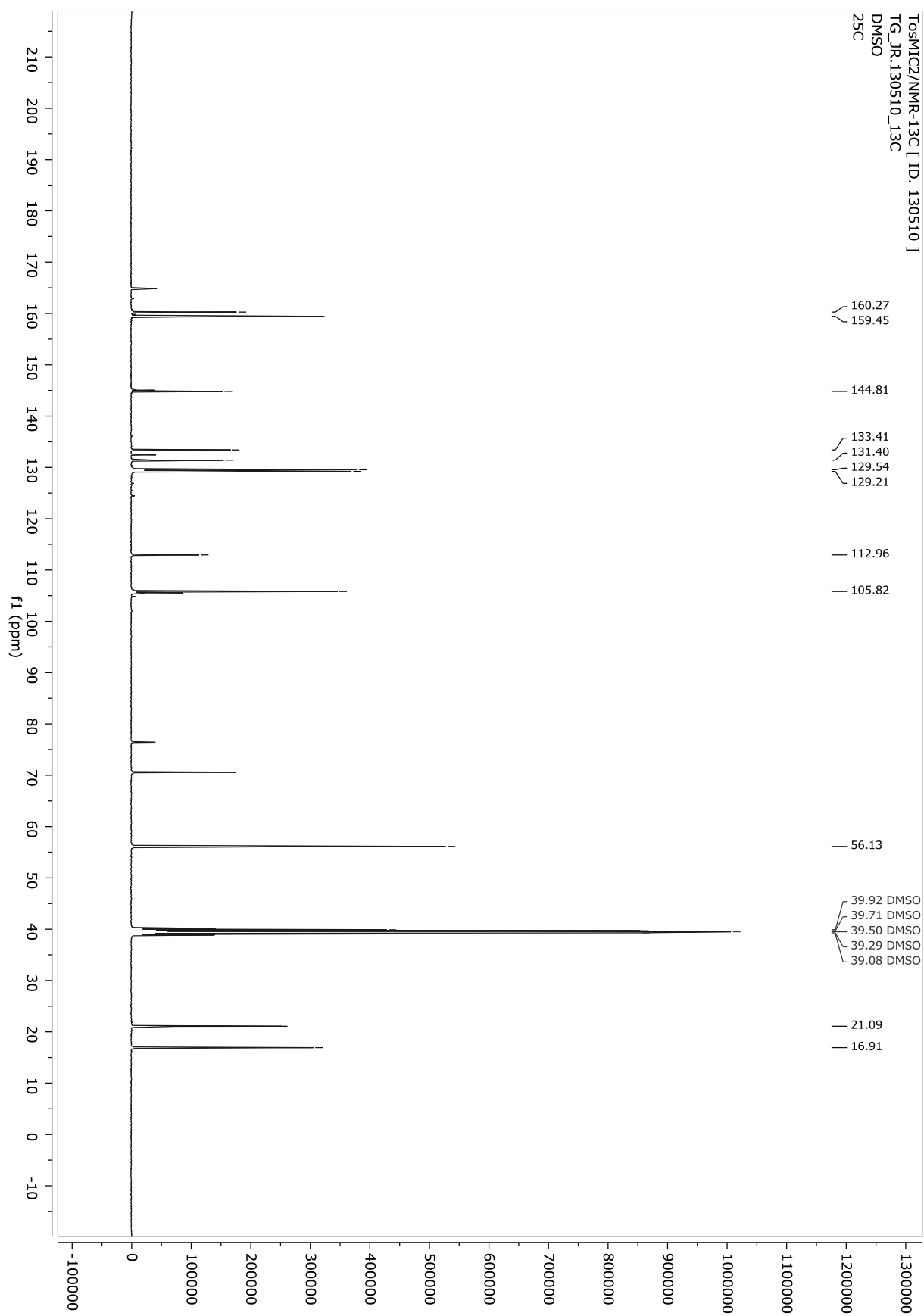
Tosylometylo izocyjanki (TosMIC)

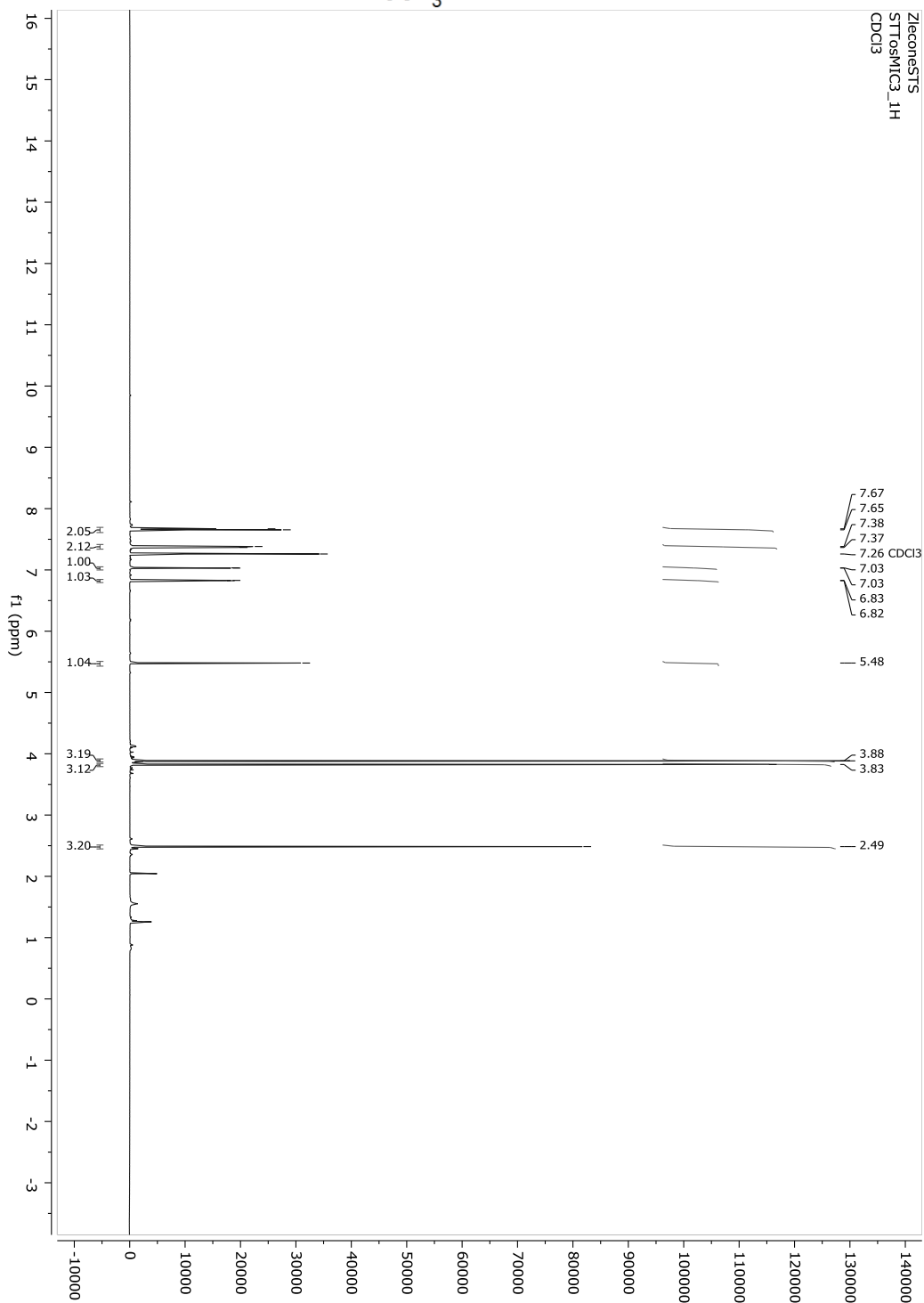
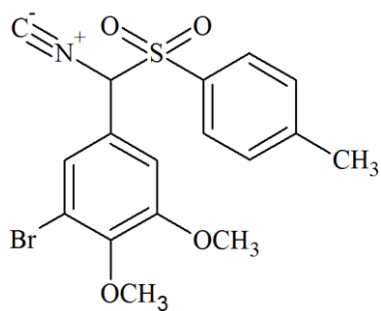
3,4,5-trimetoksyfenylo(tosylo)metylo izocyjanek (TosMIC1)

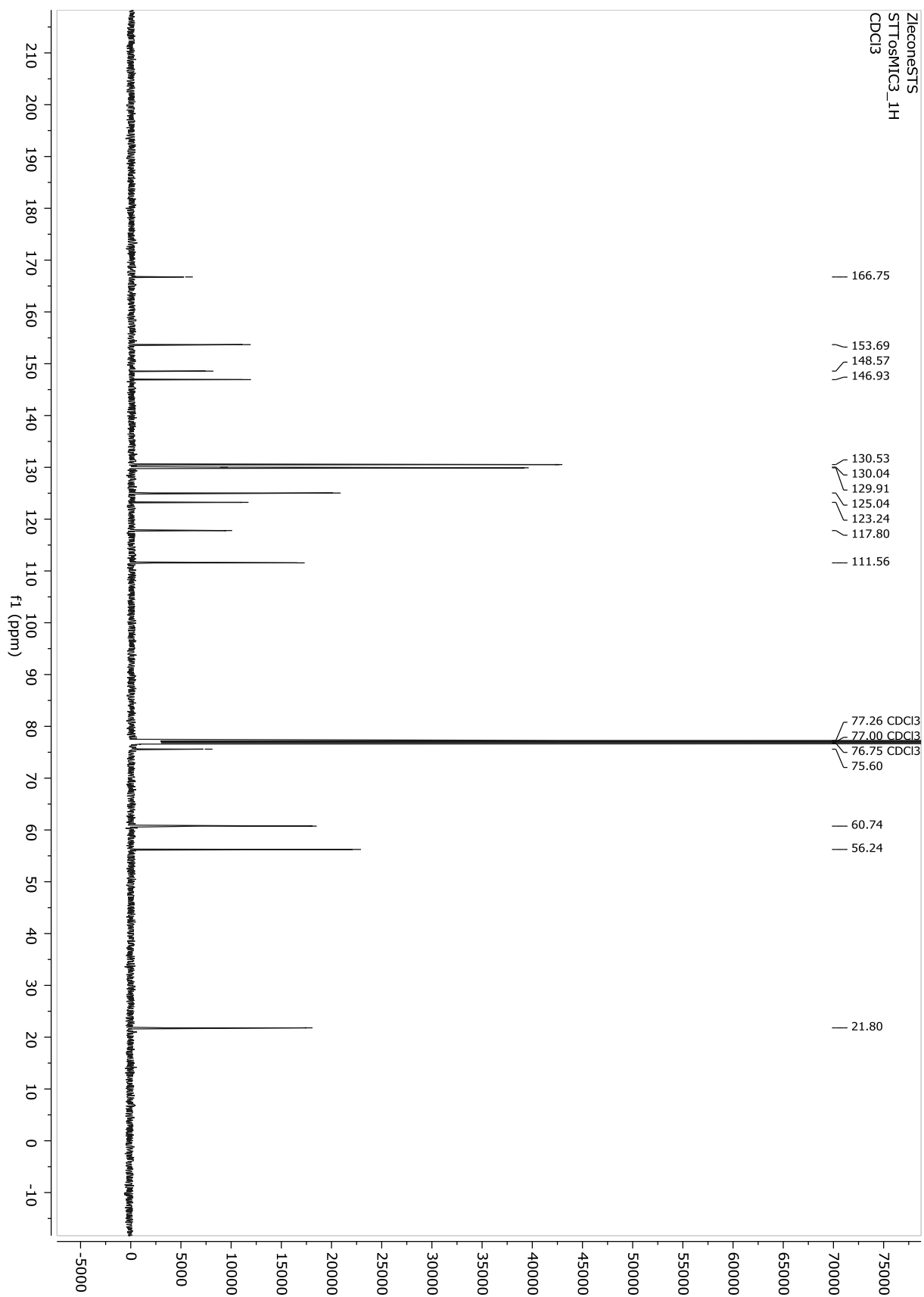


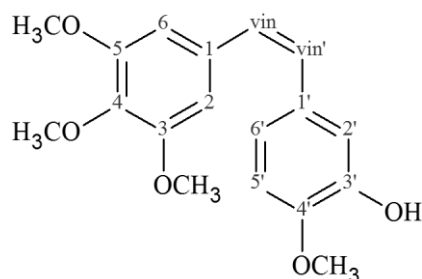


3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo(tosylo)metylo izocyjanek (TosMIC2)

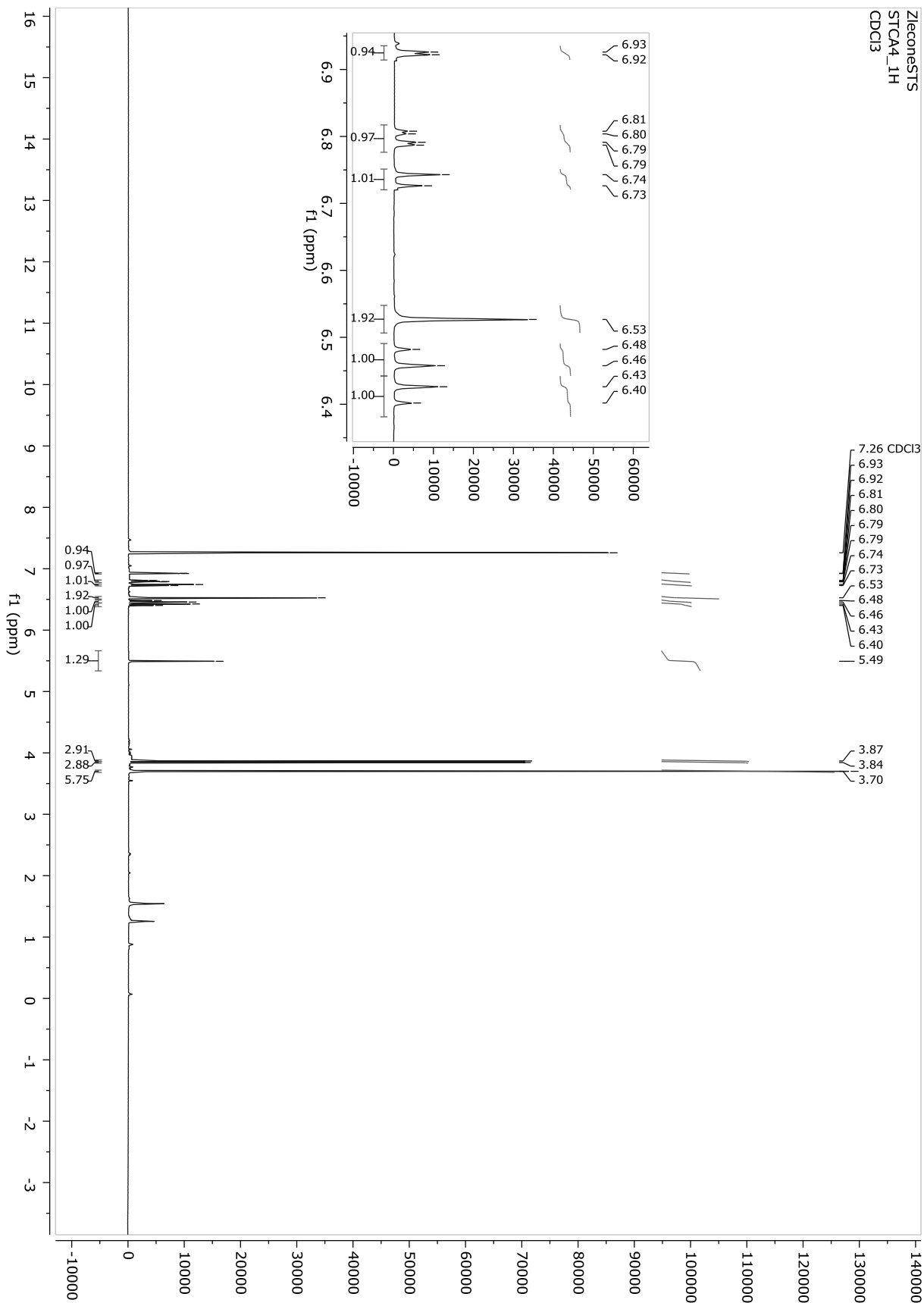


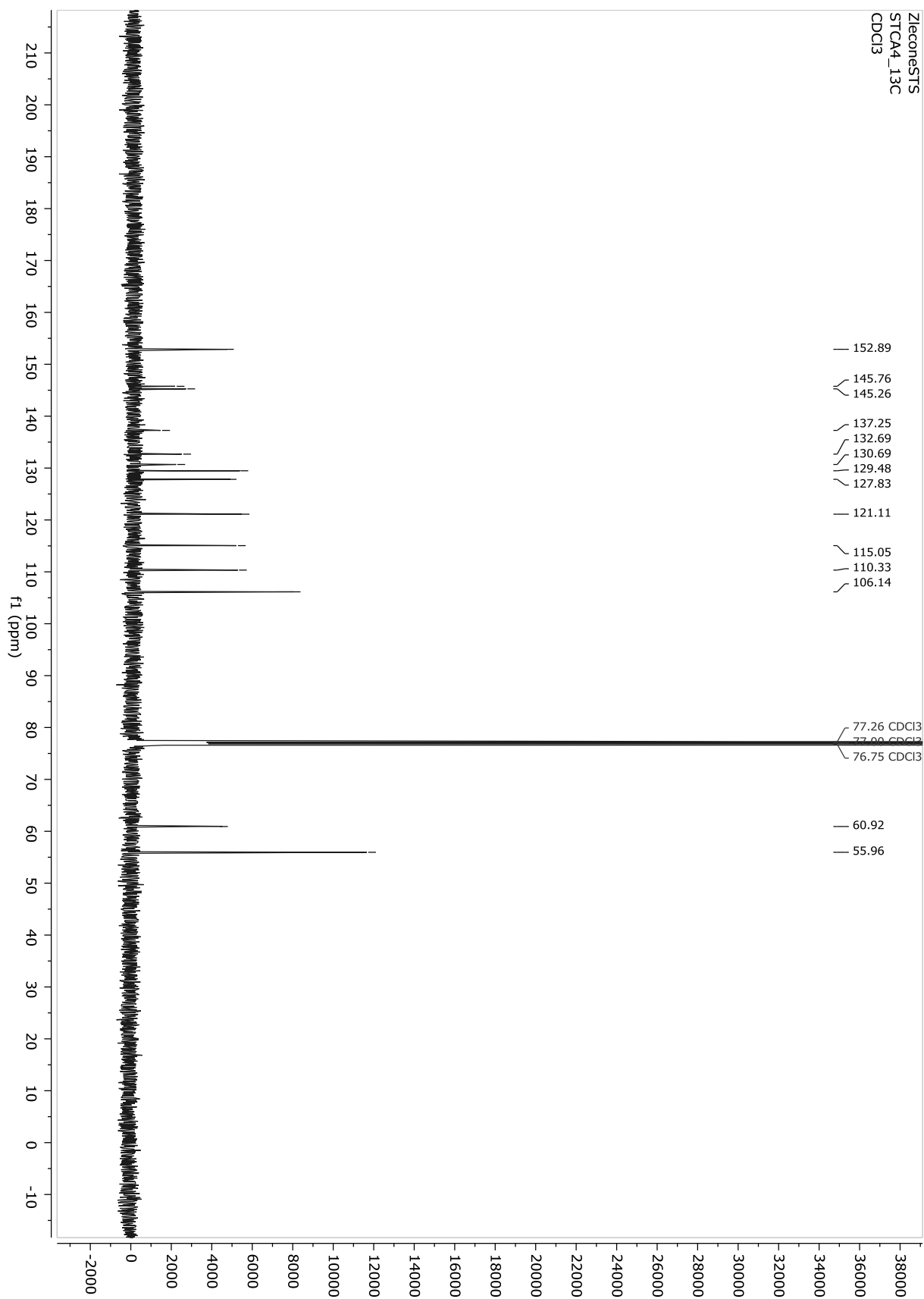
3-bromo-4,5-dimetoksyfenylo(tosylo)metylo izocyjanek (TosMIC3)



Kombretastatyna A-4 (CA-4)*(Z)*-1-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten (CA-4)*(Z)*-3'-hydroksy-3,4,4',5-tetrametoksytilben

H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	132.69
H-2, H-6	6.53 (s)	C-2, C-6	106.14
		C-3, C-5	152.89
OCH ₃	3.70 (s)	C-3-OCH ₃	55.96
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	137.25
OCH ₃	3.87 (s)	C-4-OCH ₃	60.92
H-vin	6.47 (d, 12.2)	C-vin	129.48
H-vin'	6.41 (d, 12.2)	C-vin'	127.83
H-4'	7.12 (d, 8.1)	C-1'	130.69
H-2'	6.92 (d, 2.0)	C-2'	115.05
OH	5.49 (s)	C-3'	145.76
		C-4'	
OCH ₃	3.84 (s)	C-4'-OCH ₃	55.96
H-5'	6.73 (d, 8.3)	C-5'	110.33
H-6'	6.80 (dd, 8.3, 1.9)	C-6'	121.11

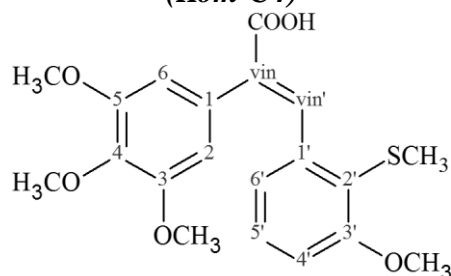




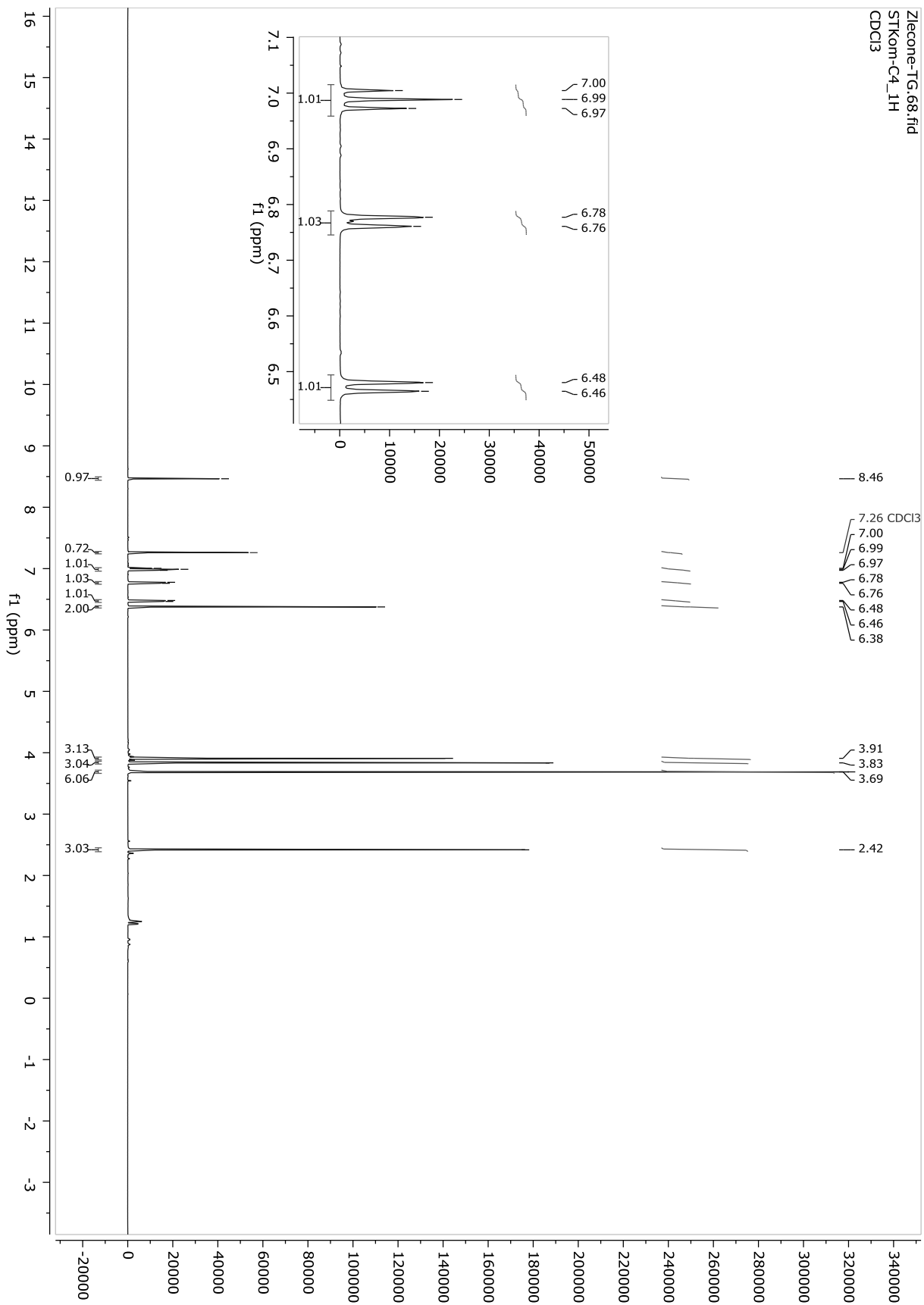
Tiopochodne CA-4

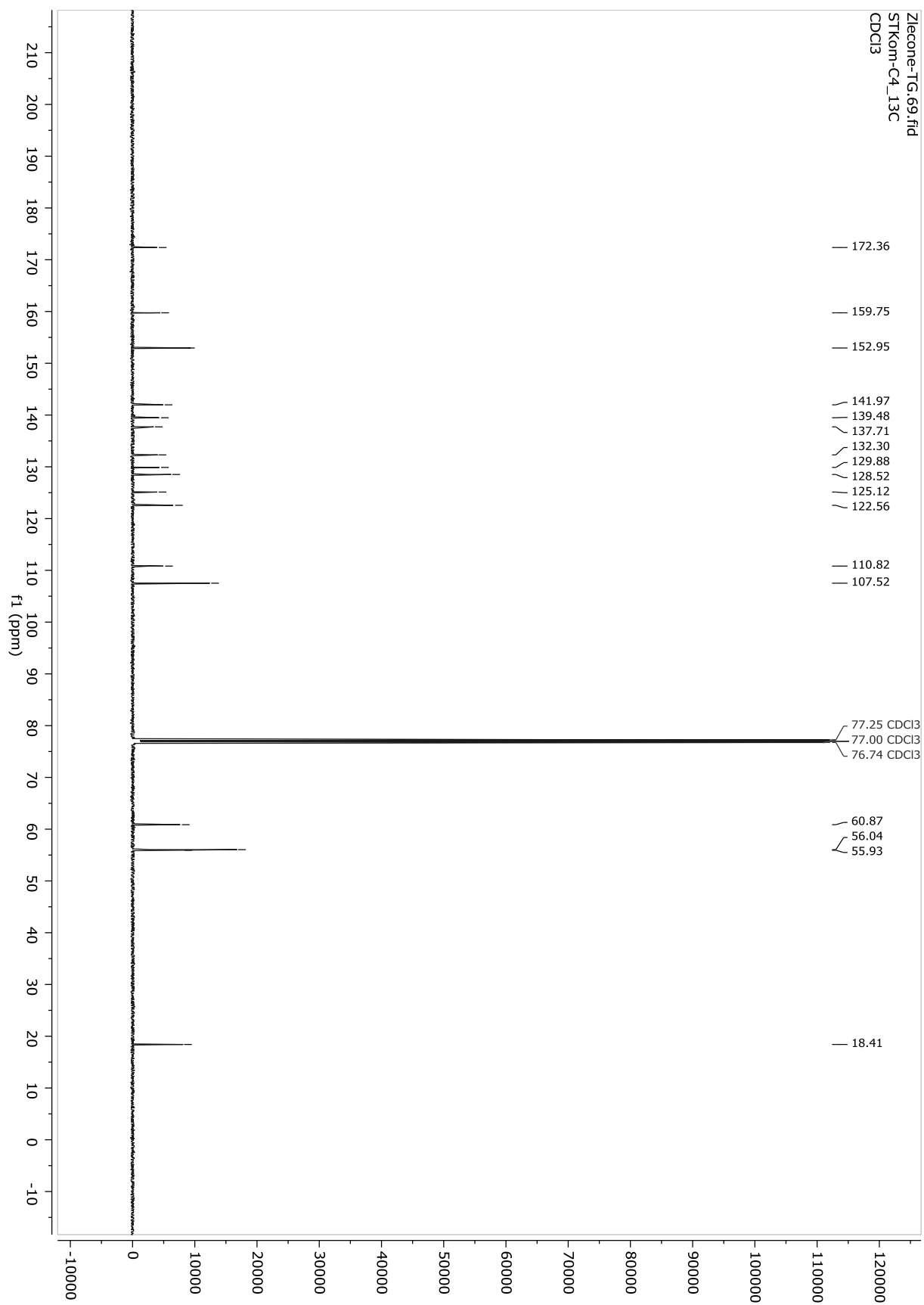
Pochodne kwasu α -fenylocynamonowego (Kom-C)

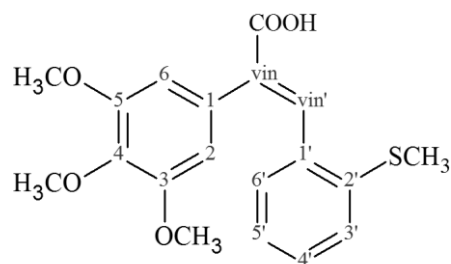
Kwas (E)-3-(3-metoksy-2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)prop-2-enowy (Kom-C4)



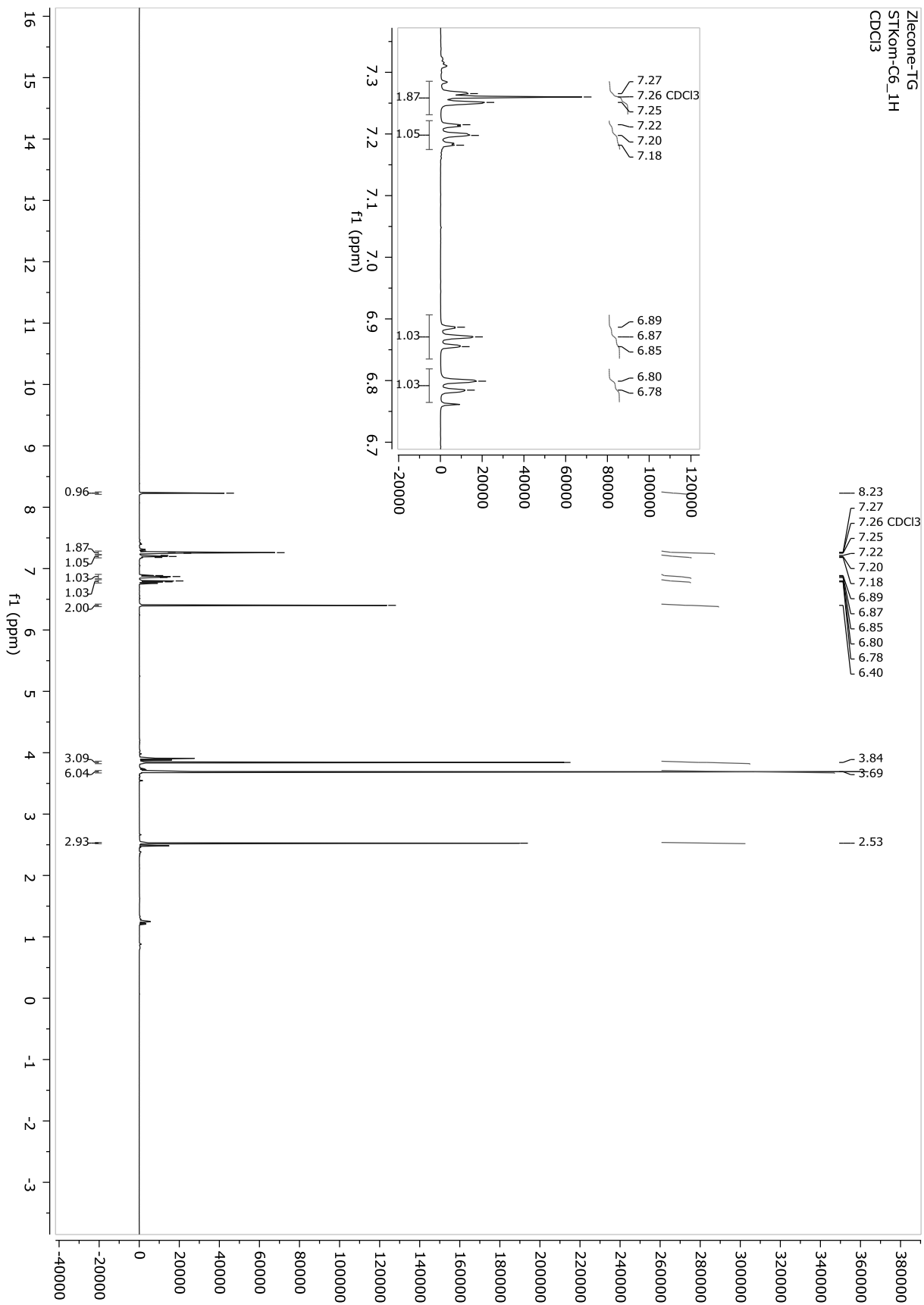
H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	125.12
H-2, H-6	6.38 (s)	C-2, C-6	107.52
		C-3, C-5	152.95
OCH ₃	3.69 (s)	C-3-OCH ₃	56.04
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	139.48
OCH ₃	3.91 (s)	C-4-OCH ₃	60.87
		C-vin	132.30
		C-vin-COOH	172.36
H-vin'	8.46 (s)	C-vin'	141.97
		C-1'	137.71
		C-2'	129.88
SCH ₃	2.42 (s)	C-2'-SCH ₃	18.41
		C-3'	159.75
OCH ₃	3.83 (s)	C-3'-OCH ₃	55.93
H-4'	6.47 (d, 7.8)	C-4'	110.82
H-5'	6.99 (t, 8.0)	C-5'	128.52
H-6'	6.77 (d, 8.2)	C-6'	122.56

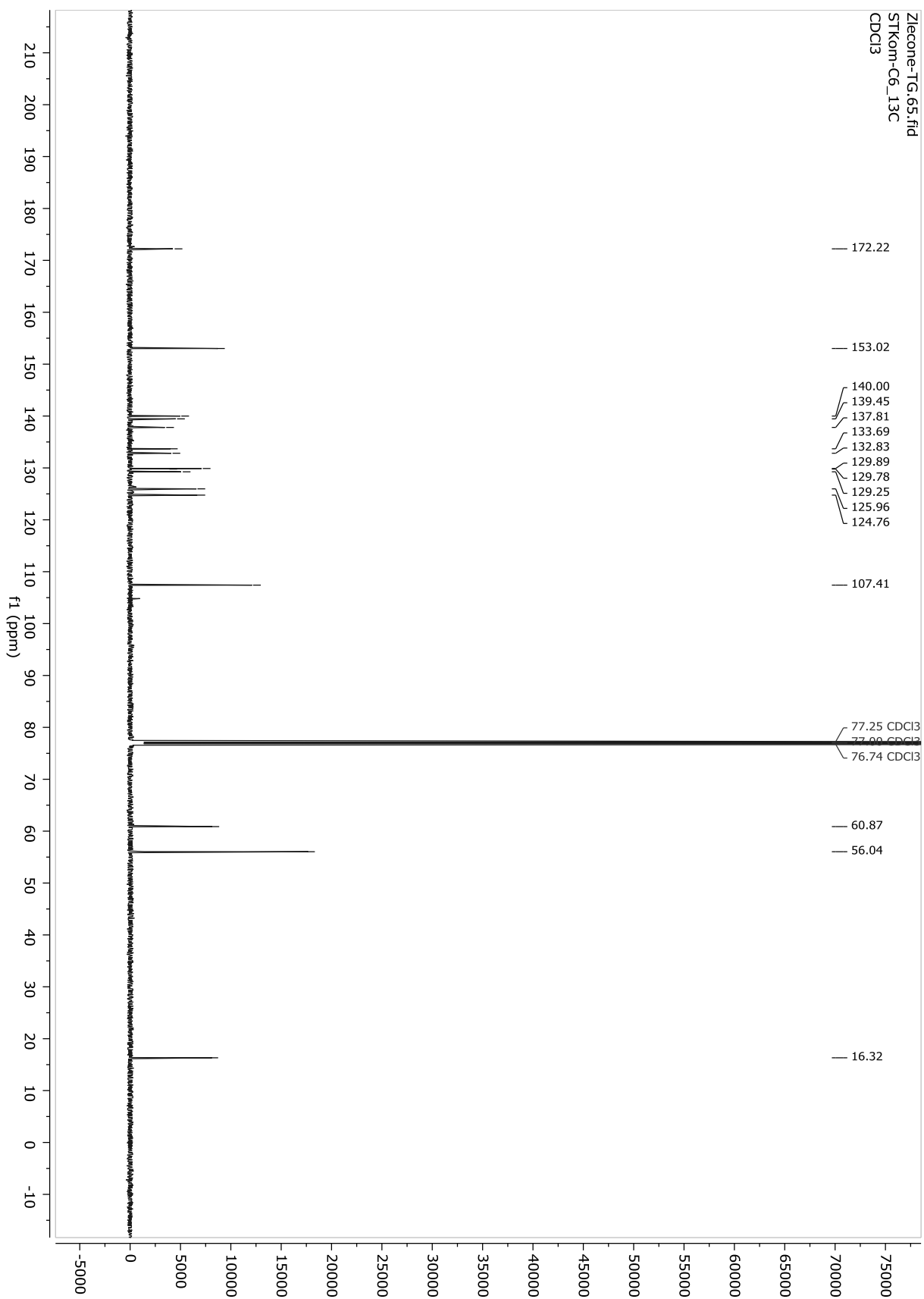


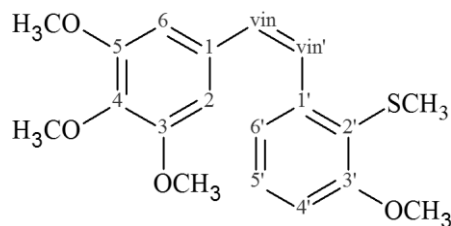


Kwas (E)-3-(2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)prop-2-enowy (Kom-C6)

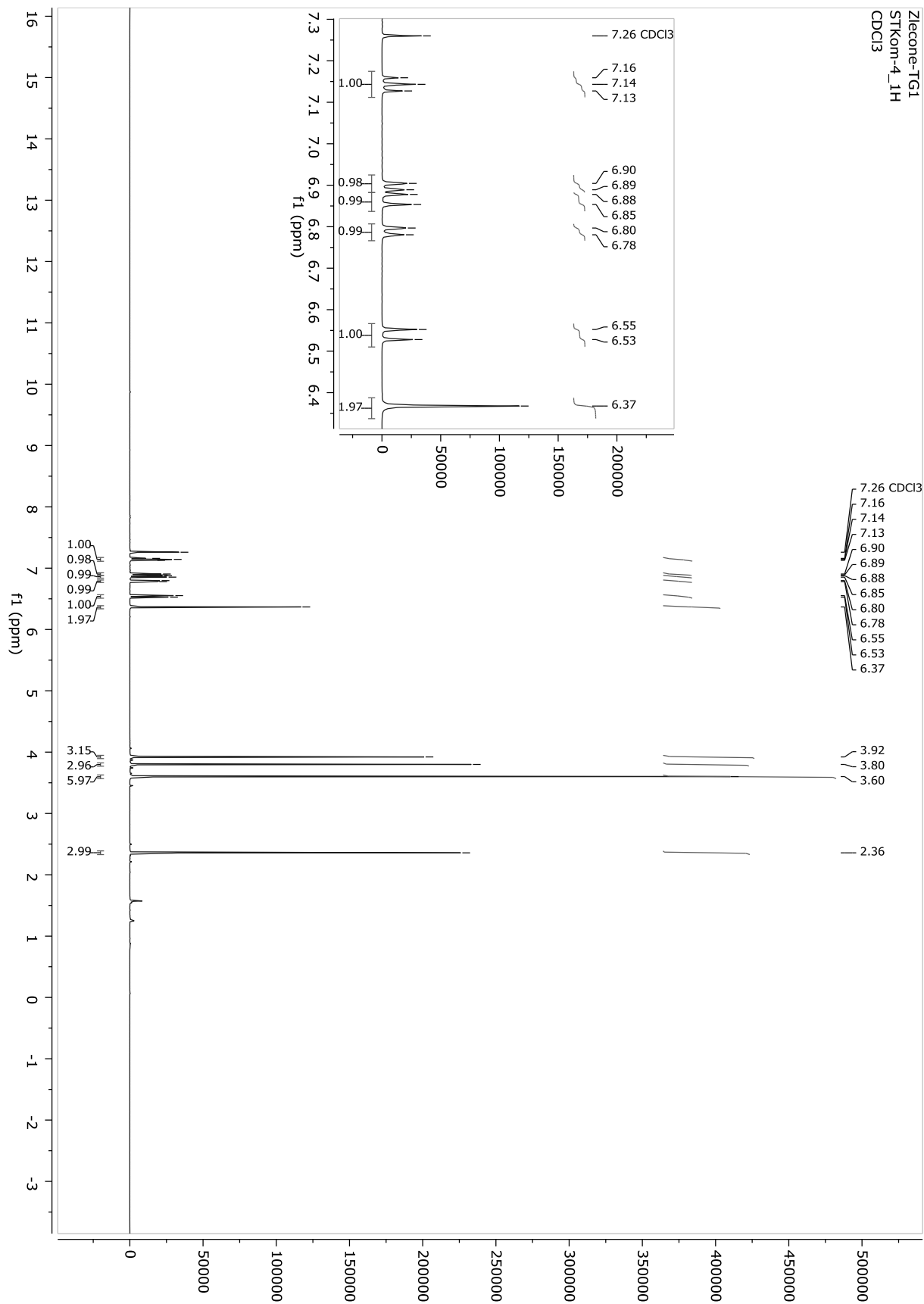
H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	129.78
H-2, H-6	6.40 (s)	C-2, C-6	107.41
		C-3, C-5	153.02
OCH ₃	3.69 (s)	C-3-OCH ₃	56.04
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	137.81
OCH ₃	3.84 (s)	C-4-OCH ₃	60.87
		C-vin	133.69
		C-vin-COOH	172.22
H-vin'	8.23(s)	C-vin'	139.45
		C-1'	132.83
		C-2'	140.00
SCH ₃	2.53 (s)	C-2'-SCH ₃	16.32
H-3'	7.26 (d, 7.2)	C-3'	129.89
H-4'	7.20 (t, 8.3)	C-4'	125.96
H-5'	6.87 (t, 7.9)	C-5'	124.76
H-6'	6.79 (d, 7.3)	C-6'	129.25

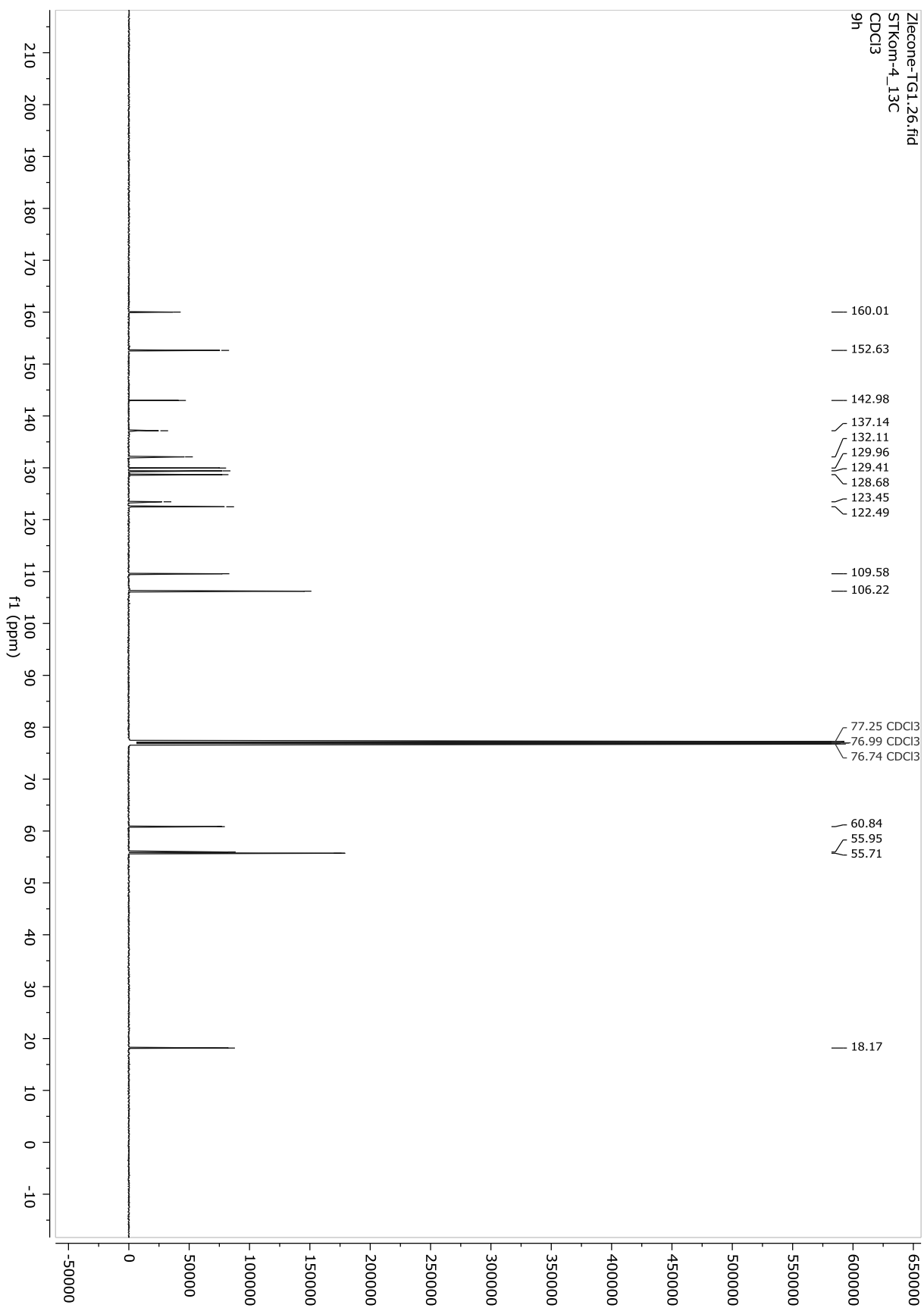


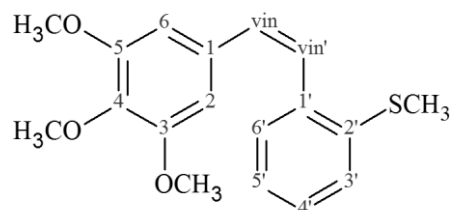


Pochodne *cis*-stilbenu (Kom)*(Z)*-1-(3-metoksy-2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten (Kom4)*(Z)*-3,3',4,5-tetrametoksy-2'-metylotiostilben

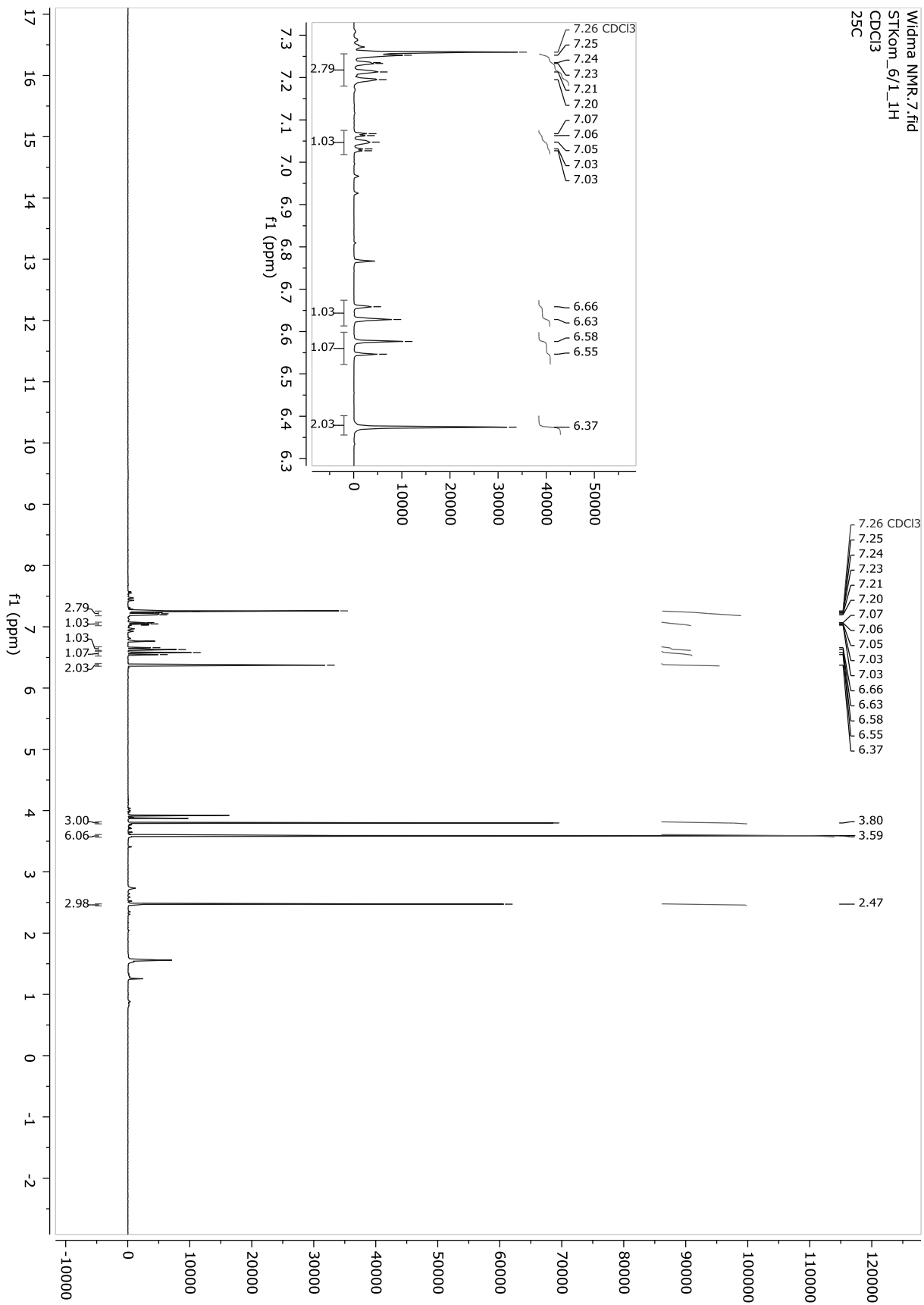
H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	123.45
H-2, H-6	6.37 (s)	C-2, C-6	106.22
		C-3, C-5	152.63
OCH ₃	3.60 (s)	C-3-OCH ₃	55.71
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	142.98
OCH ₃	3.92 (s)	C-4-OCH ₃	60.84
H-vin	6.54 (d, 12.1)	C-vin	129.41
H-vin'	6.87 (d, 12.1)	C-vin'	129.96
		C-1'	137.14
		C-2'	132.11
SCH ₃	2.36 (s)	C-2'-SCH ₃	18.17
		C-3'	
OCH ₃	3.80 (s)	C-3'-OCH ₃	55.95
H-4'	6.79 (d, 8.2)	C-4'	109.58
H-5'	7.14 (t, 7.7)	C-5'	128.68
H-6'	6.90 (d, 8.2)	C-6'	122.49

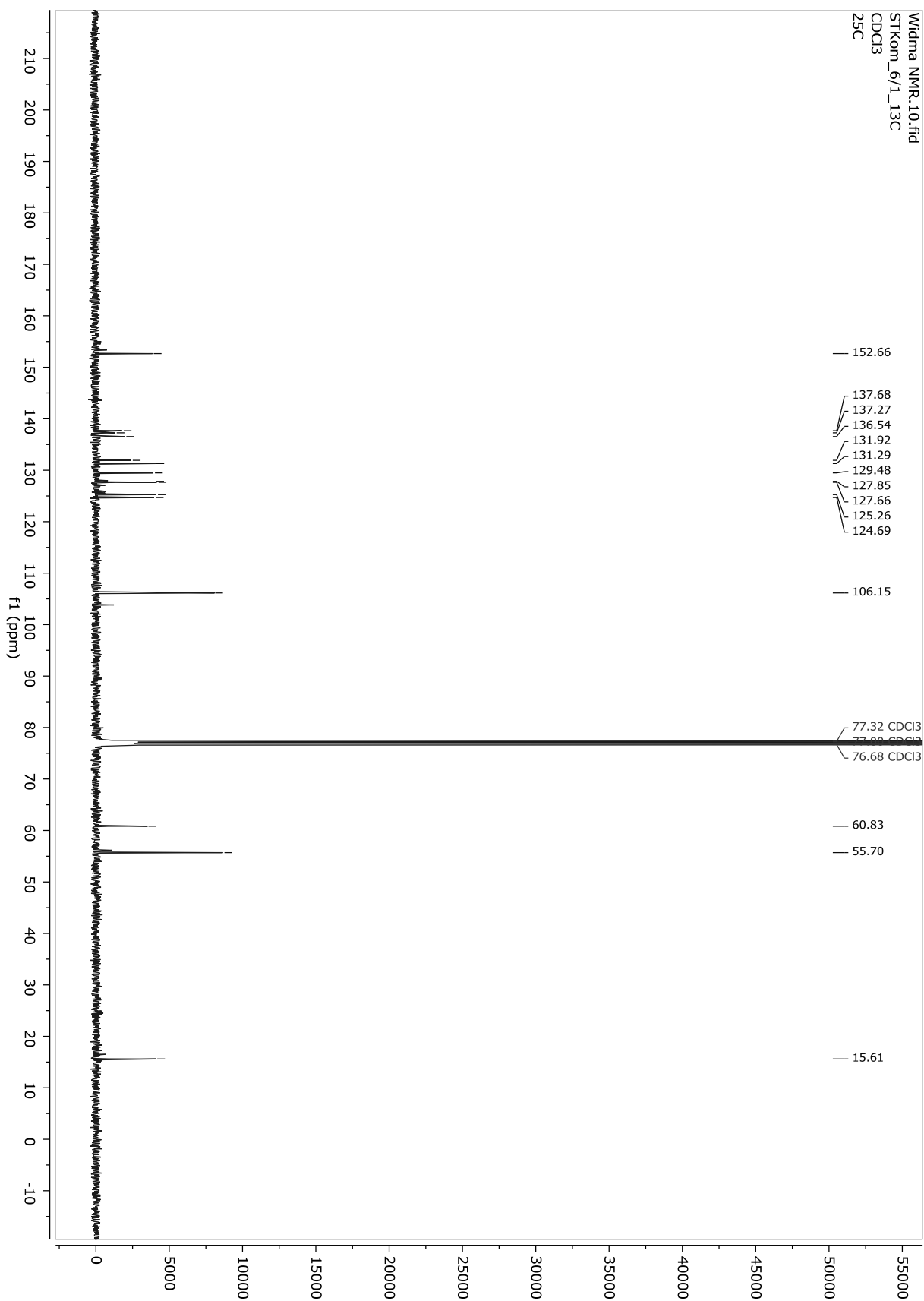




(Z)-1-(2-metylotiofenylo)-2-(3,4,5-trimetoksyfenylo)eten (Kom6)*(Z)*-3,4,5-trimetoksy-2'-metylotiostilben

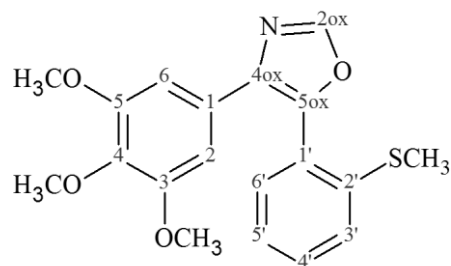
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	131.29
H-2, H-6	6.37 (s)	C-2, C-6	106.15
		C-3, C-5	152.66
OCH ₃	3.59 (s)	C-3-OCH ₃	55.70
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	137.27
OCH ₃	3.80 (s)	C-4-OCH ₃	60.83
H-vin	6.56 (d, 12.0)	C-vin	129.48
H-vin'	6.64 (d, 12.0)	C-vin'	127.66
		C-1'	131.92
		C-2'	137.68
SCH ₃	2.53 (s)	C-2'-SCH ₃	15.61
H-3'	7.26-7.18 (m)	C-3'	131.29
H-4'	7.26-7.18 (m)	C-4'	125.26
H-5'	7.08-7.02 (m)	C-5'	124.69
H-6'	7.26-7.18 (m)	C-6'	127.85



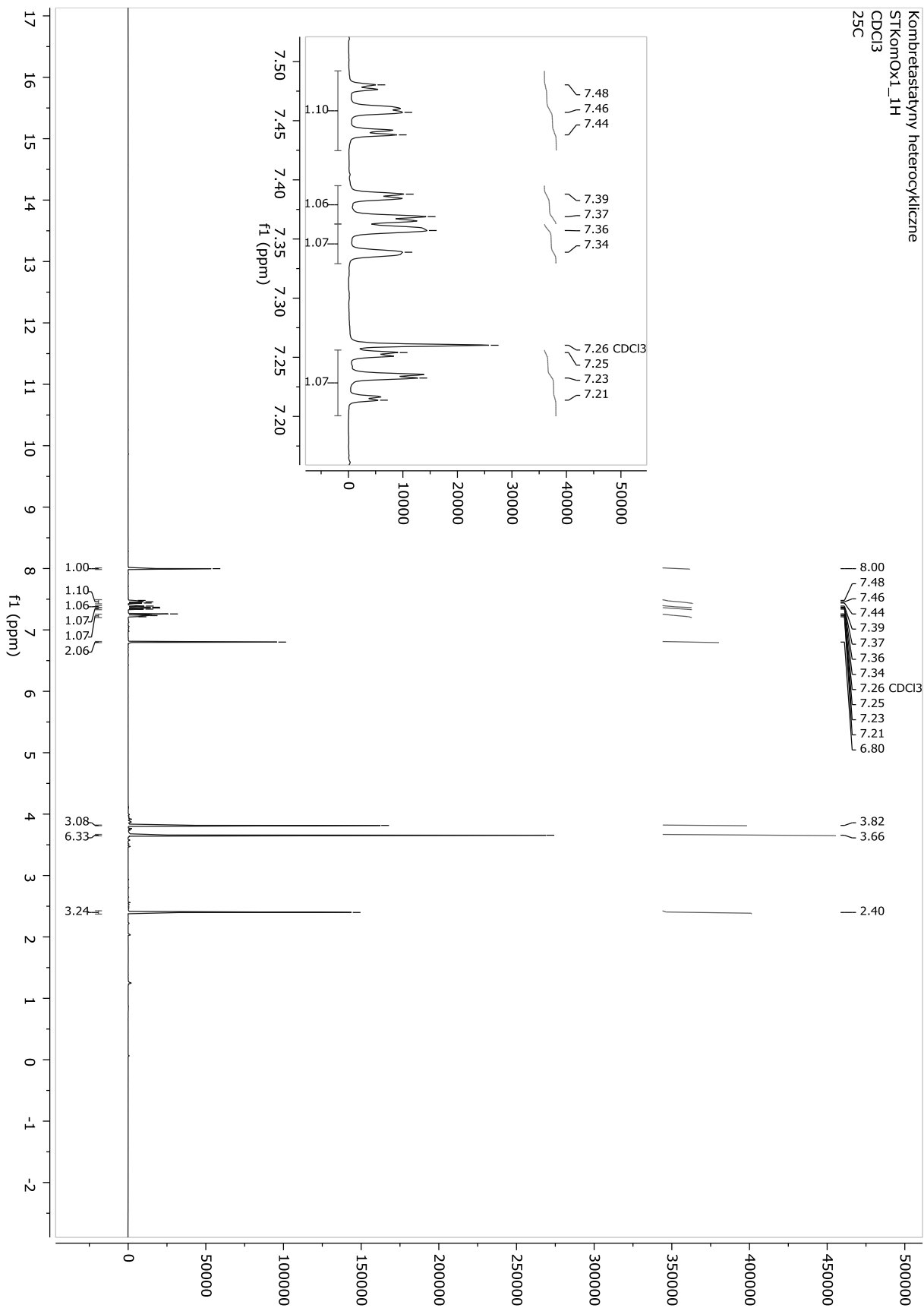


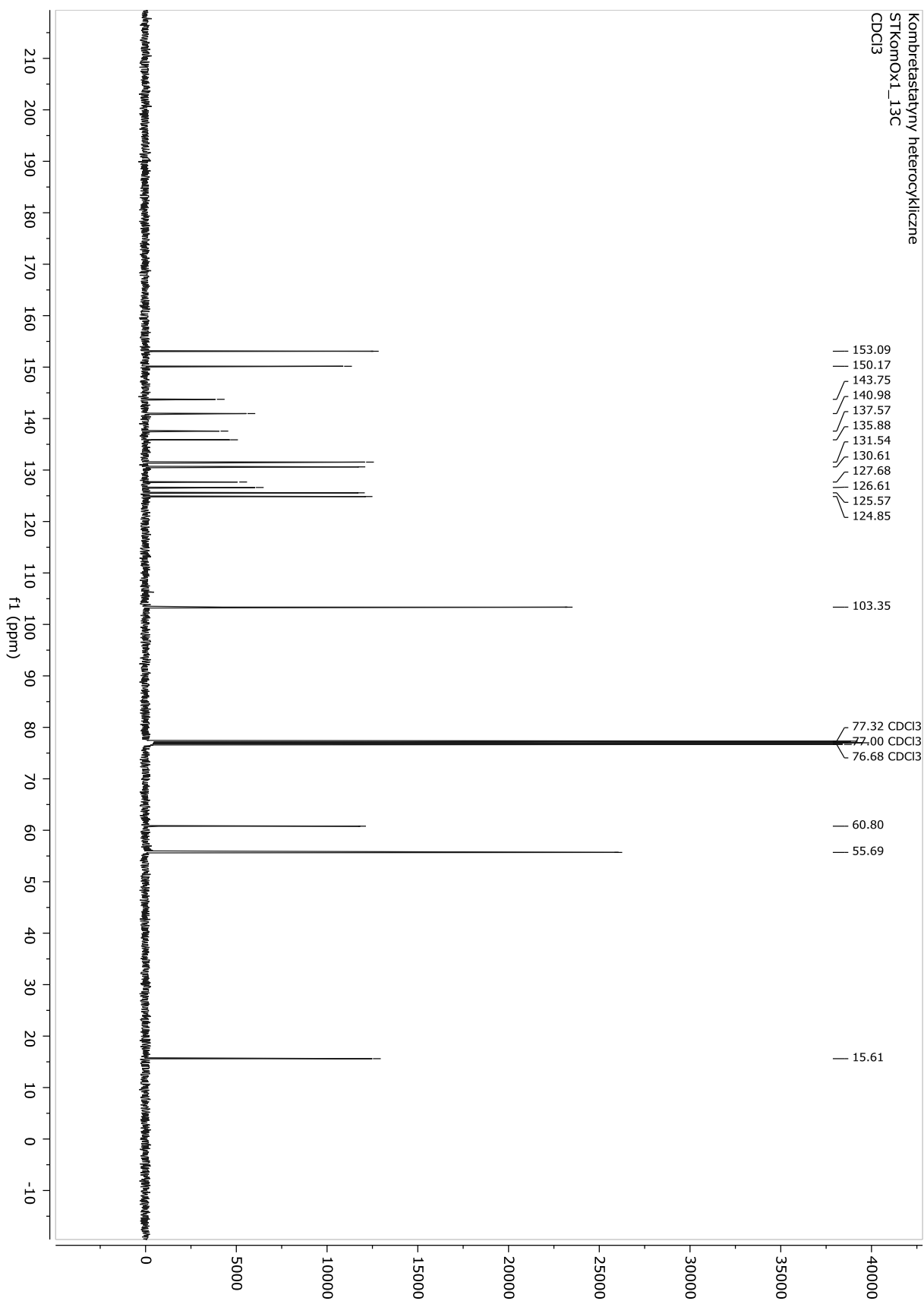
Tiopochodne oksazolowe (KomOx)

4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(2-metylotiofenylo)oksazol (KomOx1)



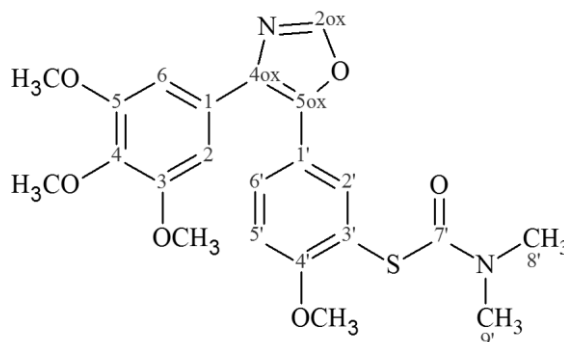
H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	127.68
H-2, H-6	6.80 (s)	C-2, C-6	103.35
		C-3, C-5	153.09
OCH ₃	3.66 (s)	C-3-OCH ₃	55.69
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	140.98
OCH ₃	3.82 (s)	C-4-OCH ₃	60.80
H-2ox	8.00 (s)	C-2ox	150.17
		C-4ox	137.57
		C-5ox	143.75
		C-1'	126.61
		C-2'	135.88
SCH ₃	2.53 (s)	C-2'-SCH ₃	15.61
H-3'	7.35 (d, 7.3)	C-3'	125.57
H-4'	7.49-7.43 (m)	C-4'	131.54
H-5'	7.23 (t, 8.1)	C-5'	124.85
H-6'	7.38 (d, 7.6)	C-6'	130.61



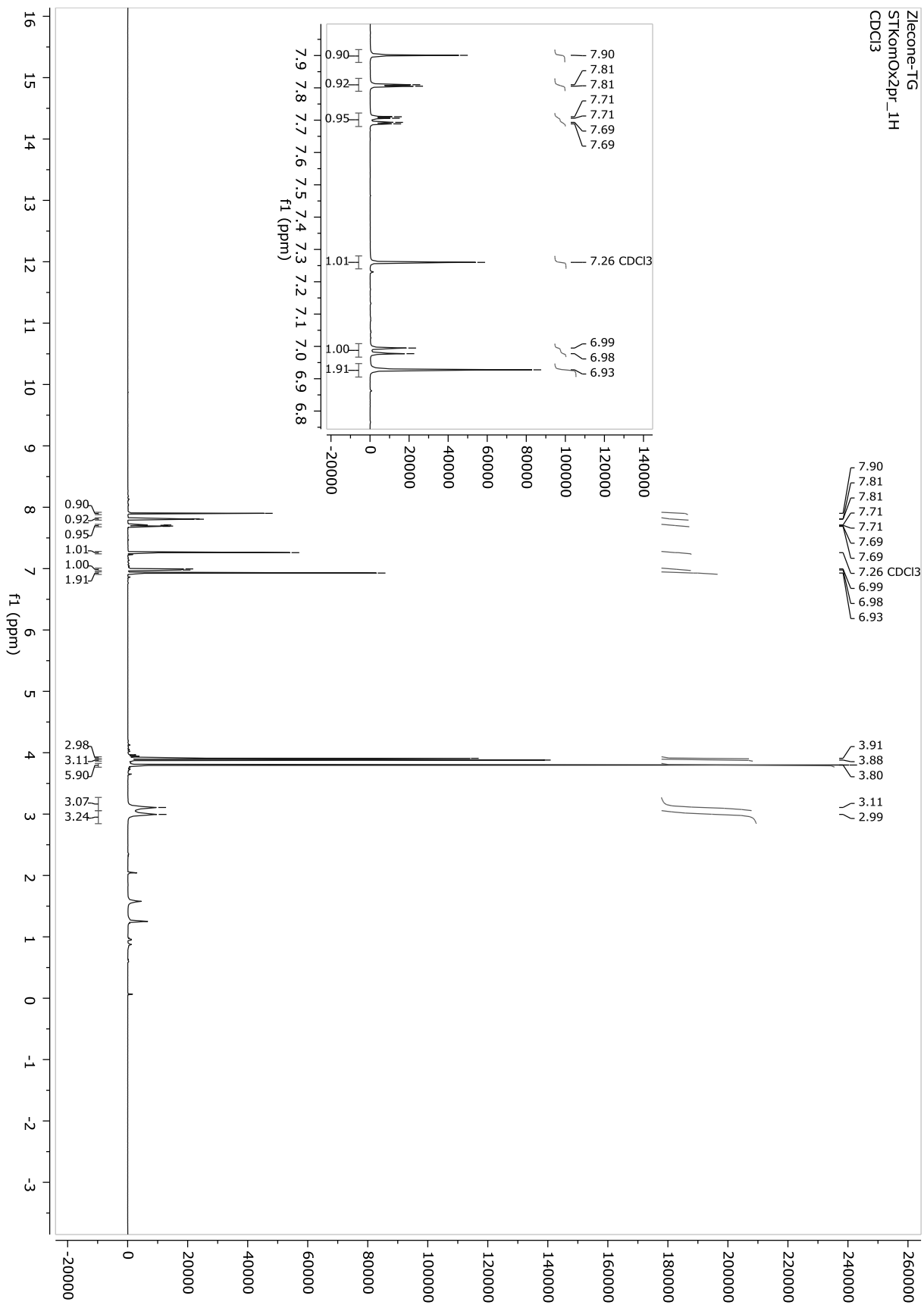


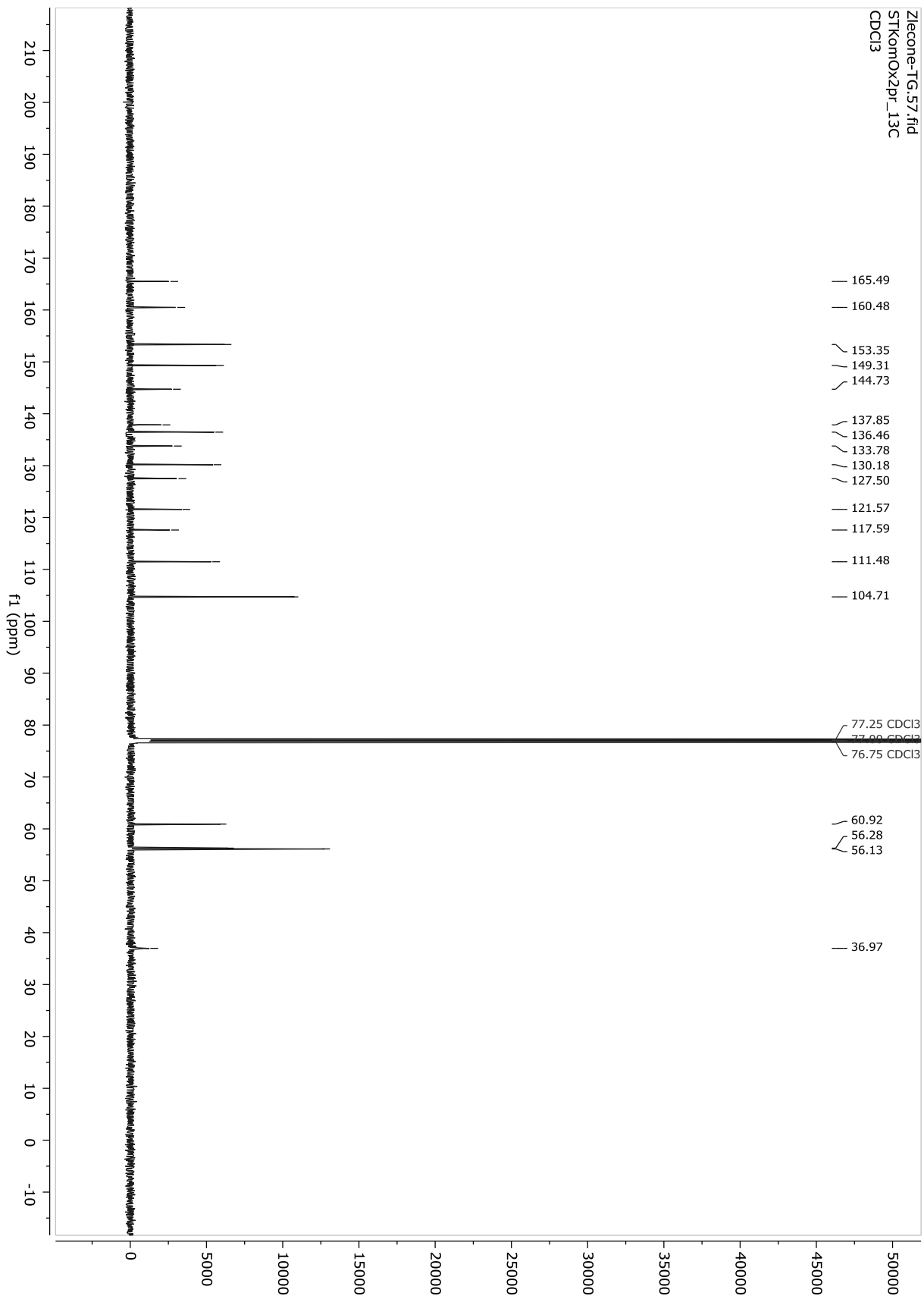
4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotiokarbamoilofenylo)oksazol

(KomOx2pr)

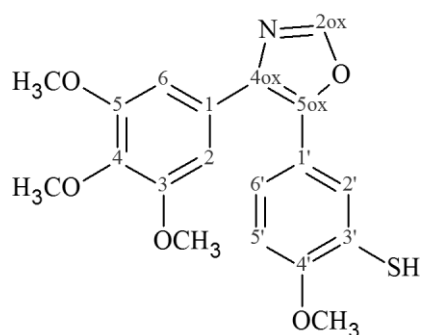


H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	127.50
H-2, H-6	6.93 (s)	C-2, C-6	104.71
		C-3, C-5	153.35
OCH ₃	3.80 (s)	C-3-OCH ₃	56.13
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	137.85
OCH ₃	3.91 (s)	C-4-OCH ₃	60.92
H-2ox	7.90 (s)	C-2ox	149.31
		C-4ox	133.78
		C-5ox	144.73
		C-1'	121.57
H-2'	7.81 (d, 2.3)	C-2'	136.46
		C-3'	117.59
		C-4'	160.48
OCH ₃	3.88 (s)	C-4'-OCH ₃	56.28
H-5'	6.99 (d, 8.7)	C-5'	111.48
H-6'	7.70 (d, 8.7, 2.3)	C-6'	130.18
		C7'	165.49
CH ₃	3.11 (s)	C8'	36.97
CH ₃	2.99 (s)	C9'	36.97

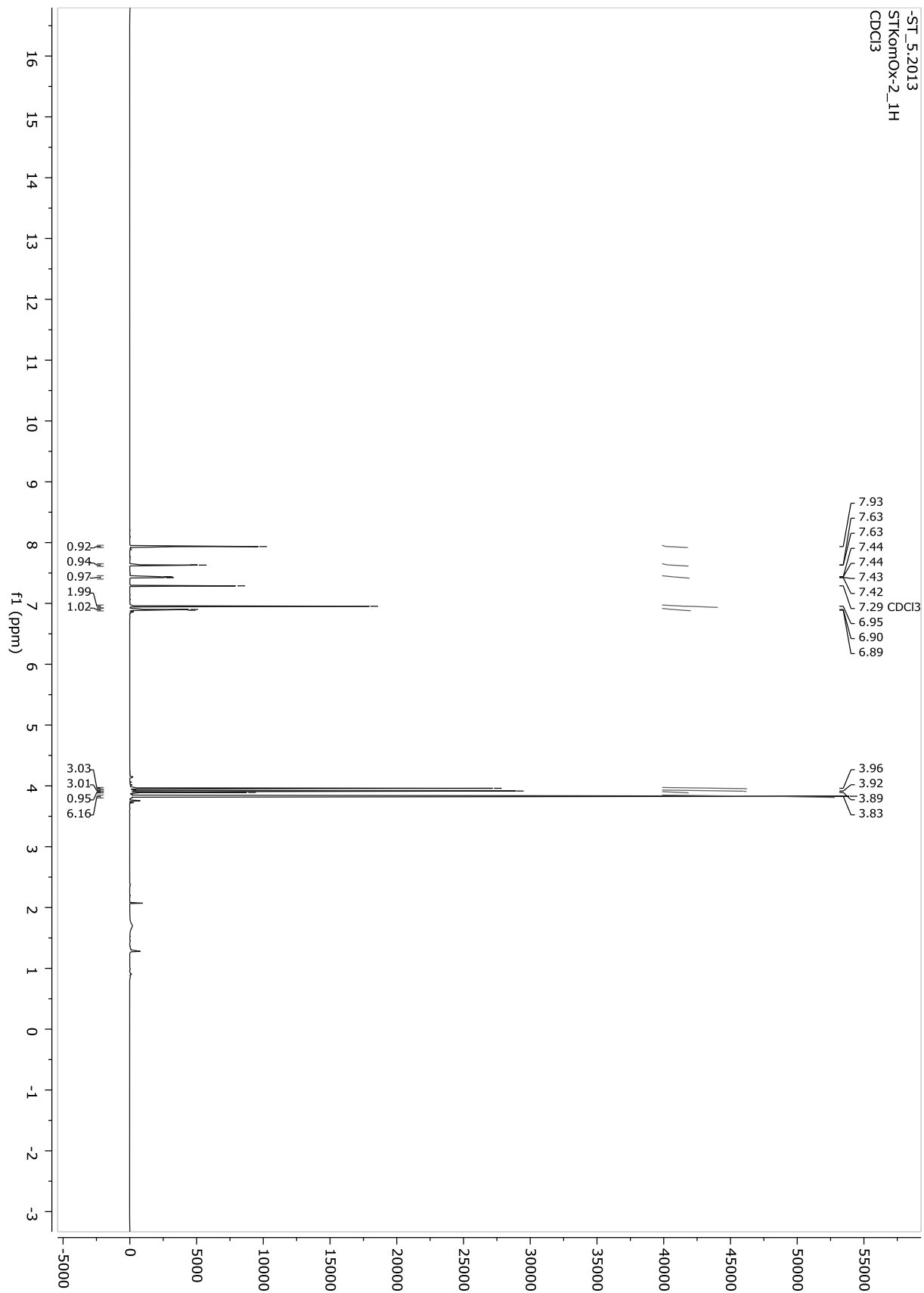


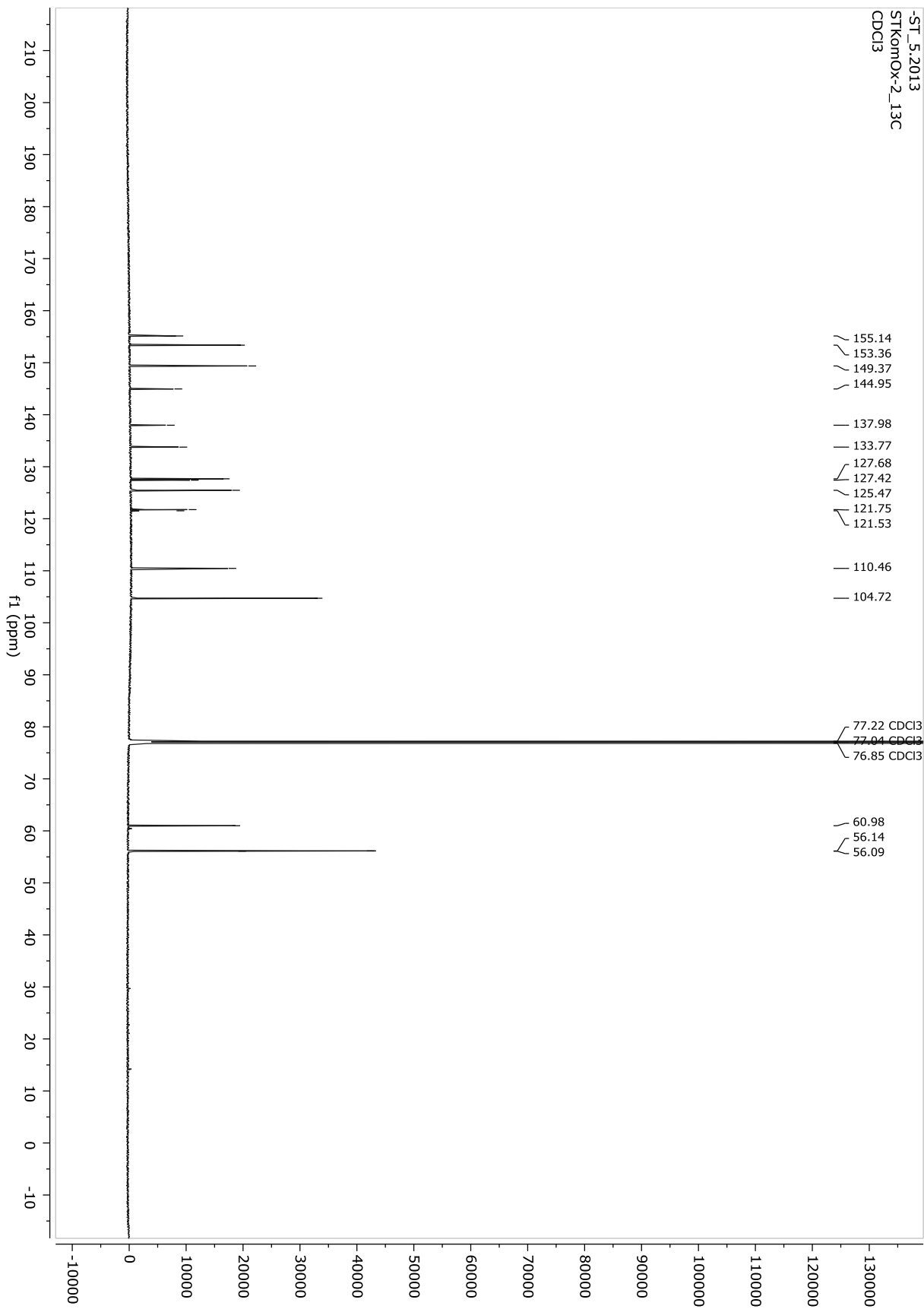


4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-merkapto-4-metoksyfenylo)oksazol (KomOx2)

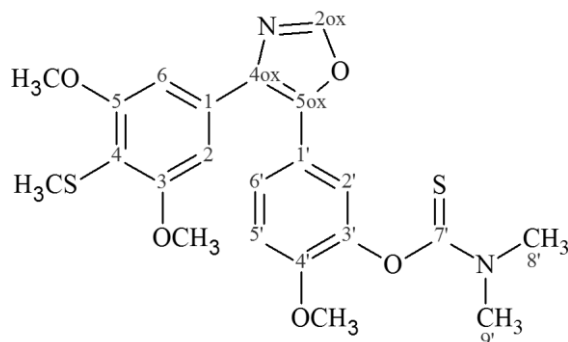


H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	127.42
H-2, H-6	6.95 (s)	C-2, C-6	104.72
		C-3, C-5	153.36
OCH ₃	3.83 (s)	C-3-OCH ₃	56.14
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	137.98
OCH ₃	3.96 (s)	C-4-OCH ₃	60.98
H-2ox	7.93 (s)	C-2ox	149.37
		C-4ox	133.77
		C-5ox	144.95
		C-1'	121.75
H-2'	7.63 (d, 2.2)	C-2'	127.68
SH	3.89 (s)	C-3'	121.53
		C-4'	155.14
OCH ₃	3.92 (s)	C-4'-OCH ₃	56.09
H-5'	6.89 (d, 8.6)	C-5'	110.46
H-6'	7.43	C-6'	125.47
	(d, 8.5, 2.1)		

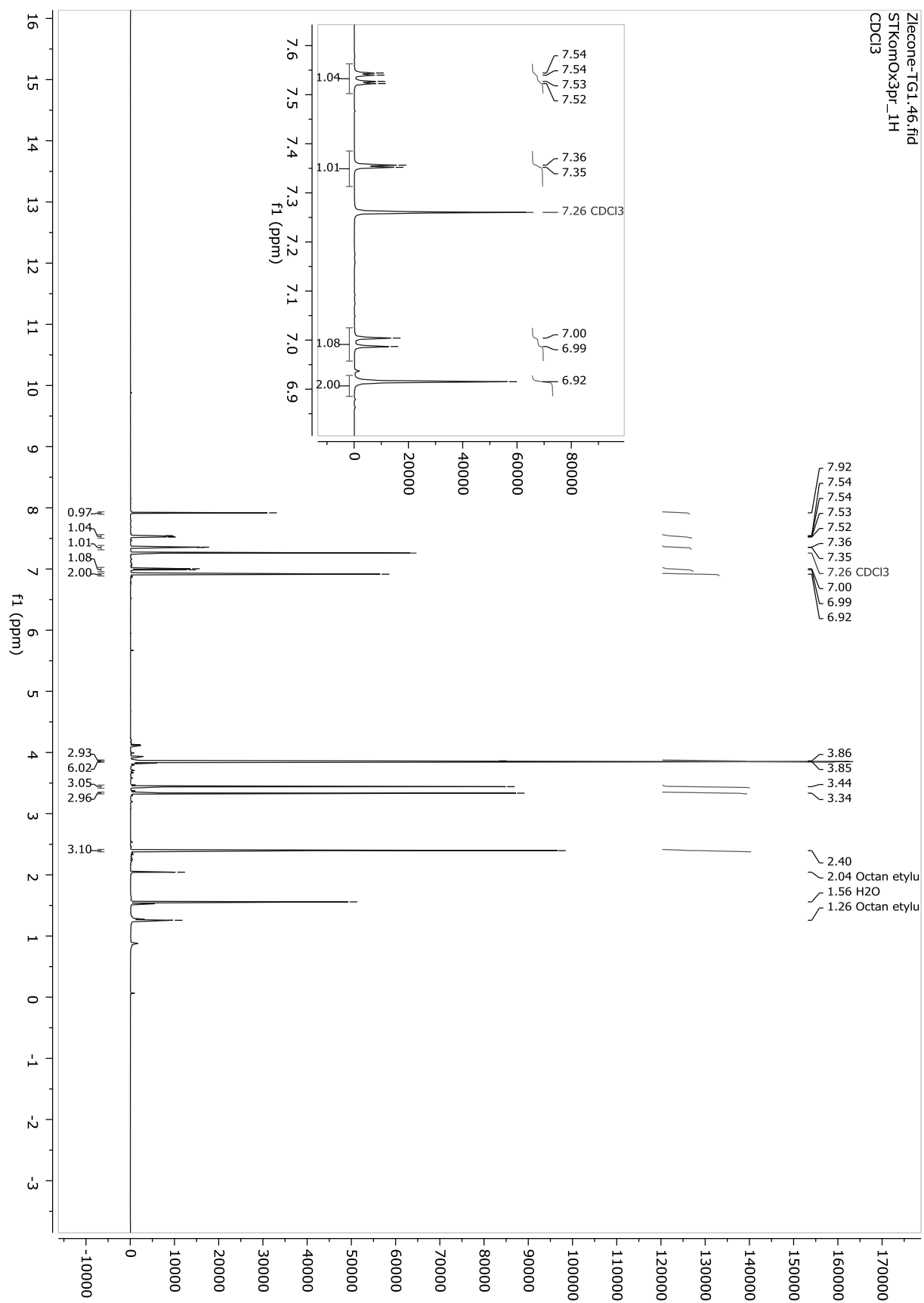


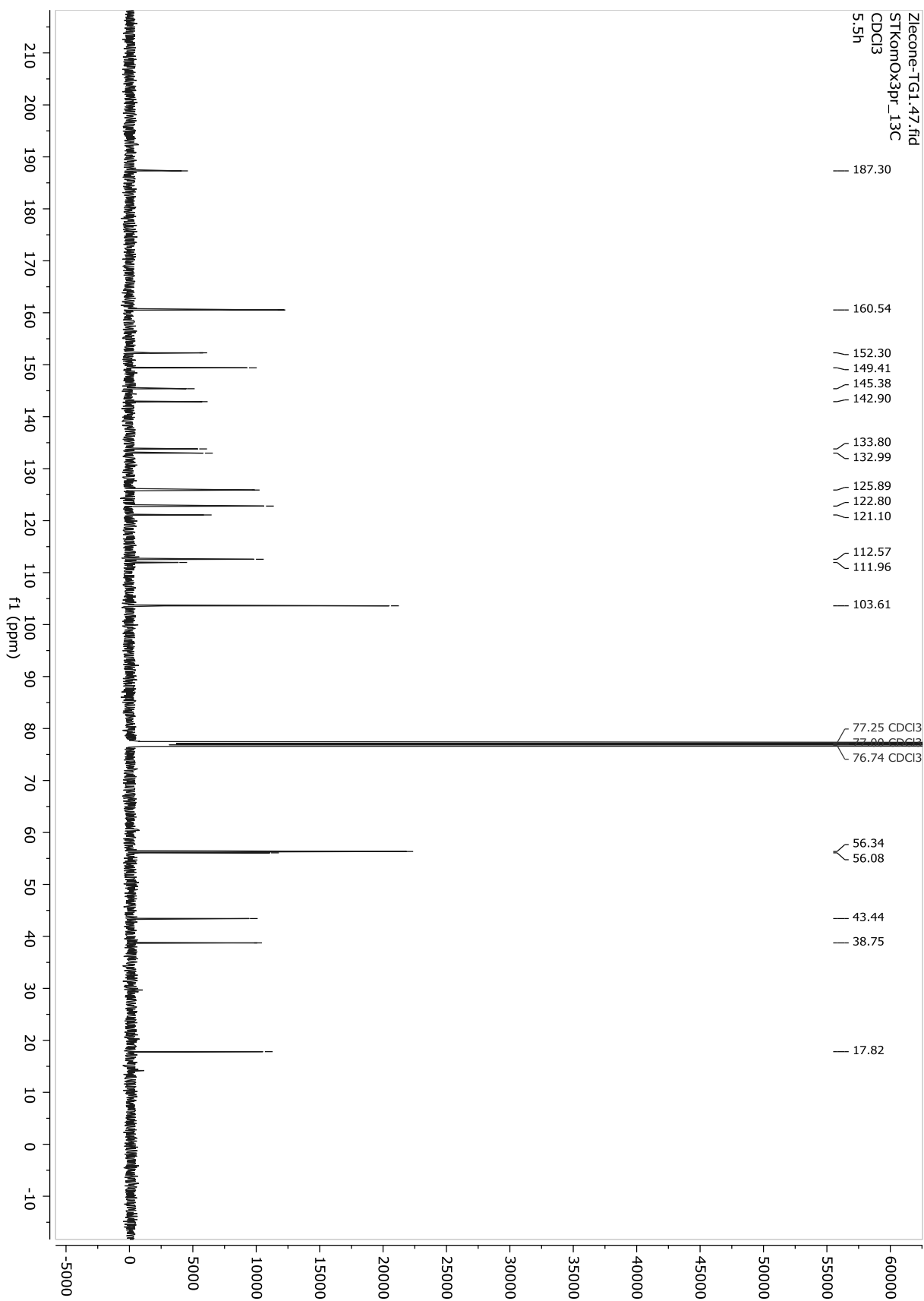


4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotiokarbamoilooksofenylo)oksazolu (KomOx3pr)

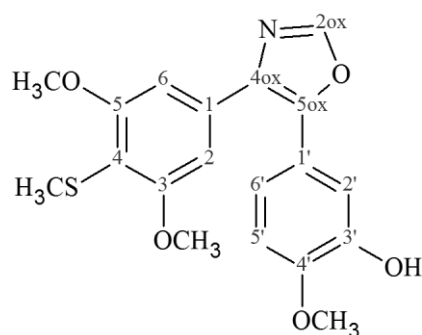


H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	132.99
H-2, H-6	6.92 (s)	C-2, C-6	103.61
		C-3, C-5	160.54
OCH ₃	3.85 (s)	C-3-OCH ₃	56.34
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	111.96
SCH ₃	2.40 (s)	C-4-SCH ₃	17.82
H-2ox	7.92 (s)	C-2ox	149.41
		C-4ox	133.80
		C-5ox	145.38
		C-1'	121.10
H-2'	7.35 (d, 2.2)	C-2'	122.80
		C-3'	142.90
		C-4'	152.30
OCH ₃	3.86 (s)	C-4'-OCH ₃	56.08
H-5'	7.00 (d, 8.6)	C-5'	112.57
H-6'	7.53 (d, 8.6, 2.2)	C-6'	125.89
		C7'	187.30
CH ₃	3.44 (s)	C8'	43.44
CH ₃	3.34 (s)	C9'	38.75

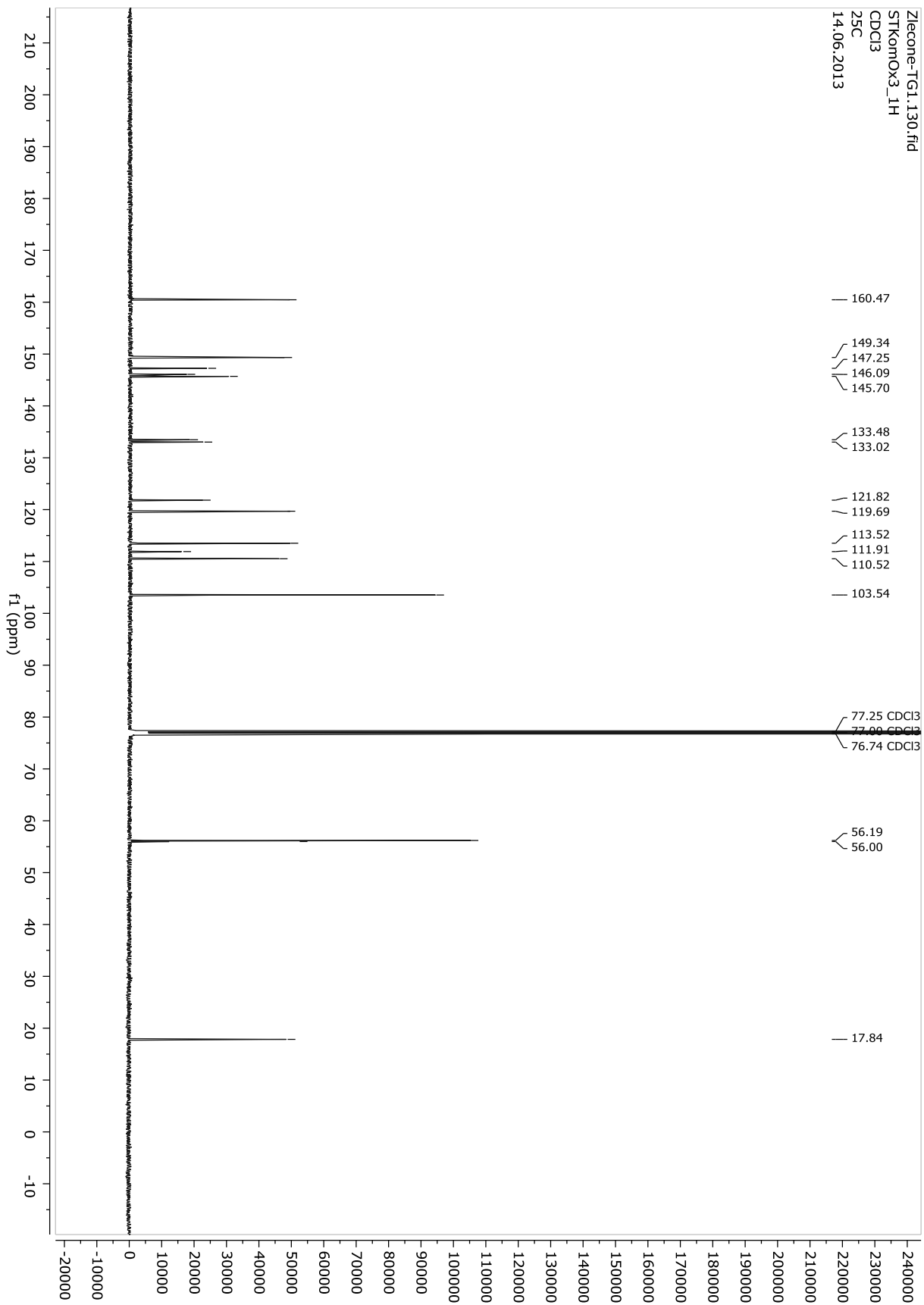




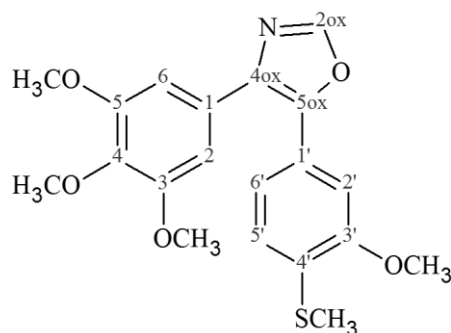
4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)oksazol (KomOx3)



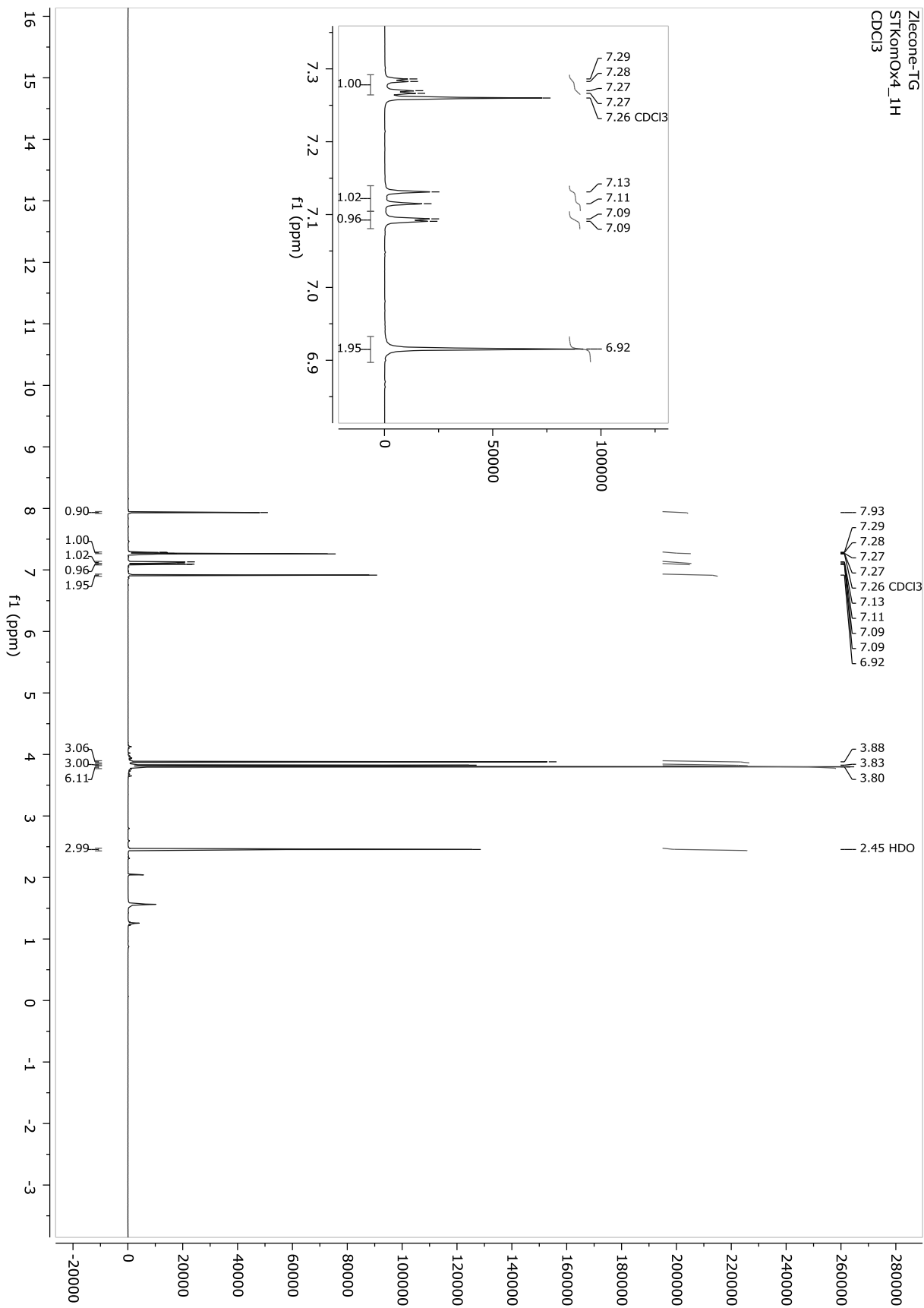
H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	133.48
H-2, H-6	6.91 (s)	C-2, C-6	103.54
		C-3, C-5	160.47
OCH ₃	3.80 (s)	C-3-OCH ₃	56.19
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	111.91
SCH ₃	2.37 (s)	C-4-SCH ₃	17.84
H-2ox	7.89 (s)	C-2ox	149.34
		C-4ox	133.02
		C-5ox	146.09
		C-1'	121.82
H-2'	7.24 (s)	C-2'	113.52
OH	5.68 (s)	C-3'	145.70
		C-4'	147.25
OCH ₃	3.91 (s)	C-4'-OCH ₃	56.00
H-5'	6.84 (d, 8.3)	C-5'	110.52
H-6'	7.14	C-6'	119.69
	(d, 8.4, 2.2)		

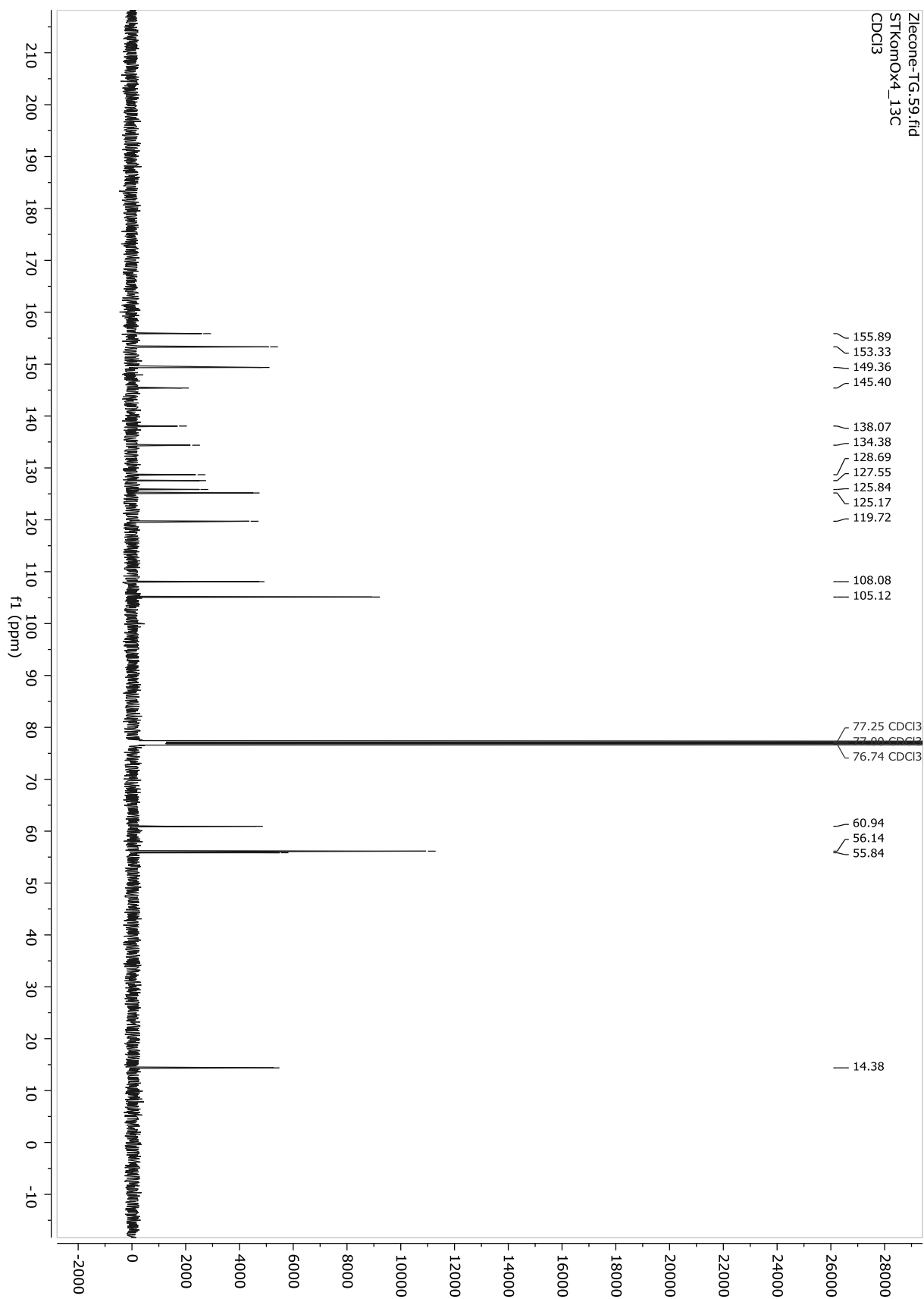


4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)oksazol (KomOx4)



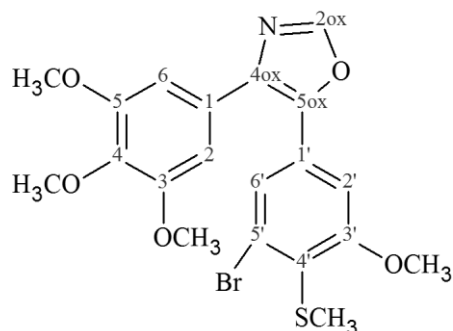
H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	128.69
H-2, H-6	6.92 (s)	C-2, C-6	105.12
		C-3, C-5	153.33
OCH ₃	3.80 (s)	C-3-OCH ₃	56.14
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	138.07
OCH ₃	3.83 (s)	C-4-OCH ₃	60.94
H-2 _{ox}	7.93 (s)	C-2 _{ox}	149.36
		C-4 _{ox}	134.38
		C-5 _{ox}	145.40
		C-1'	125.84
H-2'	7.09 (s)	C-2'	108.08
		C-3'	155.89
OCH ₃	3.88 (s)	C-3'-OCH ₃	55.84
		C-4'	
SCH ₃	2.45 (s)	C-4'-SCH ₃	14.38
H-5'	7.12 (d, 8.1)	C-5'	125.17
H-6'	7.28 (d, 8.1)	C-6'	119.72



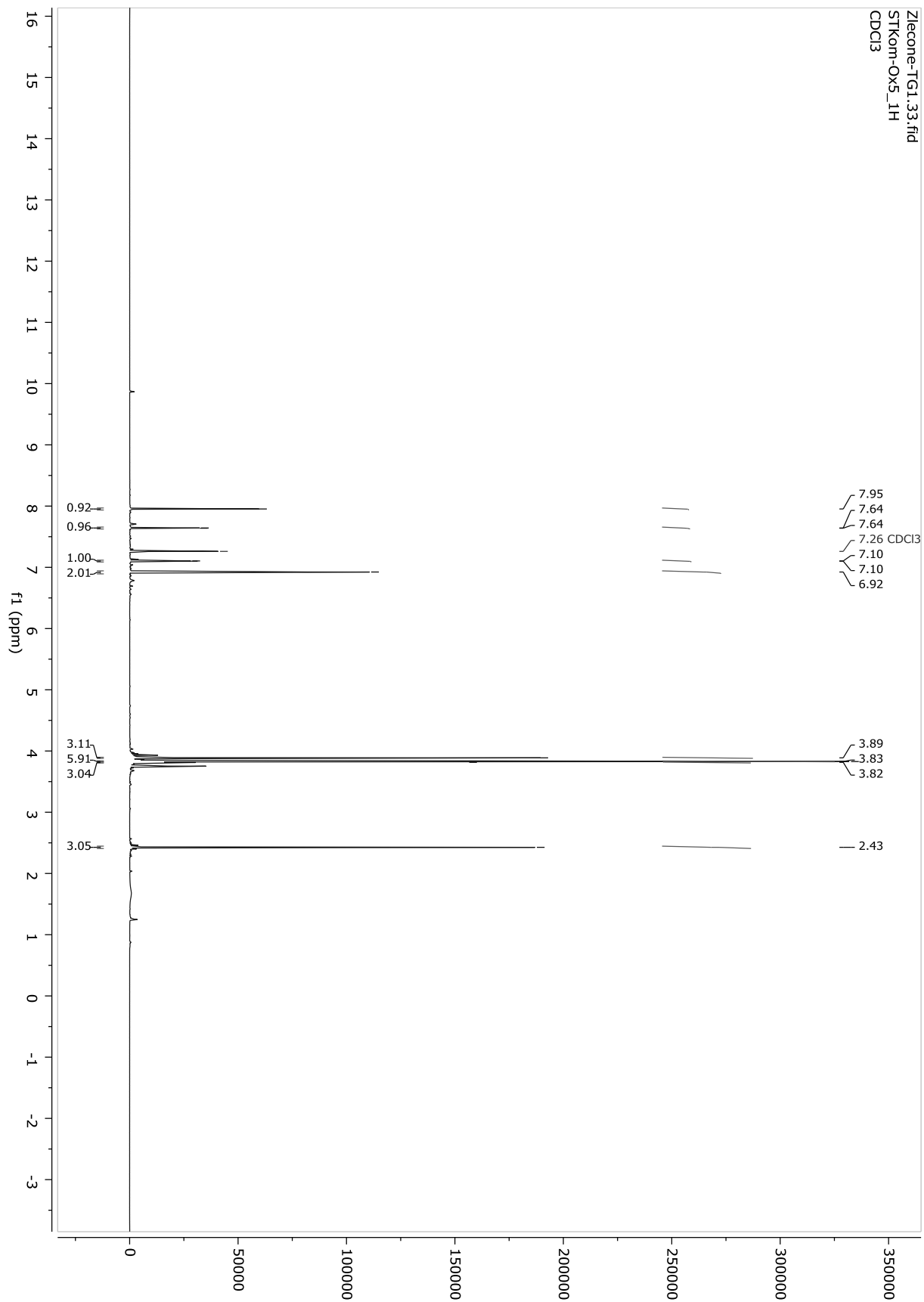


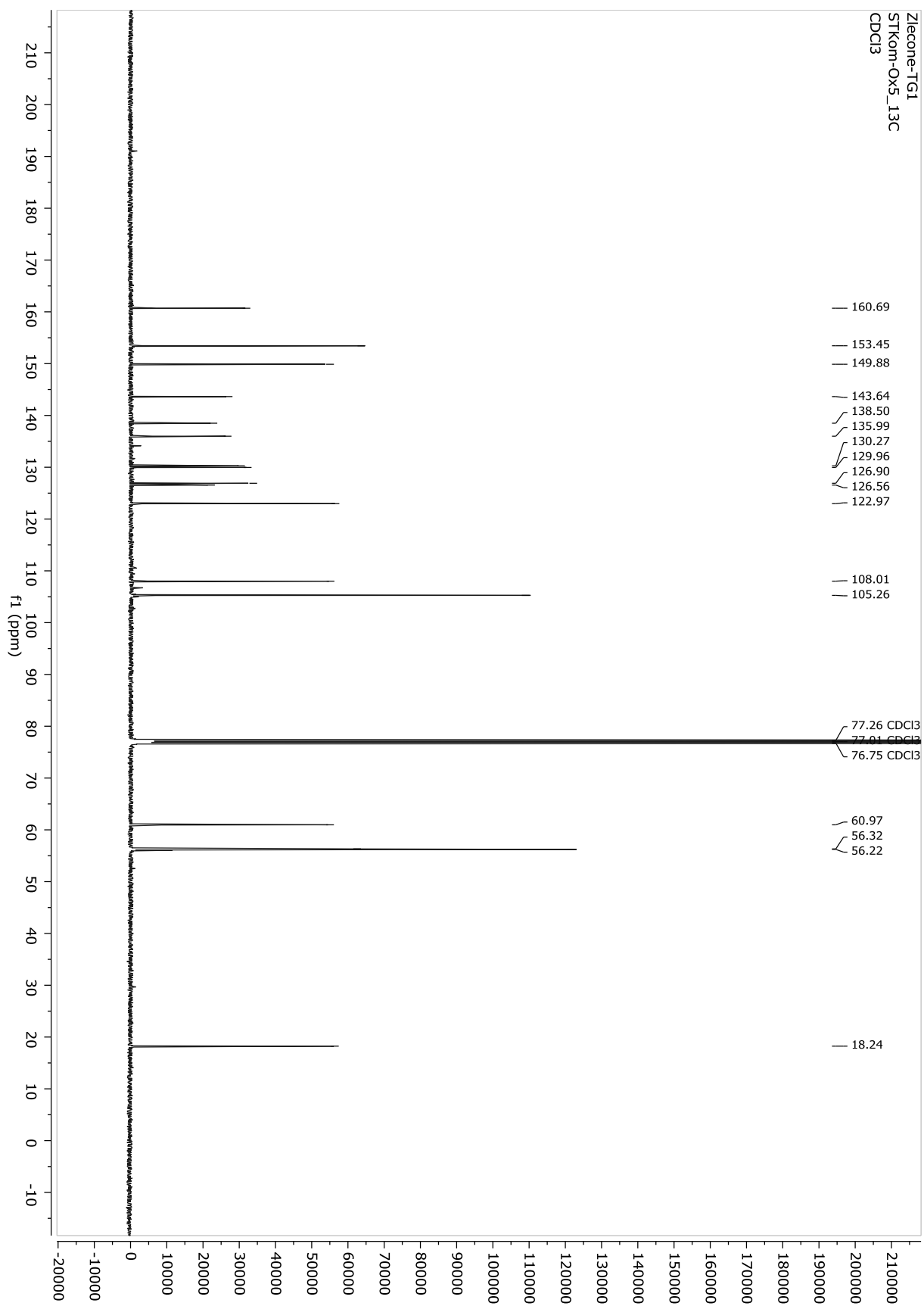
4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(5-bromo-3-metoksy-4-metylotiofenylo)oksazol

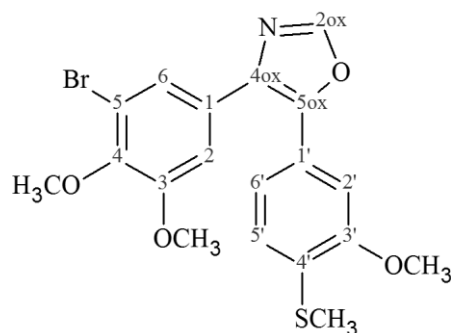
(KomOx5)



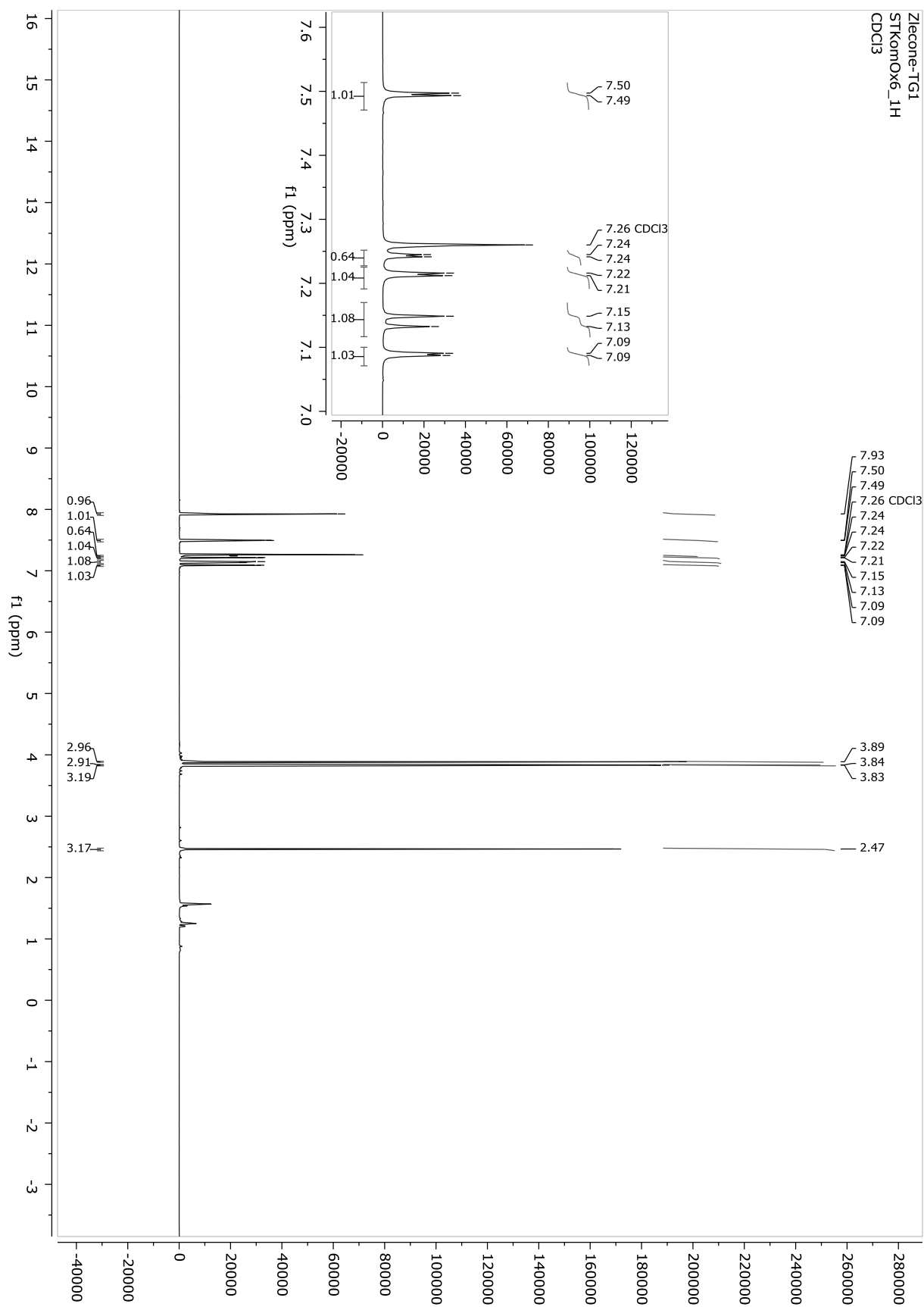
H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	129.96
H-2, H-6	6.92 (s)	C-2, C-6	105.26
		C-3, C-5	153.45
OCH ₃	3.83 (s)	C-3-OCH ₃	56.22
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	138.50
OCH ₃	3.82 (s)	C-4-OCH ₃	60.97
H-2ox	7.95 (s)	C-2ox	149.88
		C-4ox	130.27
		C-5ox	143.64
		C-1'	126.56
H-2'	7.10 (d, 1.7)	C-2'	108.01
		C-3'	160.69
OCH ₃	3.89 (s)	C-3'-OCH ₃	56.32
		C-4'	126.90
SCH ₃	2.43 (s)	C-4'-SCH ₃	18.24
		C-5'	135.99
H-6'	7.64 (d, 1.7)	C-6'	122.97

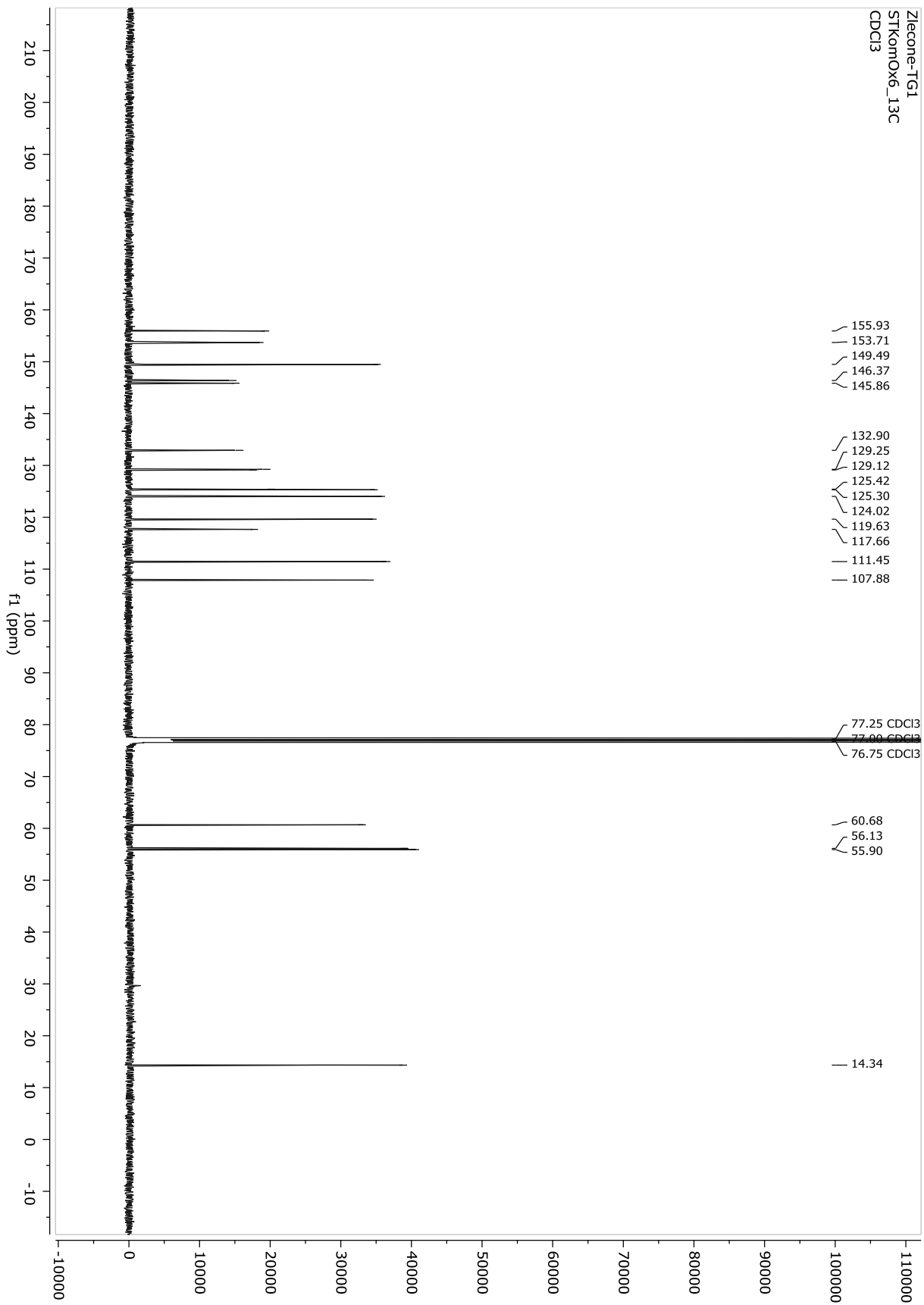


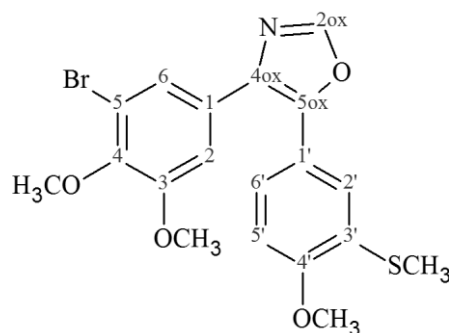


4-(5-bromo-3,4-dimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)oksazol (KomOx6)

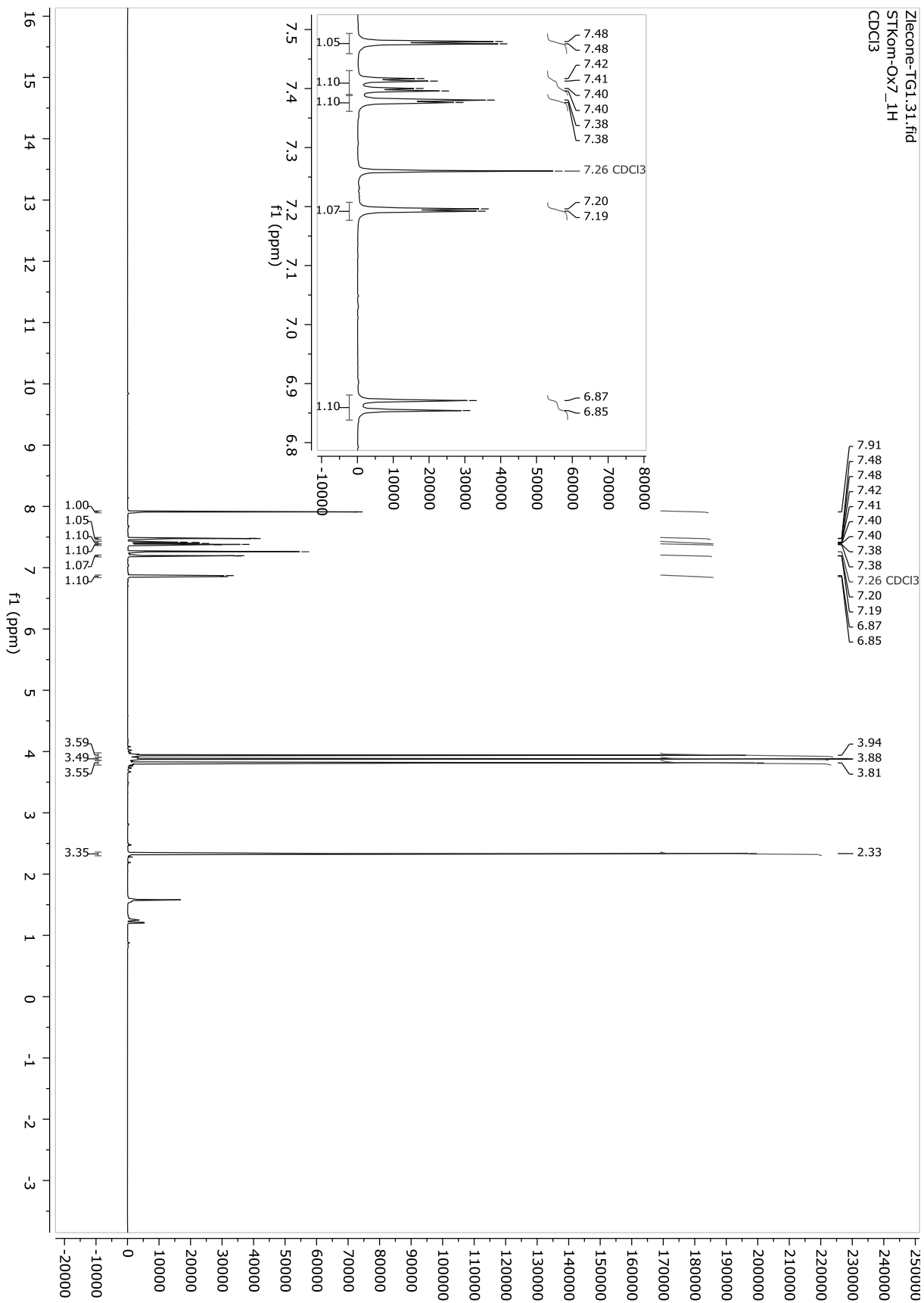
H	$\delta_H(\text{mult.}, J \text{ Hz})$	C	δ_C
		C-1	129.25
H-2	7.21 (d, 2.0)	C-2	111.45
H-6	7.50 (d, 2.0)	C-6	125.30
		C-3	155.93
OCH ₃	3.89 (s)	C-3-OCH ₃	55.90
		C-4	145.86
		C-5	117.66
OCH ₃	3.83 (s)	C-4-OCH ₃	60.68
H-2ox	7.93 (s)	C-2ox	149.49
		C-4ox	132.90
		C-5ox	146.37
		C-1'	125.42
H-2'	7.24 (d, 1.7)	C-2'	107.88
		C-3'	153.71
OCH ₃	3.84 (s)	C-3'-OCH ₃	56.13
		C-4'	129.12
SCH ₃	2.47 (s)	C-4'-SCH ₃	14.34
H-5'	7.14 (d, 8.1)	C-5'	124.02
H-6'	7.09 (d, 1.7)	C-6'	119.63

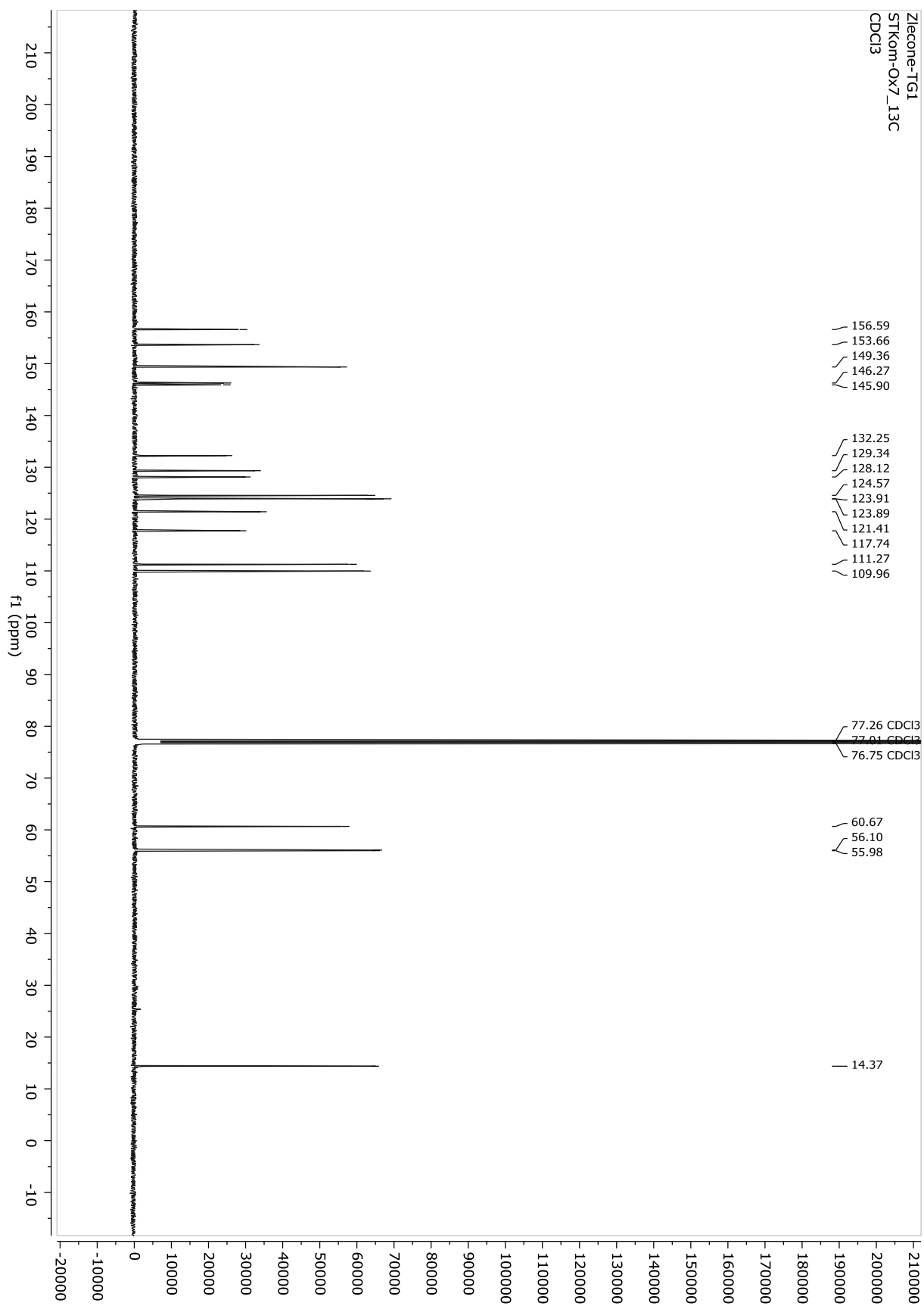




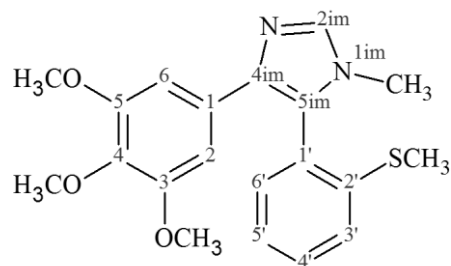
4-(5-bromo-3,4-dimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-metylotiofenylo)oksazol (KomOx7)

H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	129.34
H-2	7.19 (d, 1.9)	C-2	111.27
H-6	7.48 (d, 2.0)	C-6	124.57
		C-3	156.59
OCH ₃	3.94 (s)	C-3-OCH ₃	55.98
		C-4	145.90
		C-5	117.74
OCH ₃	3.88 (s)	C-4-OCH ₃	60.67
H-2ox	7.91 (s)	C-2ox	149.36
		C-4ox	132.25
		C-5ox	146.27
		C-1'	128.12
H-2'	7.38 (d, 2.1)	C-2'	109.96
		C-3'	121.41
SCH ₃	2.33 (s)	C-3'-SCH ₃	14.37
		C-4'	153.66
OCH ₃	3.81 (s)	C-4'-OCH ₃	56.10
H-5'	6.86 (d, 8.5)	C-5'	123.91
H-6'	7.41 (dd, 8.4, 2.1)	C-6'	124.57

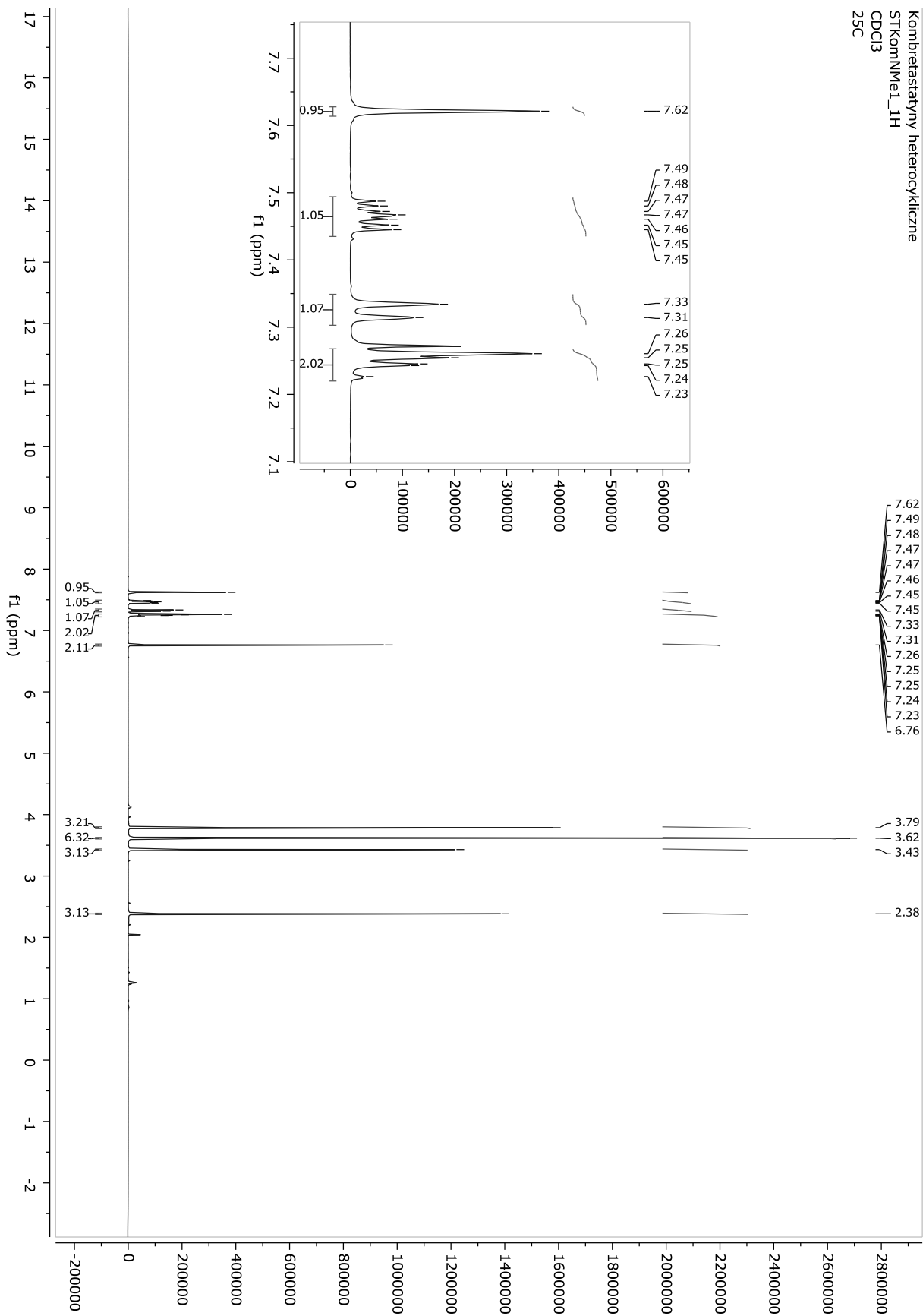


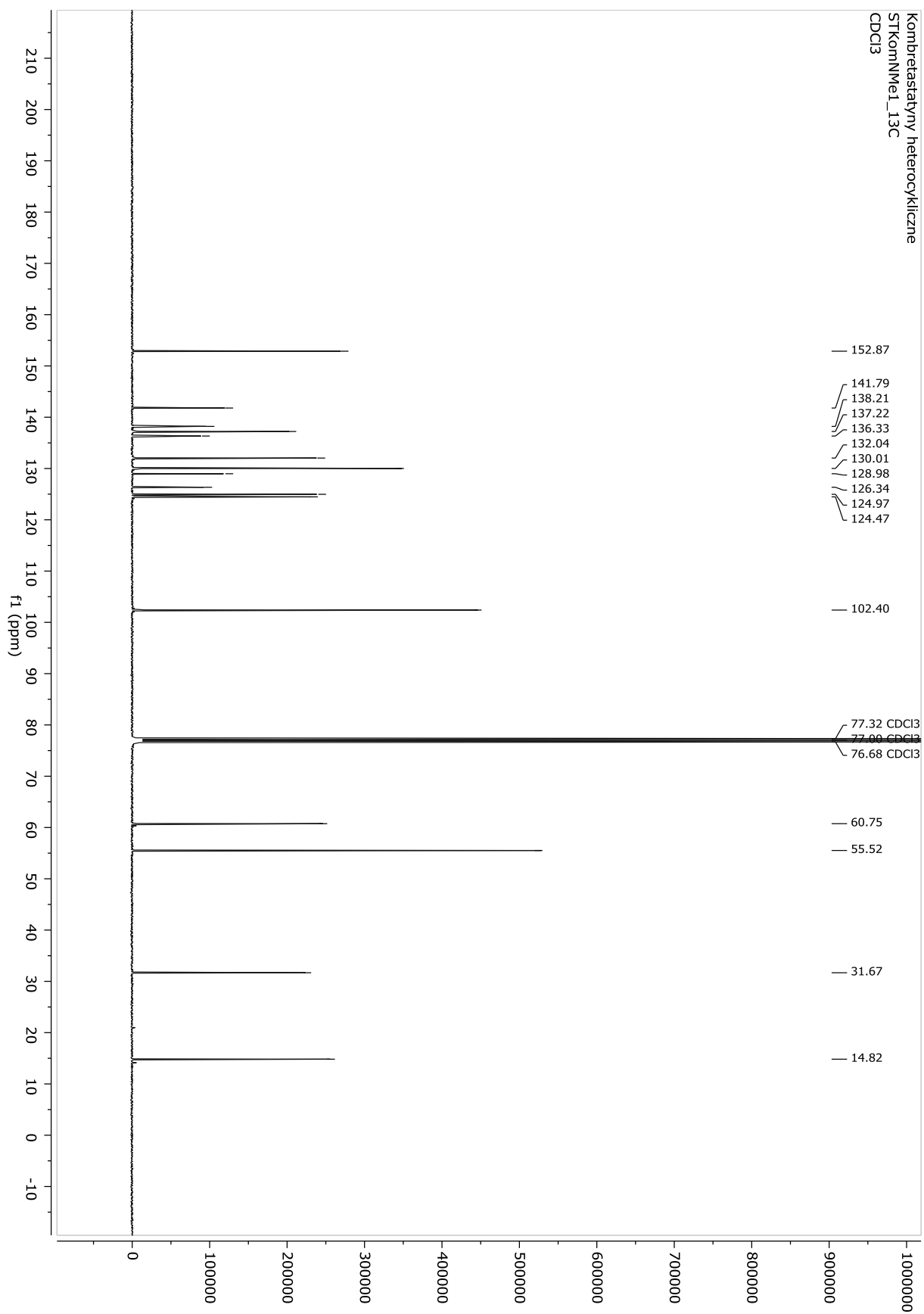


Tiopochodne N-metyloimidazolowe (KomNMeI)

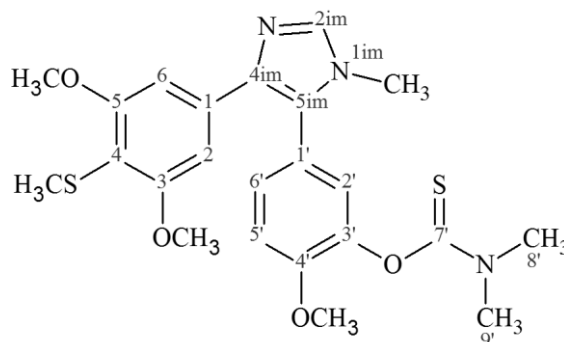
1-metylo-4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(2-metylotiofenylo)imidazol (KomNMeII)

H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	126.34
H-2, H-6	6.76 (s)	C-2, C-6	102.40
		C-3, C-5	152.87
OCH ₃	3.62 (s)	C-3-OCH ₃	55.52
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	138.21
OCH ₃	3.43 (s)	C-4-OCH ₃	60.75
H-2im	7.62 (s)	C-2im	141.79
		C-4im	130.01
		C-5im	130.01
		C-1'	128.98
		C-2'	136.33
SCH ₃	2.38 (s)	C-2'-SCH ₃	14.82
H-3'	7.28-7.22 (m)	C-3'	124.47
H-4'	7.28-7.22 (m)	C-4'	137.22
H-5'	7.49-7.43 (m)	C-5'	124.97
H-6'	7.32 (d, 8.0)	C-6'	132.04

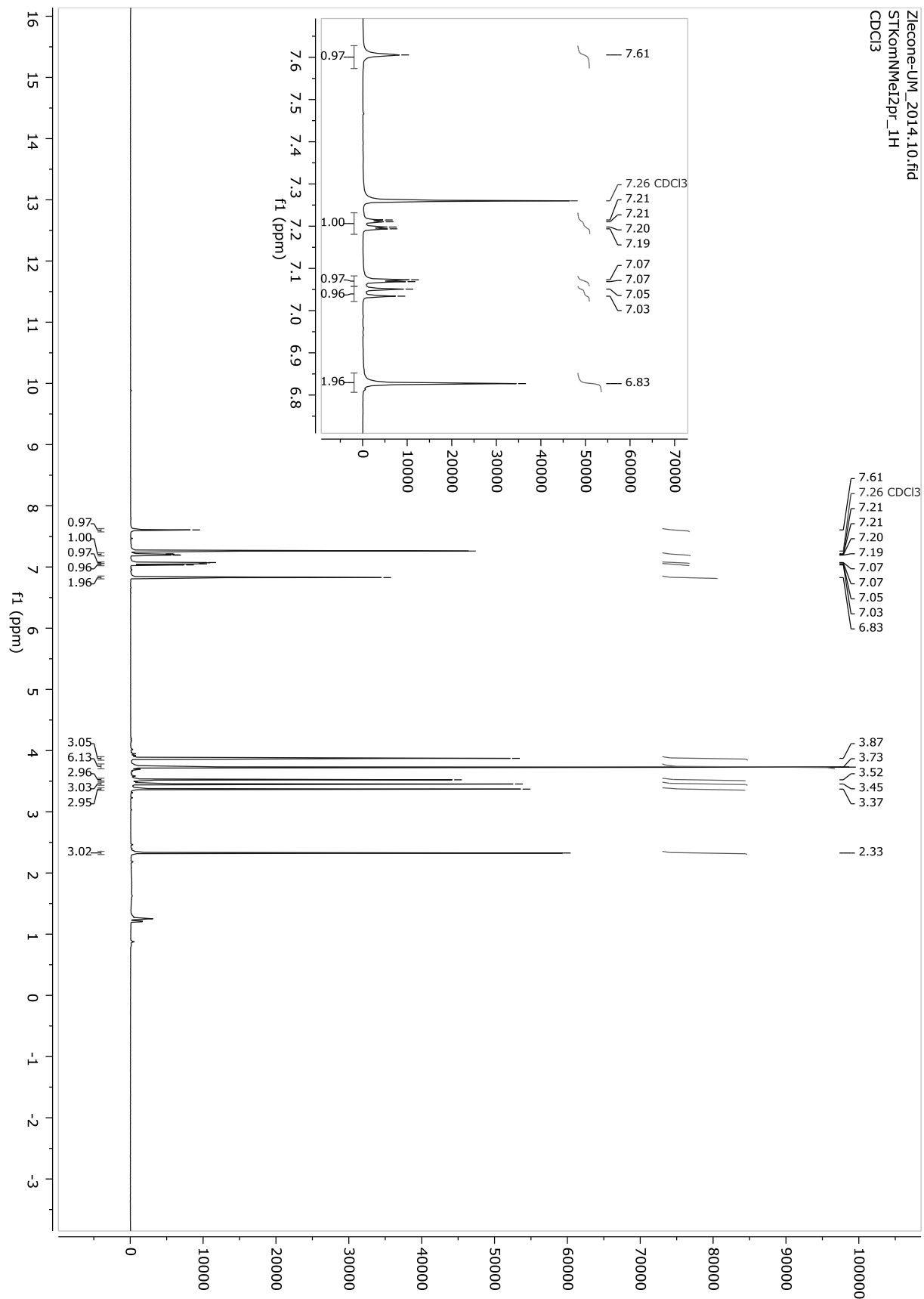


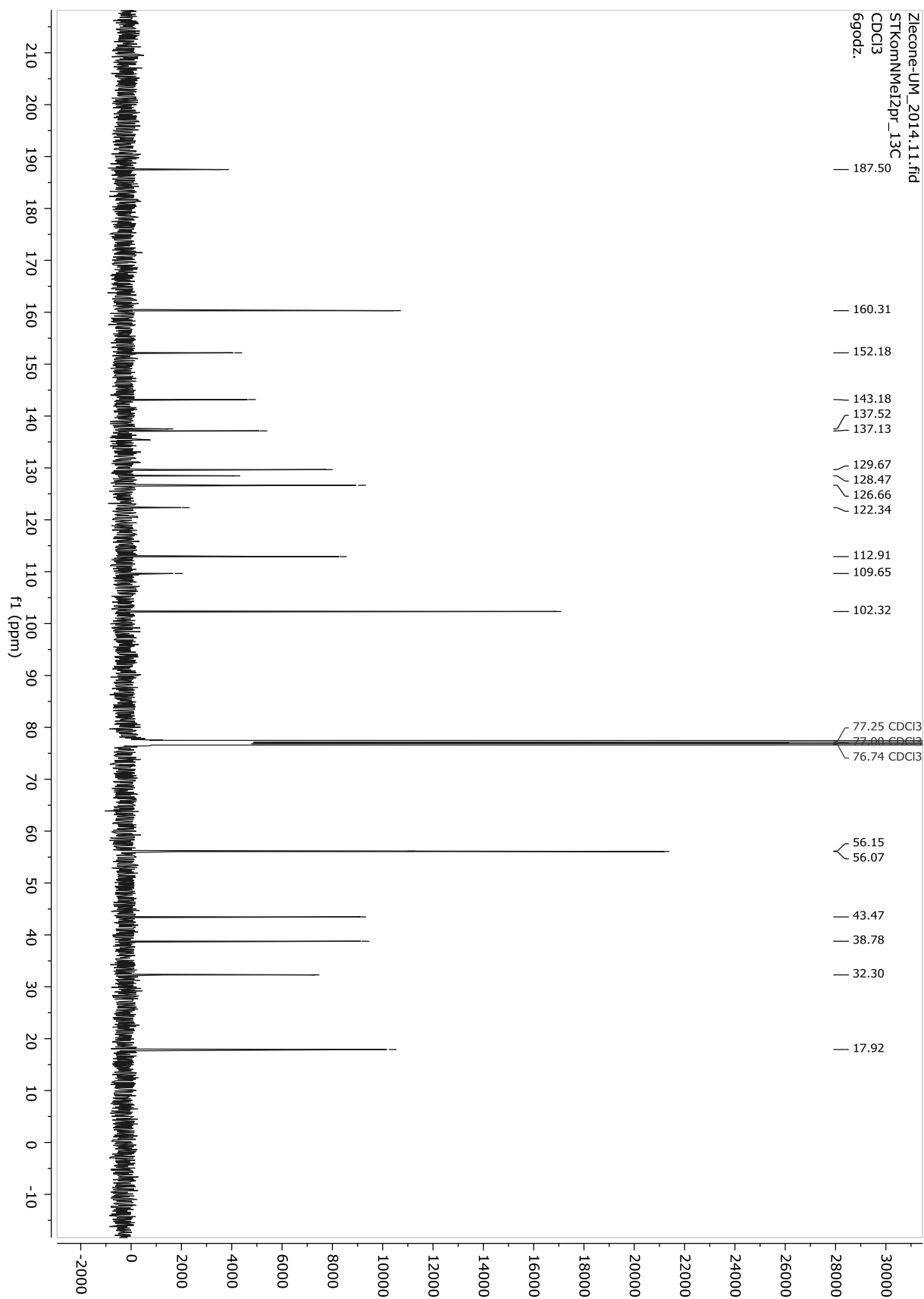


*1-metylo-4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(4-metoksy-3-N,N-dimetylotio-
karbamoilooksofenylo)imidazol (KomNMeI2pr)*

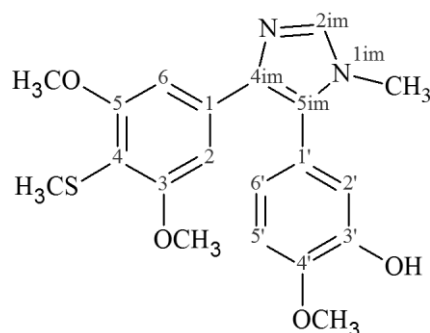


H	$\delta_H(\text{mult.}, J \text{ Hz})$	C	δ_C
		C-1	122.34
H-2, H-6	6.83 (s)	C-2, C-6	102.32
		C-3, C-5	160.31
OCH ₃		C-3-OCH ₃	56.07
OCH ₃	3.73 (s)	C-5-OCH ₃	56.07
		C-4	109.65
SCH ₃	2.33 (s)	C-4-SCH ₃	17.92
H-2im	7.61 (s)	C-2im	137.13
		C-4im	126.66
		C-5im	126.66
		C-1'	137.52
H-2'	7.07 (d, 2.1)	C-2'	128.47
		C-3'	143.18
		C-4'	152.18
OCH ₃	3.52 (s)	C-4'-OCH ₃	56.15
H-5'	7.04 (d, 8.4)	C-5'	112.91
H-6'	7.20 (d, 8.4, 2.1)	C-6'	129.67
		C7'	187.50
CH ₃	3.45 (s)	C8'	43.47
CH ₃	3.37 (s)	C9'	38.78

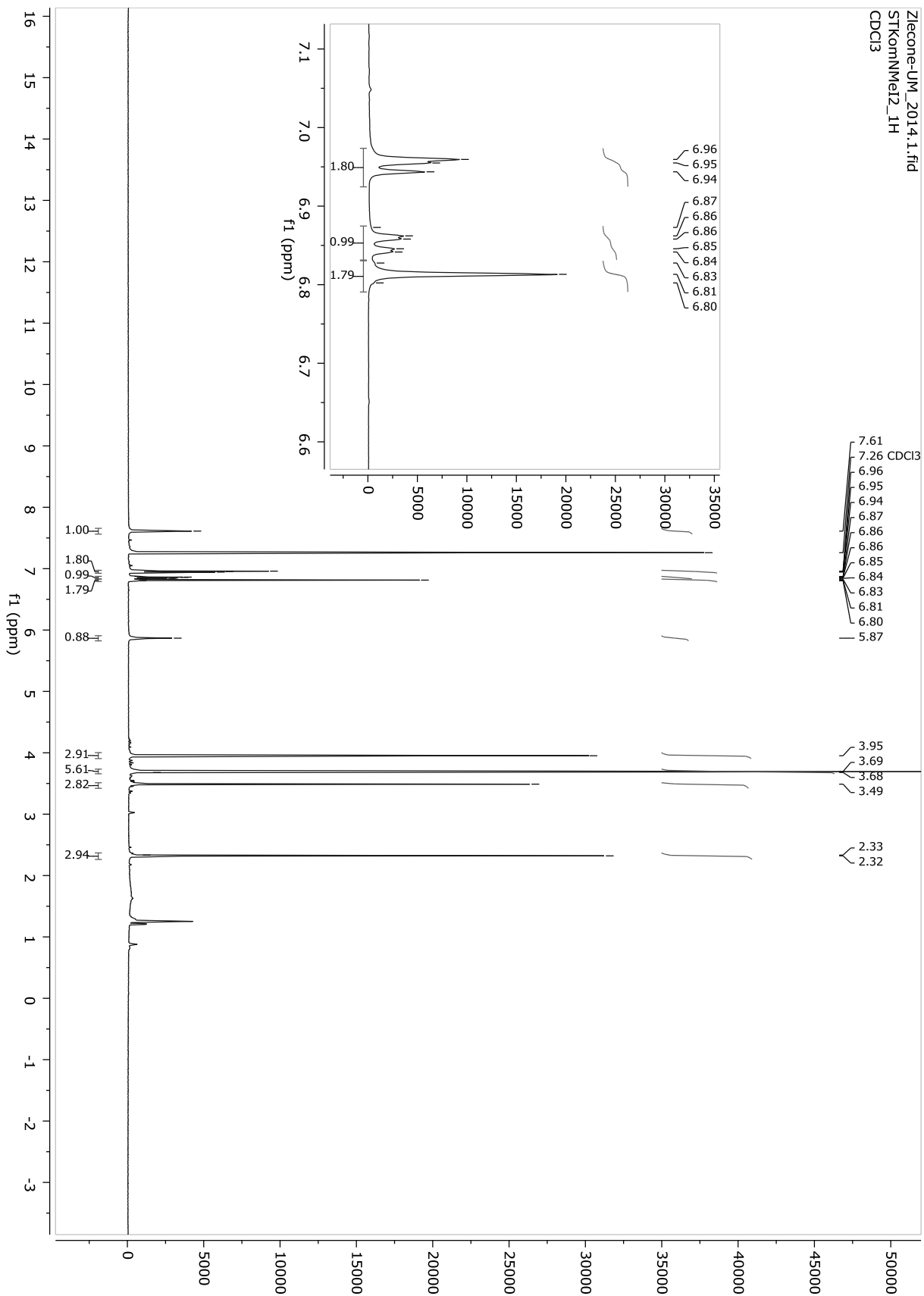


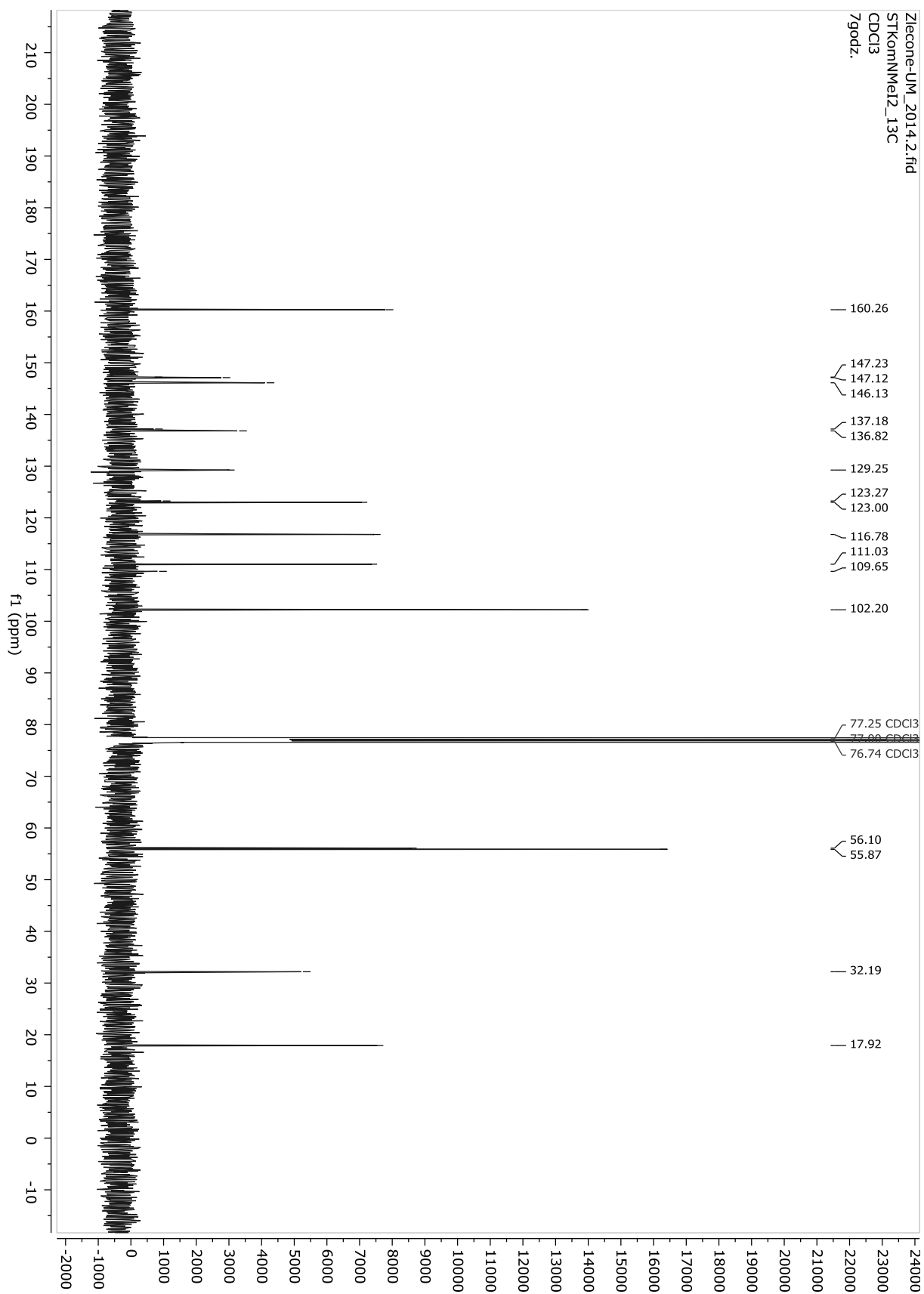


1-metylo-4-(3,5-dimetoksy-4-metylotiofenylo)-5-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)imidazol (KomNMeI2)

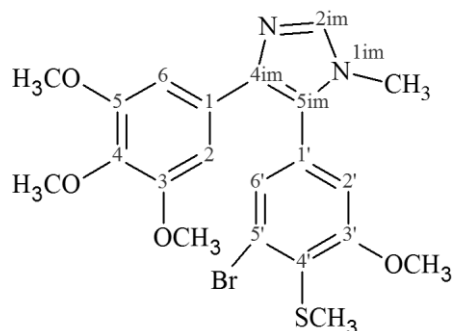


H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	129.25
H-2, H-6	6.81 (s)	C-2, C-6	102.20
		C-3, C-5	160.26
OCH ₃	3.69 (s)	C-3-OCH ₃	55.87
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	109.65
SCH ₃	2.32 (s)	C-4-SCH ₃	17.92
H-2im	7.61 (s)	C-2im	146.13
		C-4im	137.18
		C-5im	123.27
		C-1'	136.82
H-2'	6.97-6.92 (m)	C-2'	116.78
		C-3'	147.12
		C-4'	147.23
OCH ₃		C-4'-OCH ₃	56.10
	6.85		
H-5'	(d, 8.2, 2.1)	C-5'	111.03
H-6'	6.97-6.92 (m)	C-6'	123.00

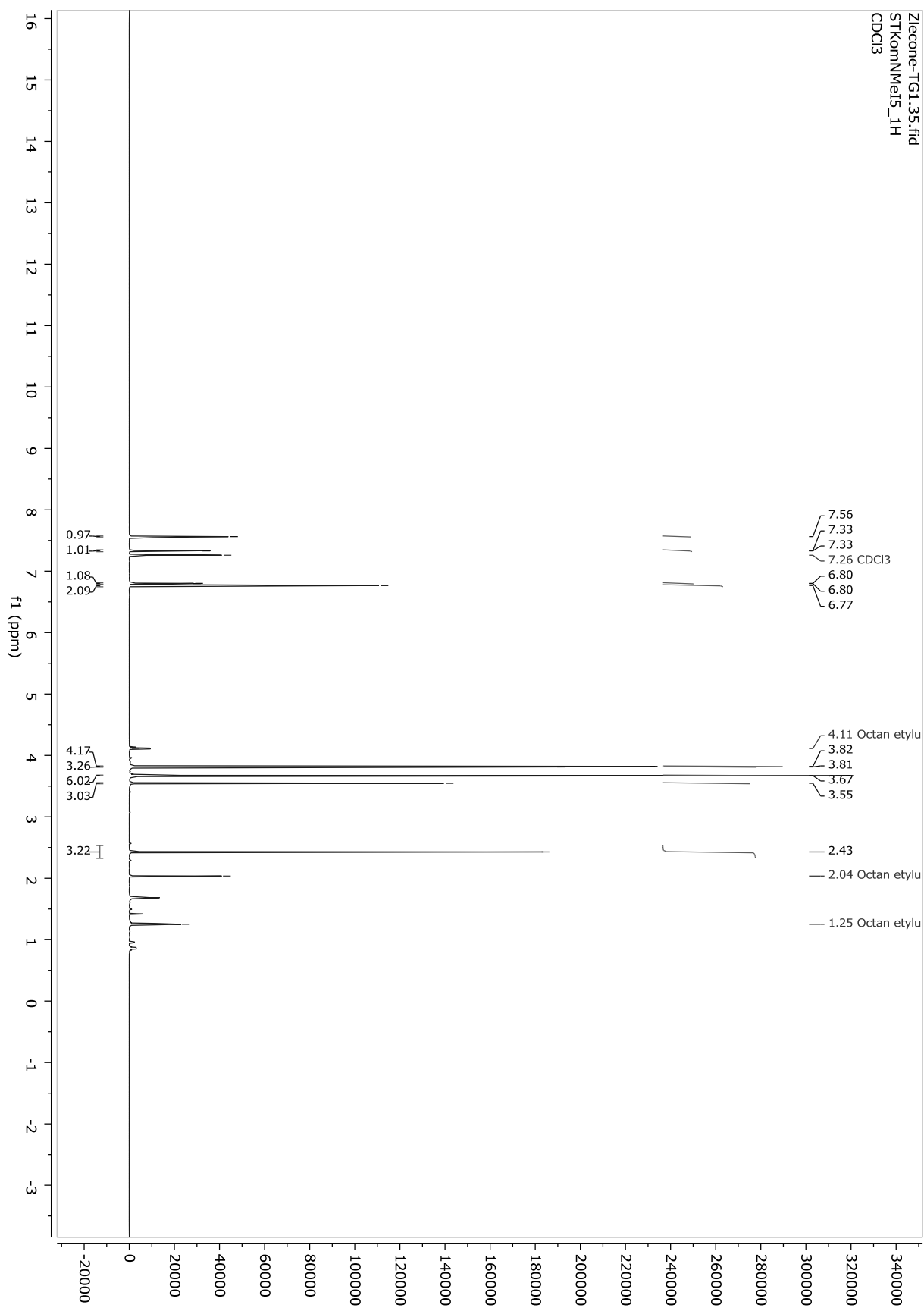


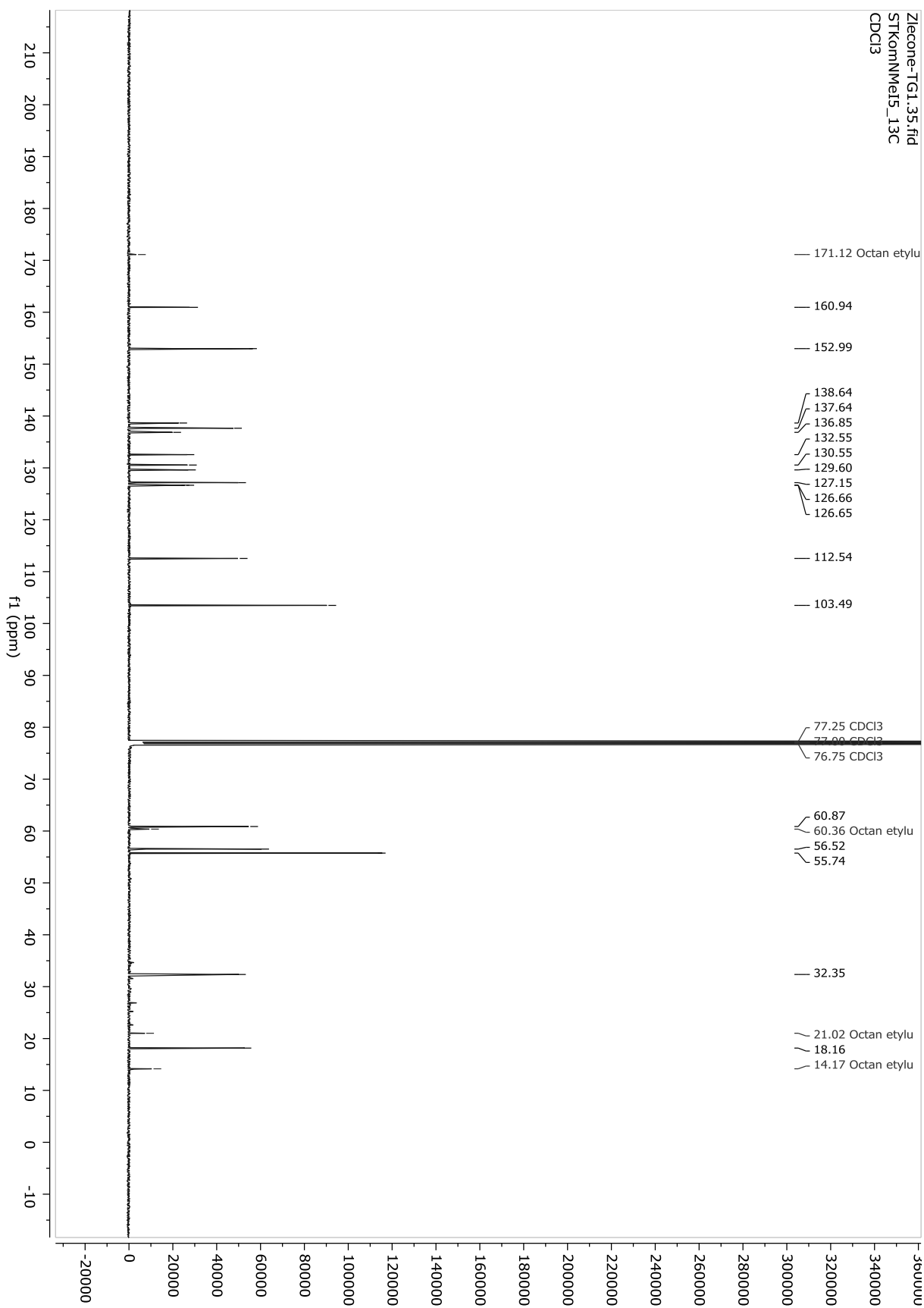


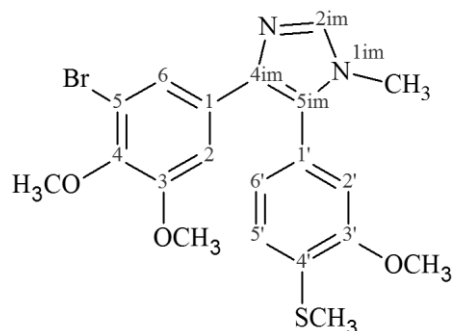
1-metylo-4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-5-(5-bromo-3-metoksy-4-metylotiofenylo)imidazol
(KomNMeI5)



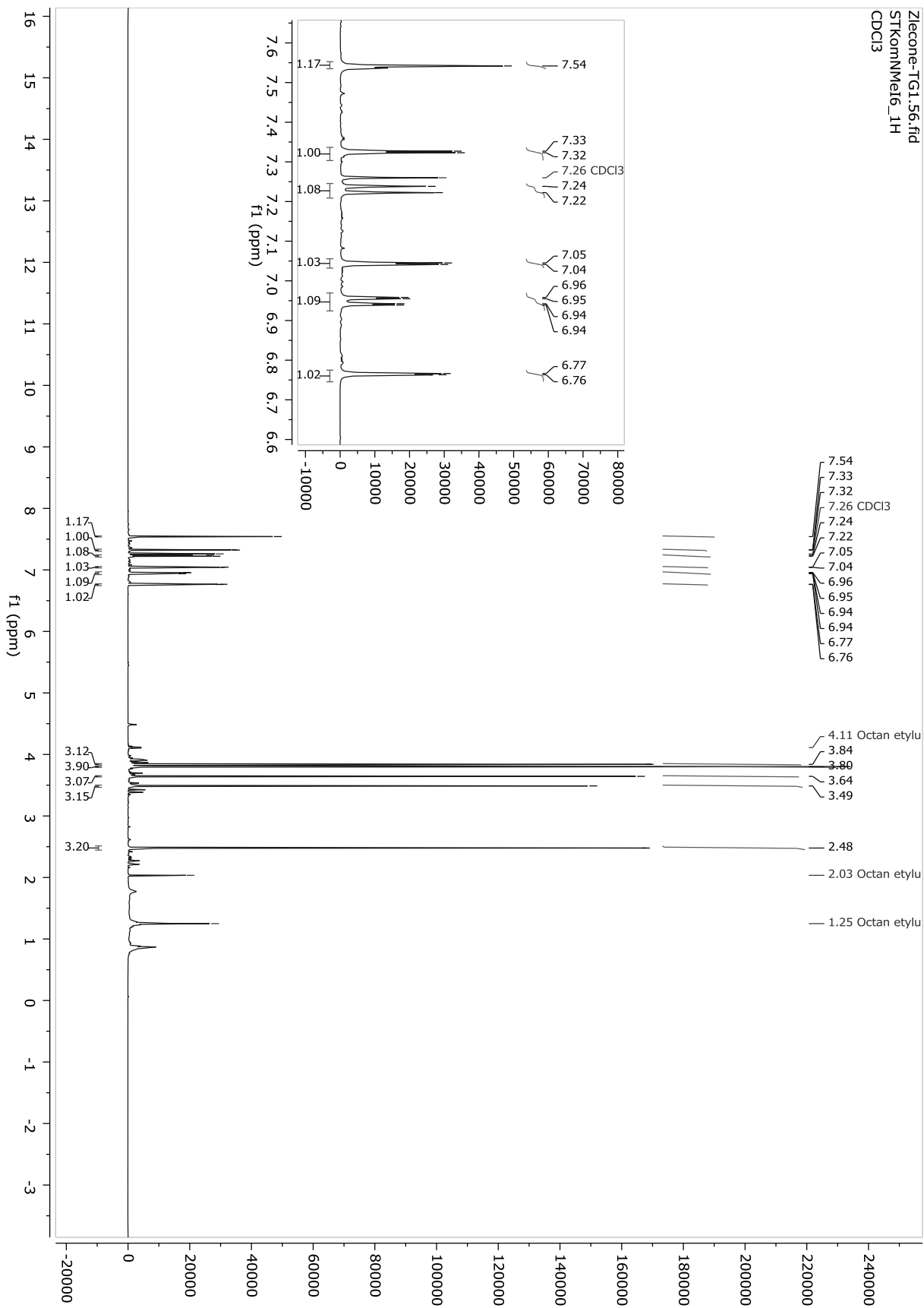
H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	127.15
H-2, H-6	6.77 (s)	C-2, C-6	105.26
		C-3, C-5	103.49
OCH ₃	3.67 (s)	C-3-OCH ₃	55.74
OCH ₃		C-5-OCH ₃	
		C-4	138.64
OCH ₃	3.55 (s)	C-4-OCH ₃	60.87
H-2im	7.56 (s)	C-2im	137.64
		C-4im	132.55
		C-5im	130.55
		C-1'	126.65
H-2'	6.80 (d, 1.3)	C-2'	112.54
		C-3'	160.94
OCH ₃	3.81 (s)	C-3'-OCH ₃	56.52
		C-4'	
SCH ₃	2.43 (s)	C-4'-SCH ₃	18.16
		C-5'	
H-6'	7.33 (d, 1.2)	C-6'	126.66

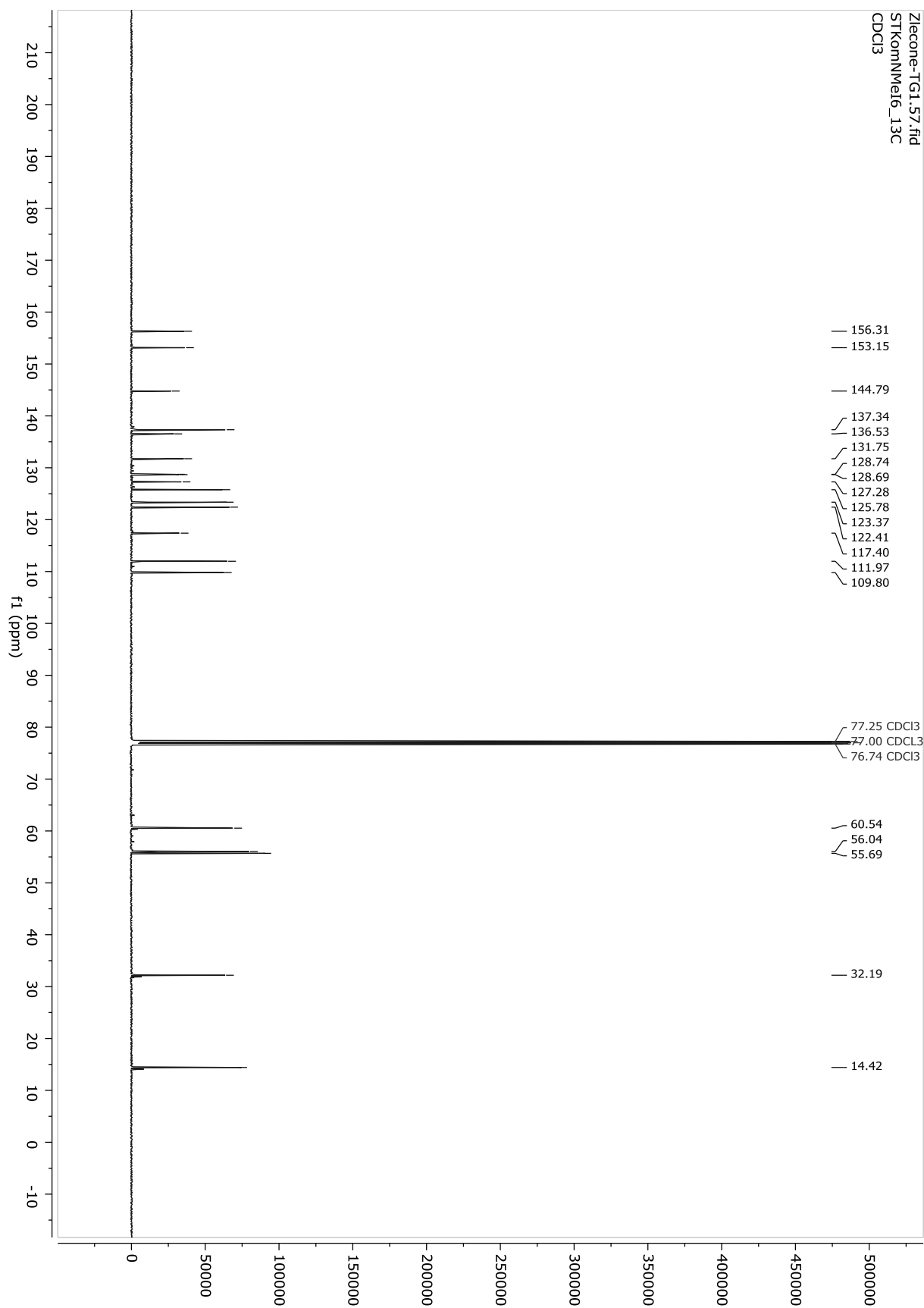




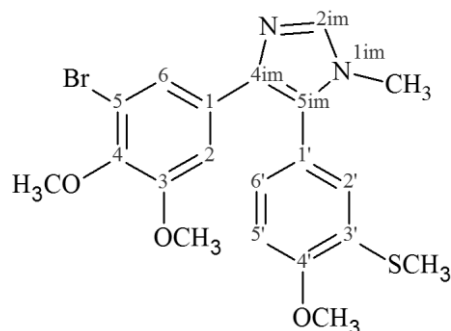
*1-metylo-4-(5-bromo-3,4-dimetoksyfenylo)-5-(3-metoksy-4-metylotiofenylo)imidazol**(KomNMeI6)*

H	δ_H (mult., J Hz)	C	δ_C
		C-1	128.69
H-2	7.04 (d, 1.9)	C-2	111.97
		C-3	153.15
OCH ₃	3.80 (s)	C-3-OCH ₃	55.69
		C-4	144.79
OCH ₃	3.64 (s)	C-4-OCH ₃	60.54
		C-5	117.40
H-6	7.33 (d, 2.0)	C-6	125.78
H-2im	7.54 (s)	C-2im	137.34
		C-4im	136.53
		C-5im	131.75
		C-1'	128.744
H-2'	6.76 (d, 1.6)	C-2'	109.80
		C-3'	156.31
OCH ₃	3.49 (s)	C-3'-OCH ₃	56.04
		C-4'	127.28
SCH ₃	2.48 (s)	C-4'-SCH ₃	14.42
H-5'	7.23 (d, 7.9)	C-5'	123.37
H-6'	6.95 (d, 7.9, 1.7)	C-6'	122.41

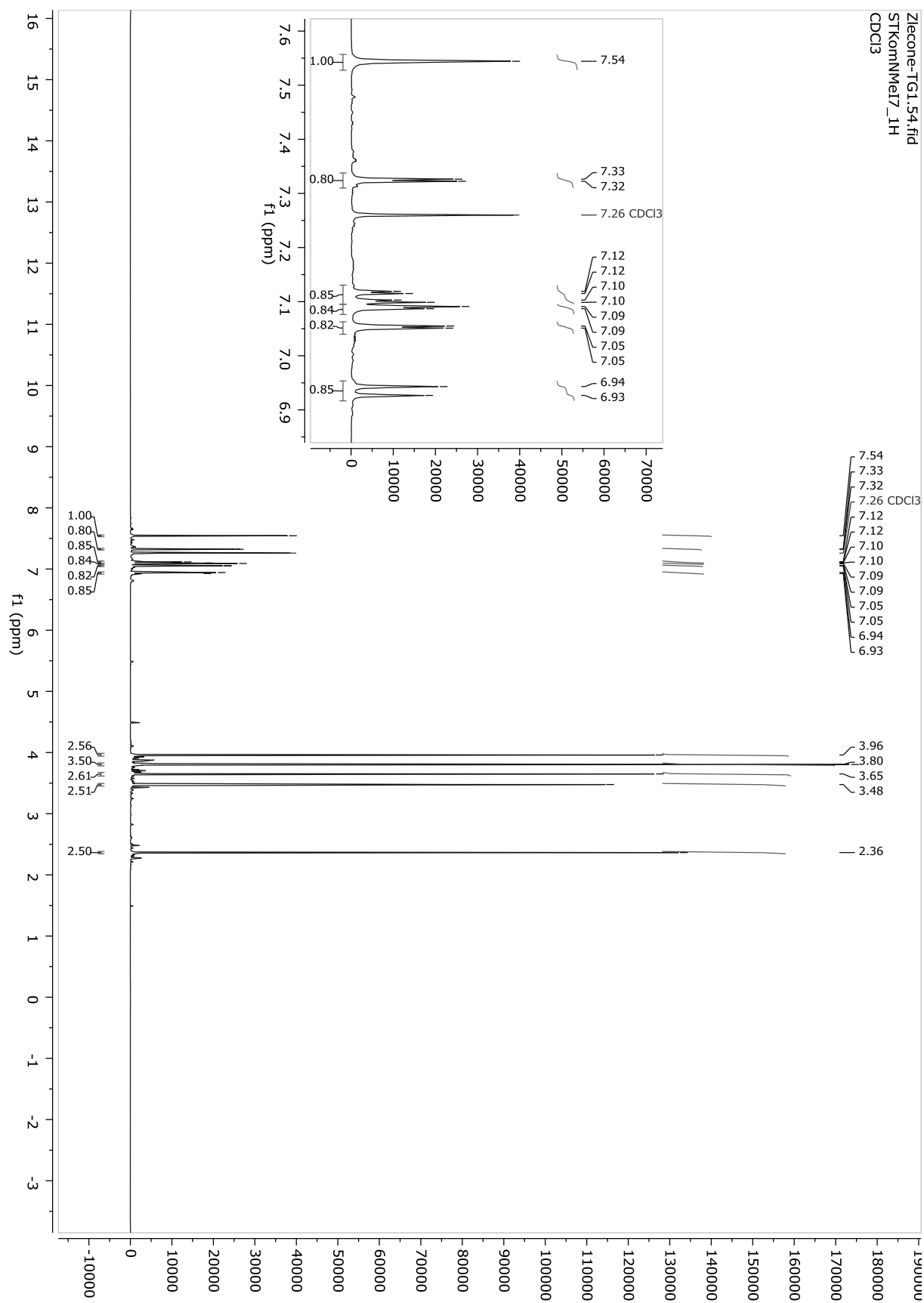


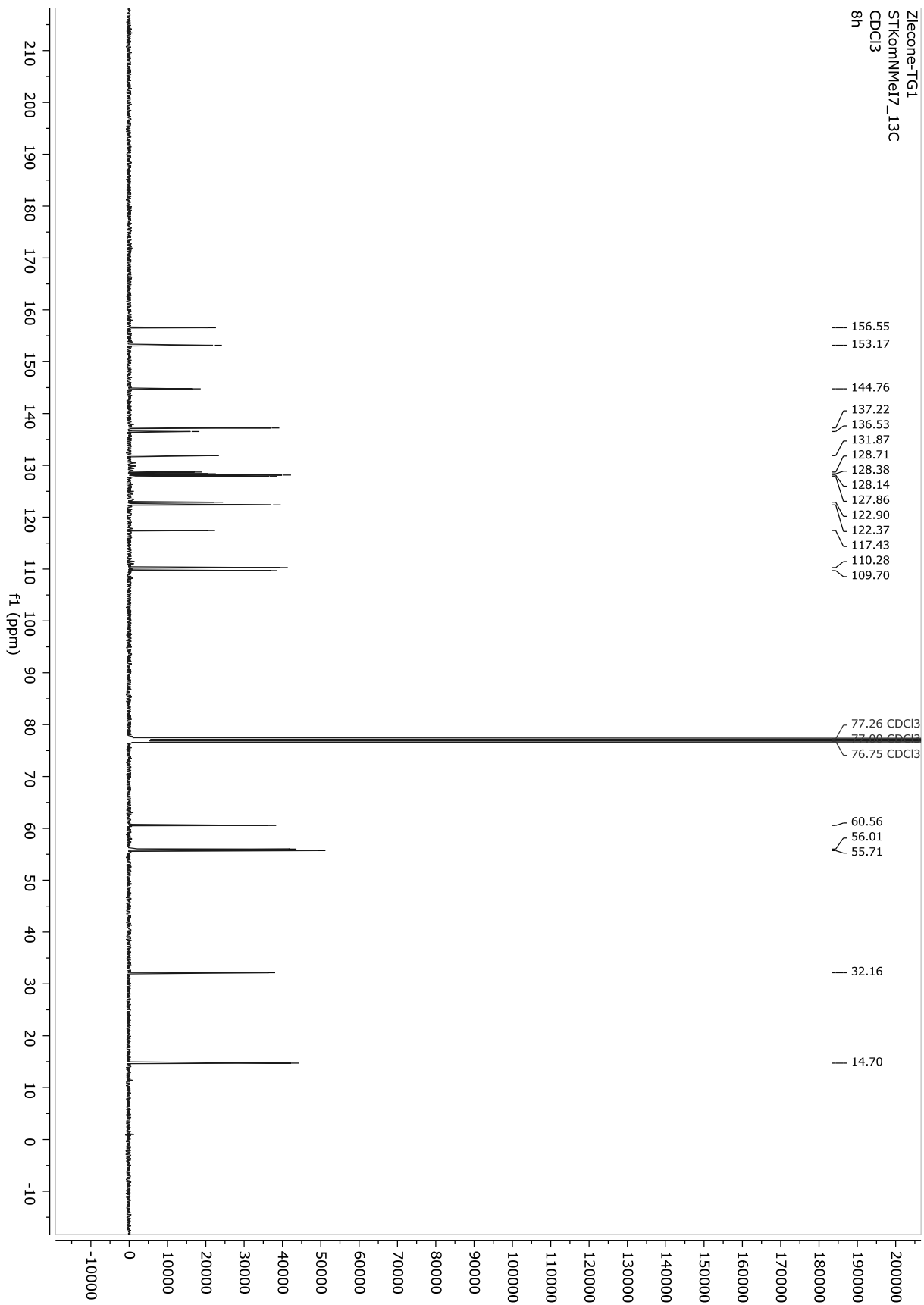


1-metylo-4-(5-bromo-3,4-dimetoksyfenylo)-5-(4-metoksy-3-metylotiofenylo)imidazol
(KomNMeI7)

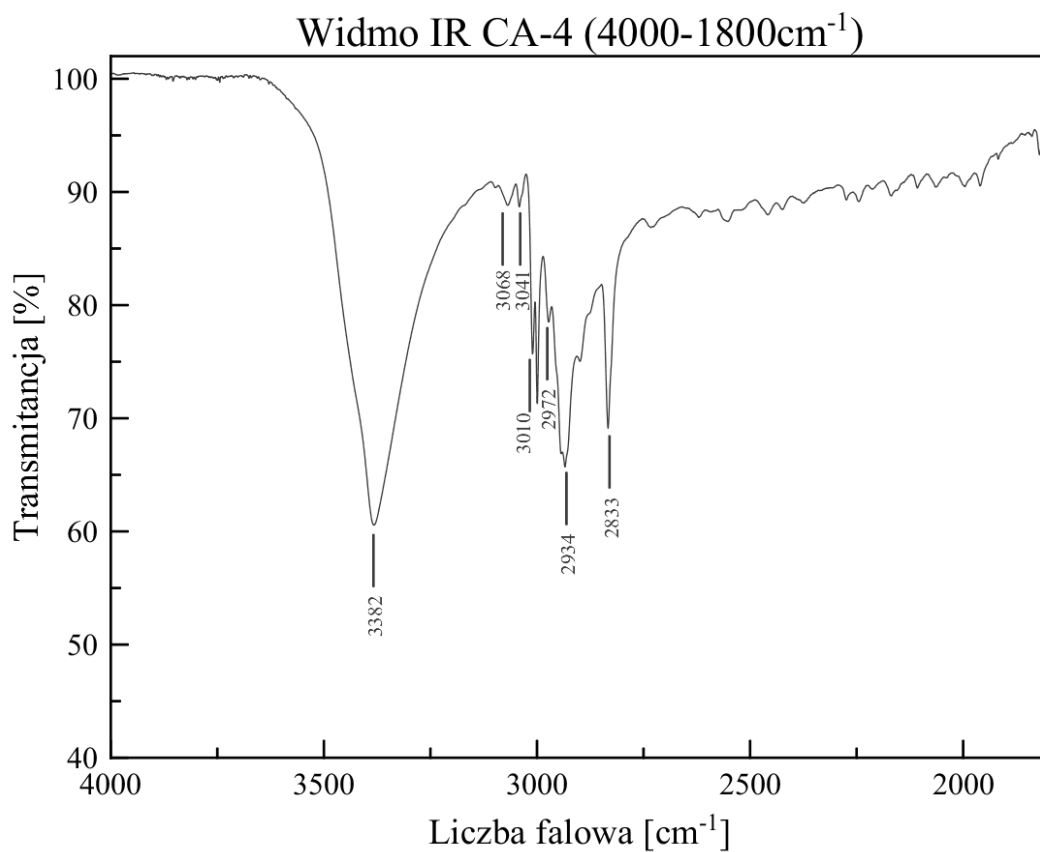
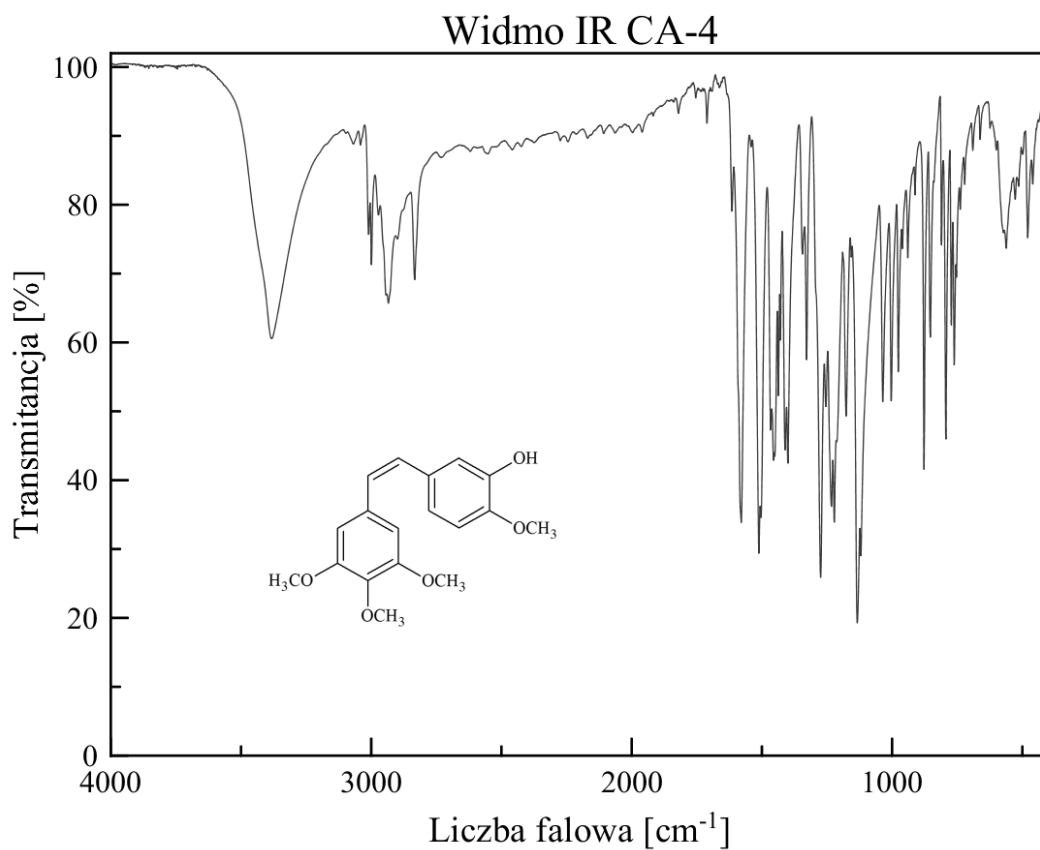


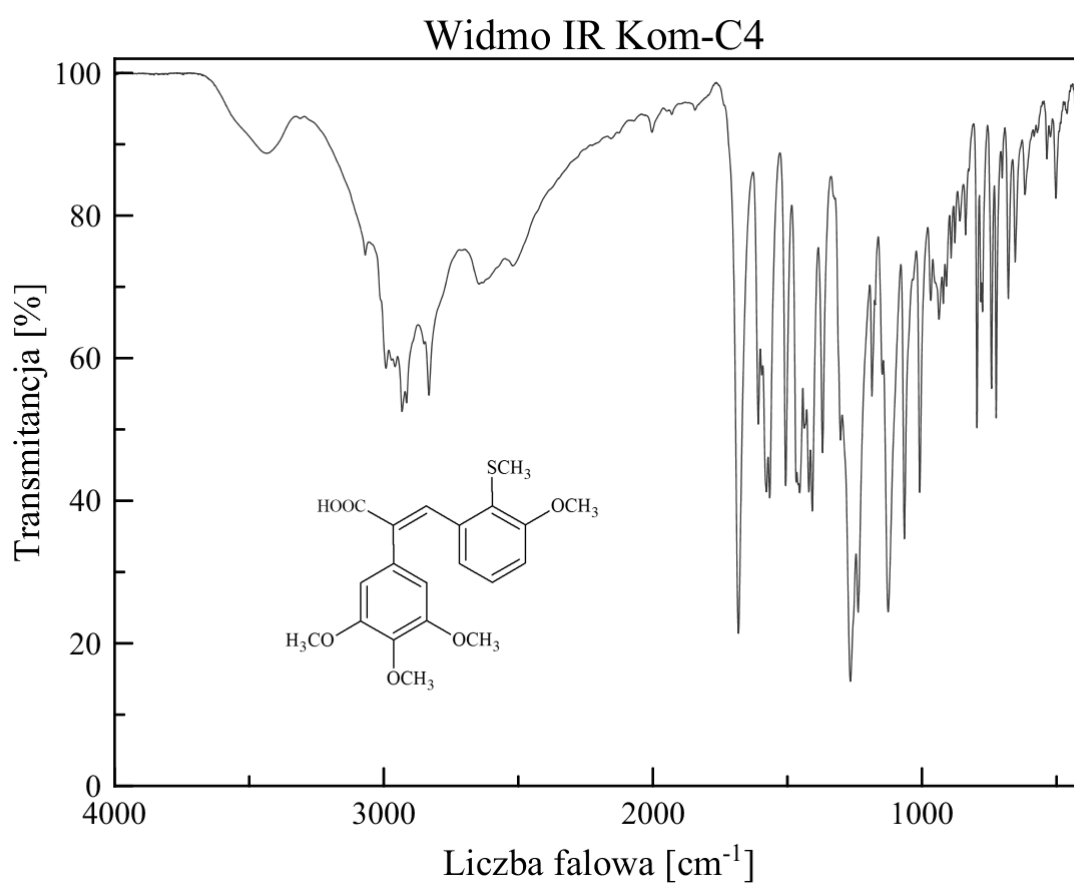
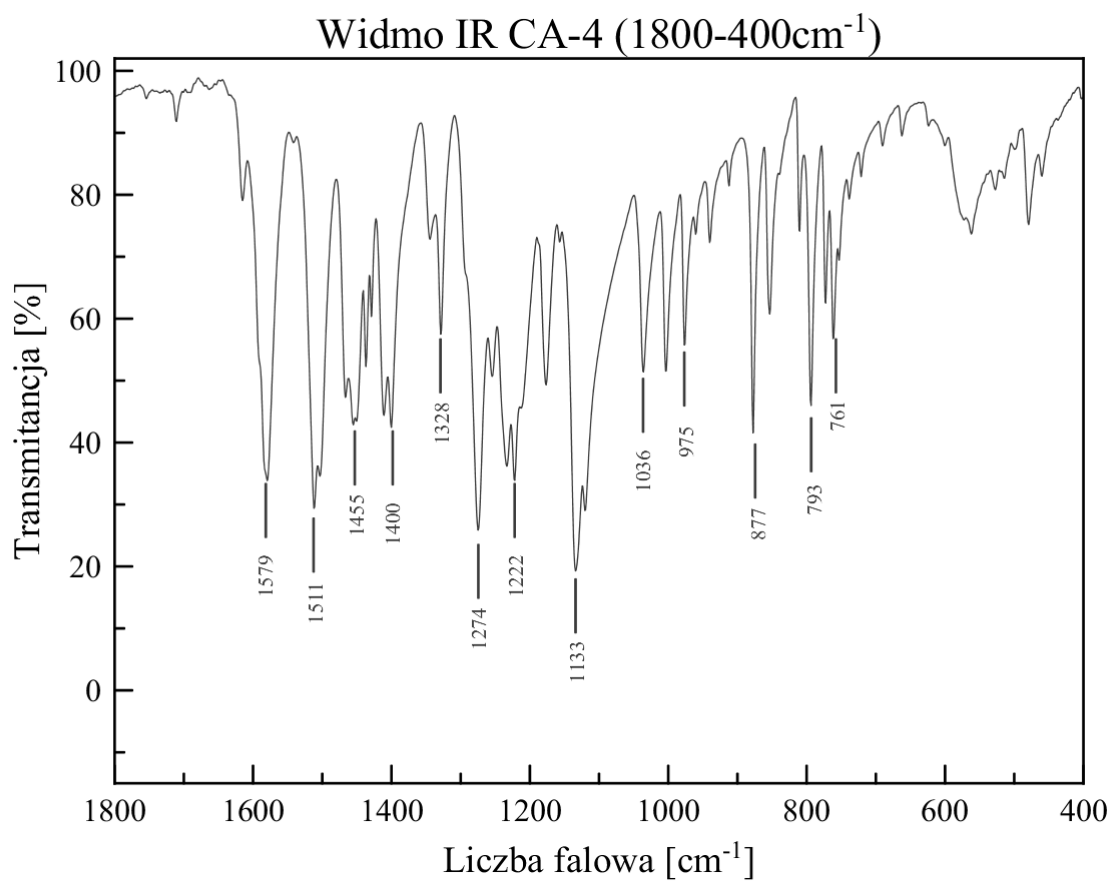
H	δ_{H} (mult., J Hz)	C	δ_{C}
		C-1	128.38
H-2	7.05 (d, 1.6)	C-2	109.70
		C-3	156.55
OCH ₃	3.80 (s)	C-3-OCH ₃	55.71
		C-4	144.76
OCH ₃	3.65 (s)	C-4-OCH ₃	60.56
		C-5	117.43
H-6	7.09 (d, 1.6)	C-6	127.86
H-2im	7.54 (s)	C-2im	137.22
		C-4im	136.53
		C-5im	131.87
		C-1'	128.71
H-2'	7.32 (d, 1.6)	C-2'	128.14
		C-3'	122.90
SCH ₃	2.36 (s)	C-3'-SCH ₃	14.70
		C-4'	153.17
OCH ₃	3.48 (s)	C-4'-OCH ₃	56.01
H-5'	6.93 (d, 6.5)	C-5'	110.28
H-6'	7.11 (dd, 6.5, 1.7)	C-6'	122.37

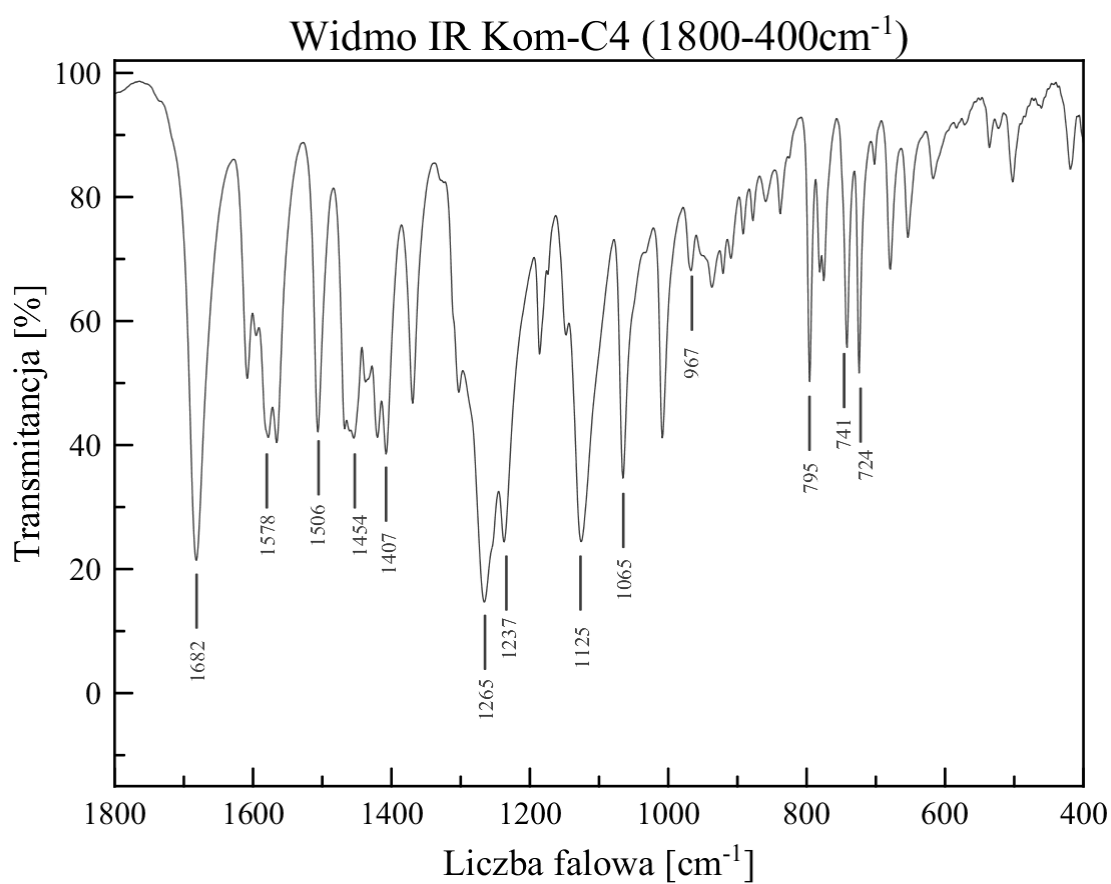
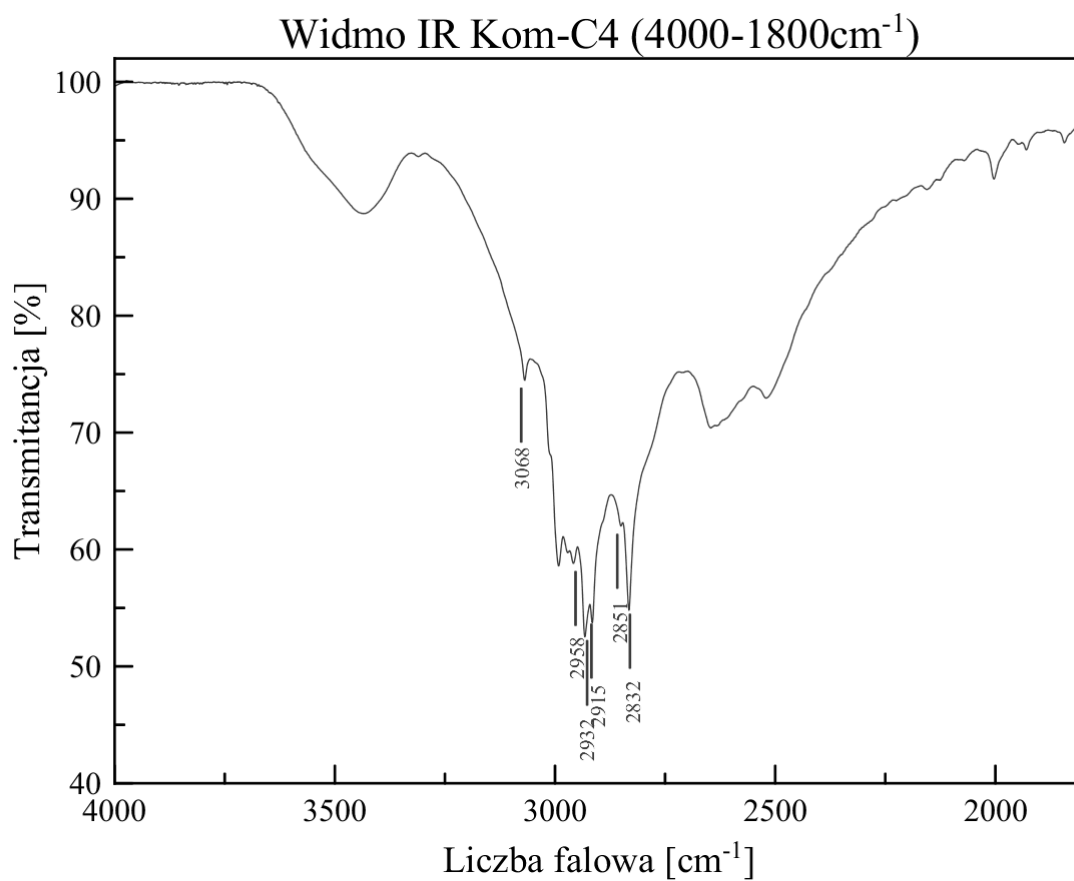




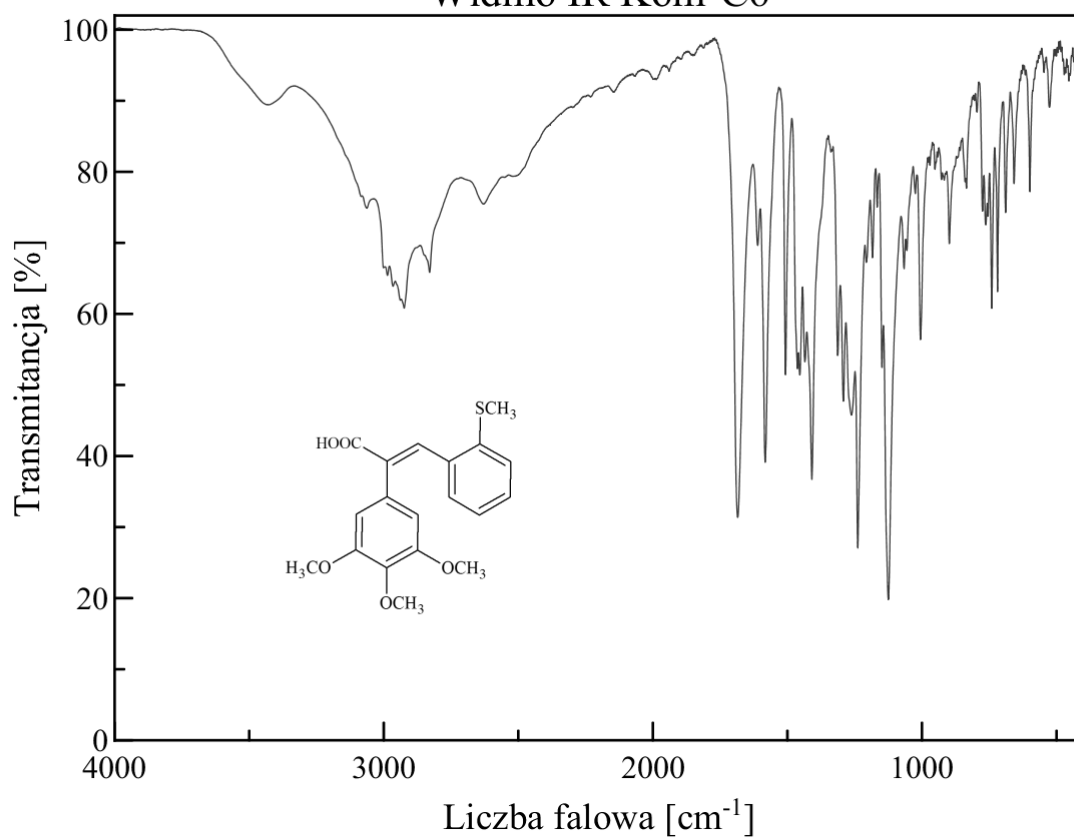
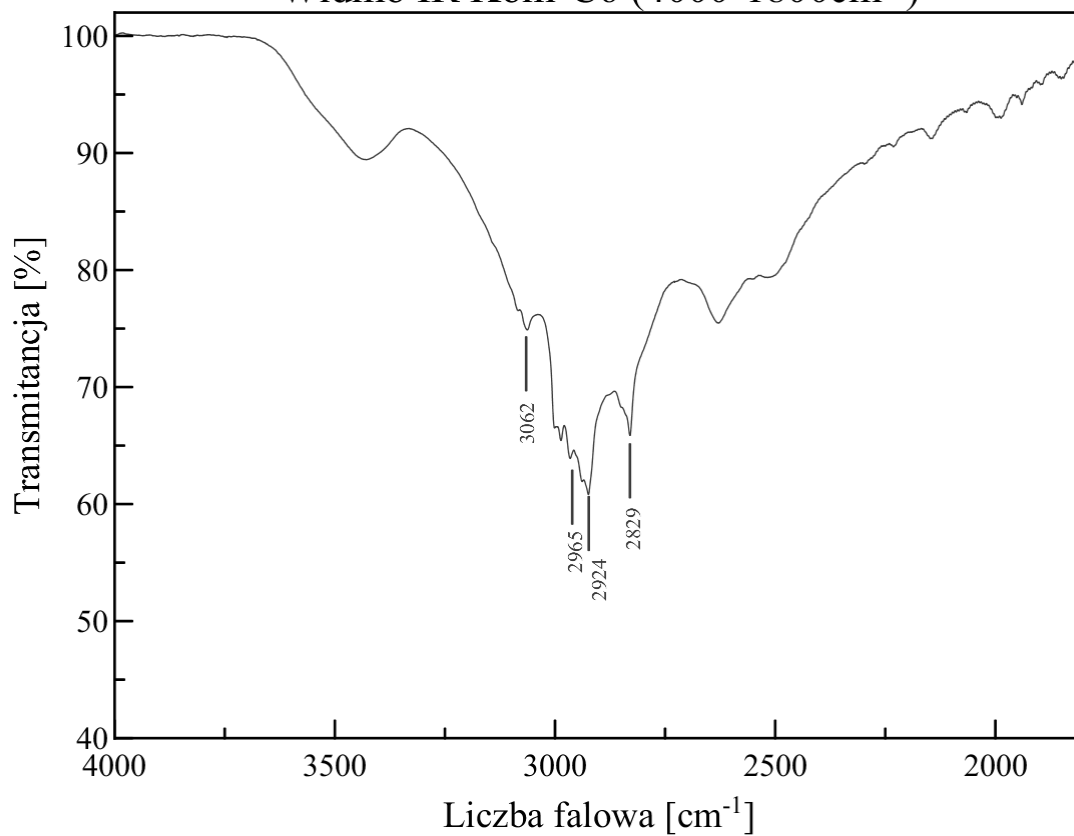
B. FT IR

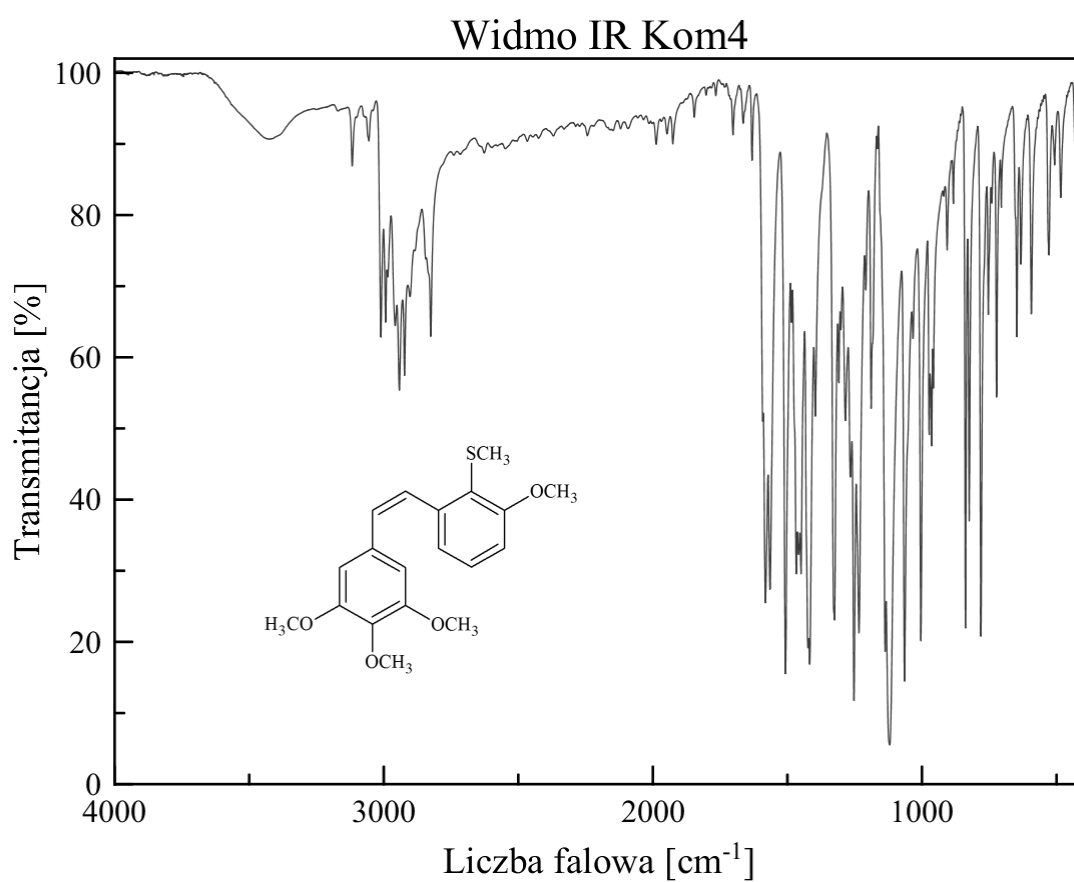
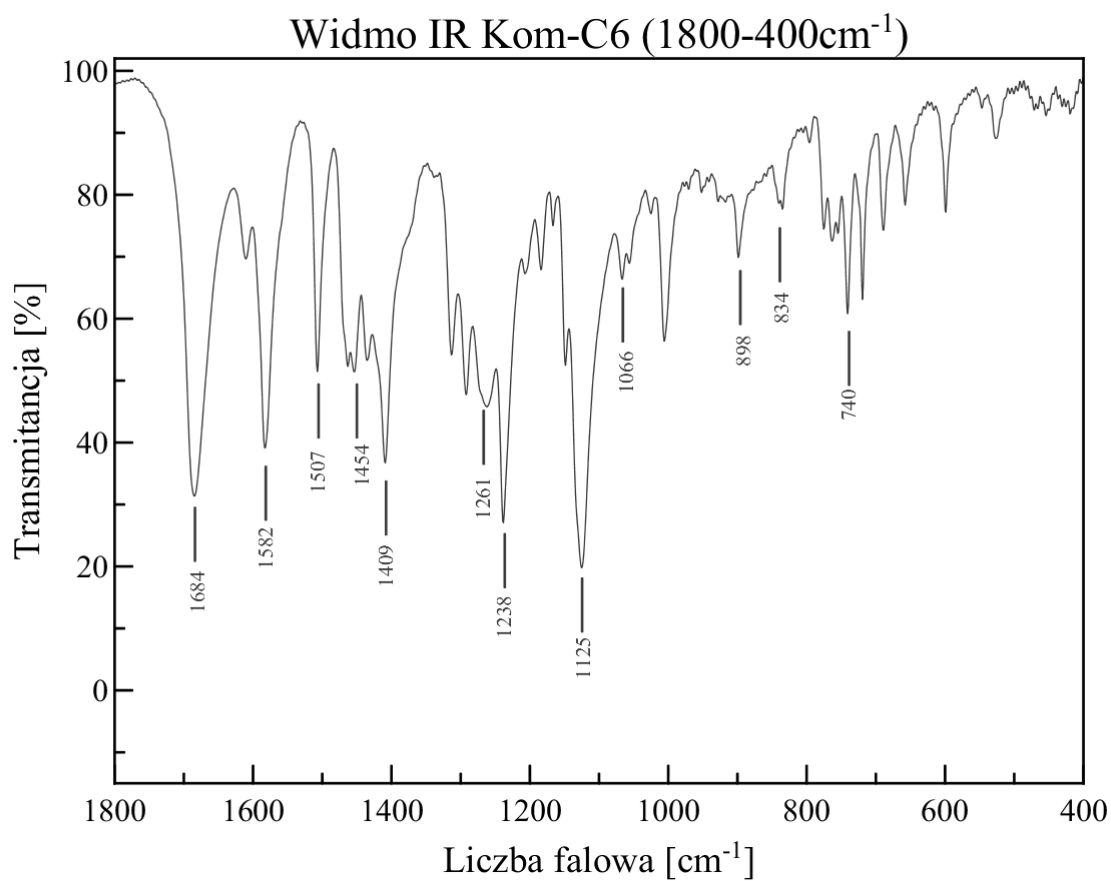


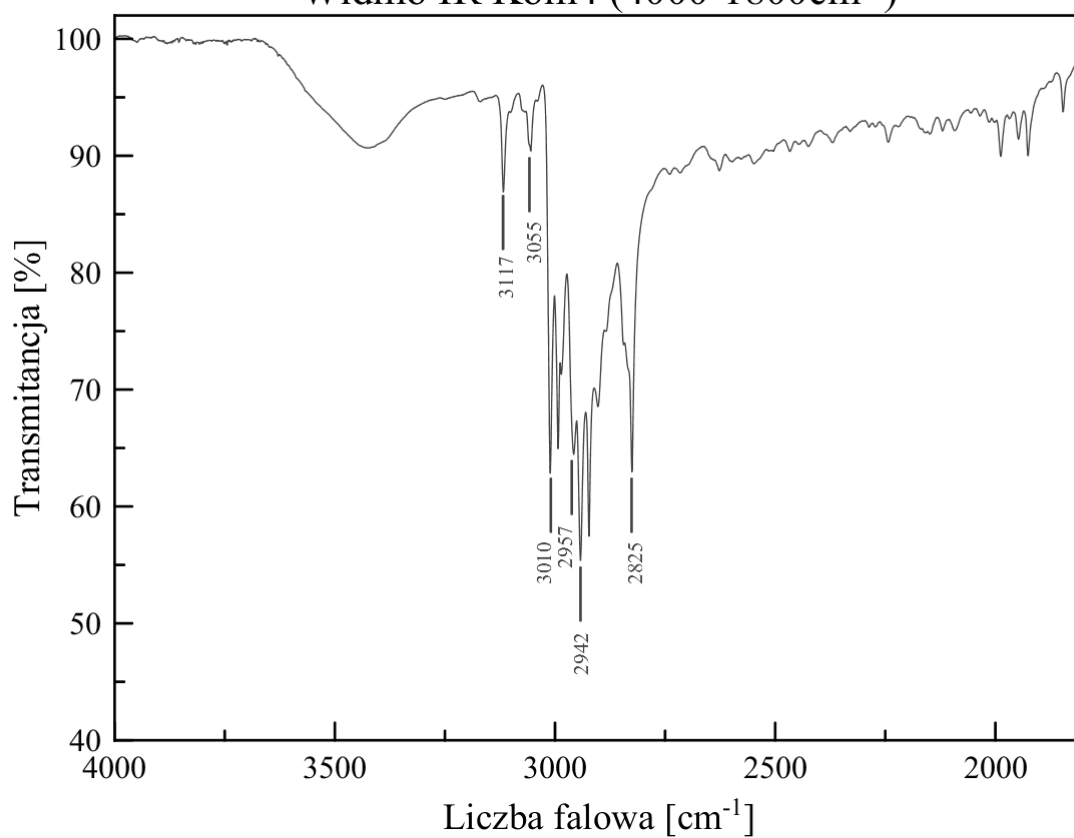
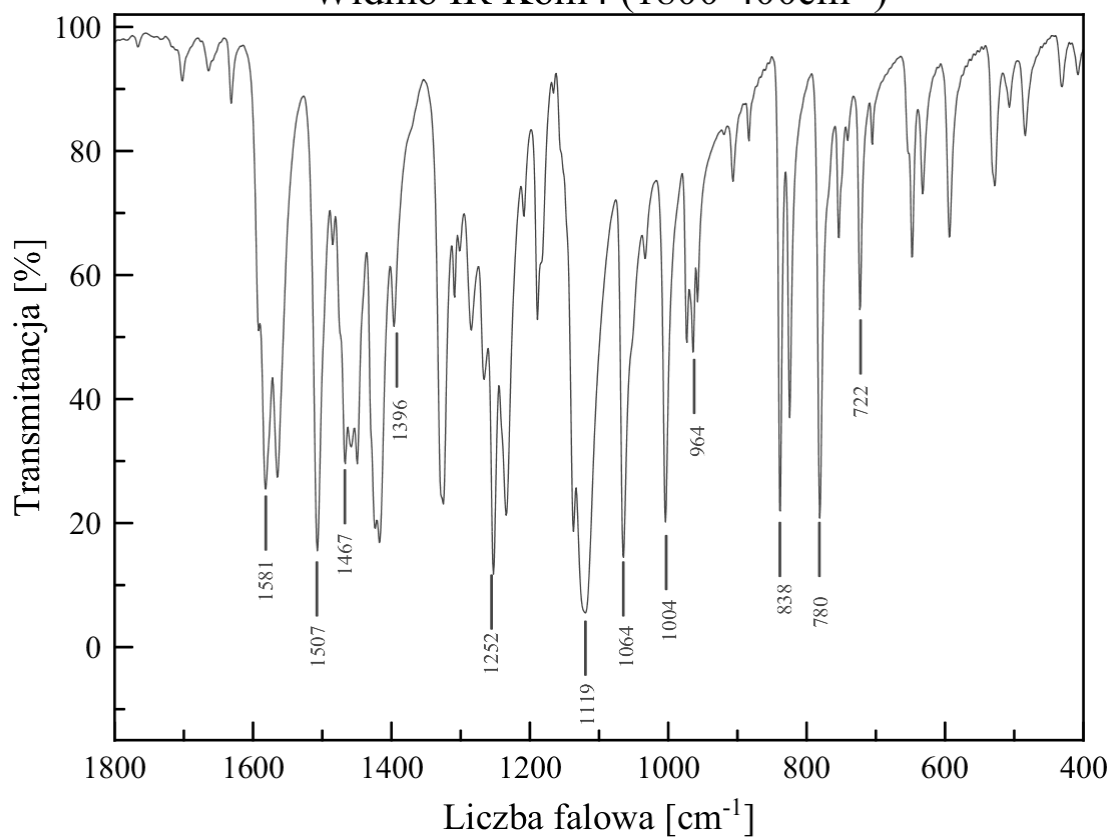


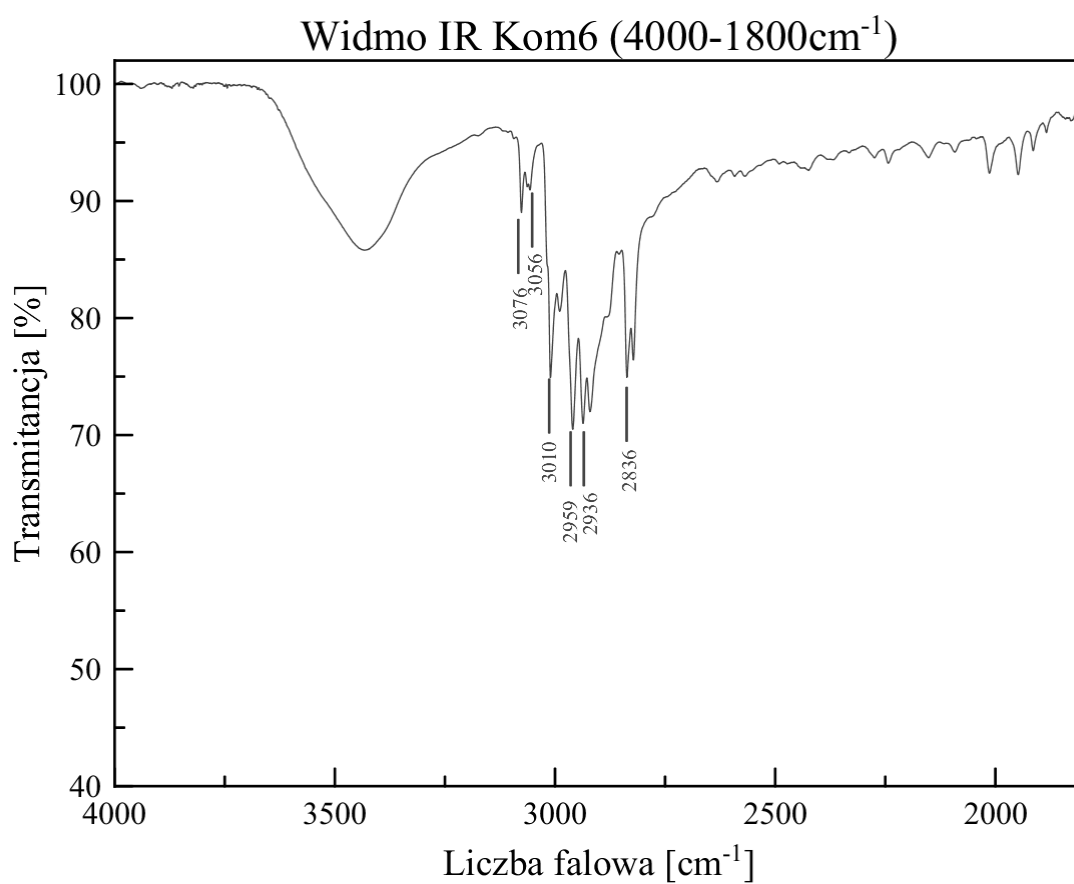
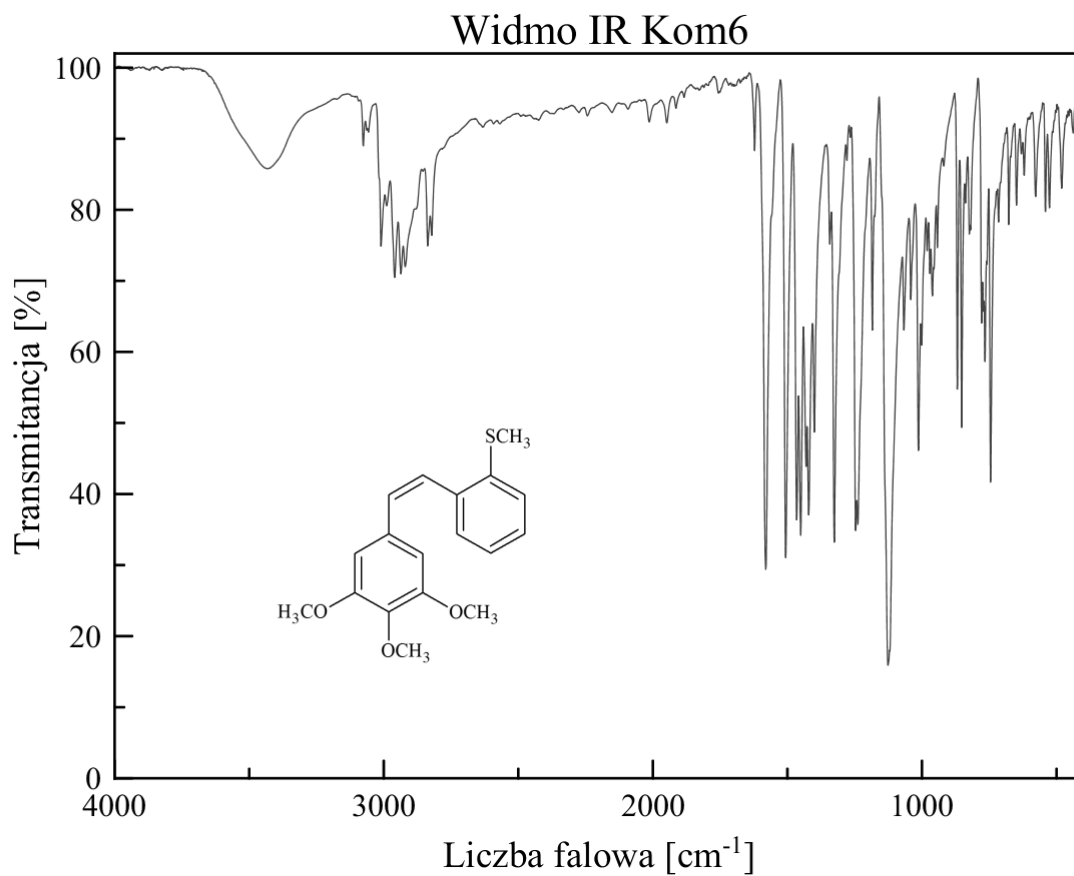


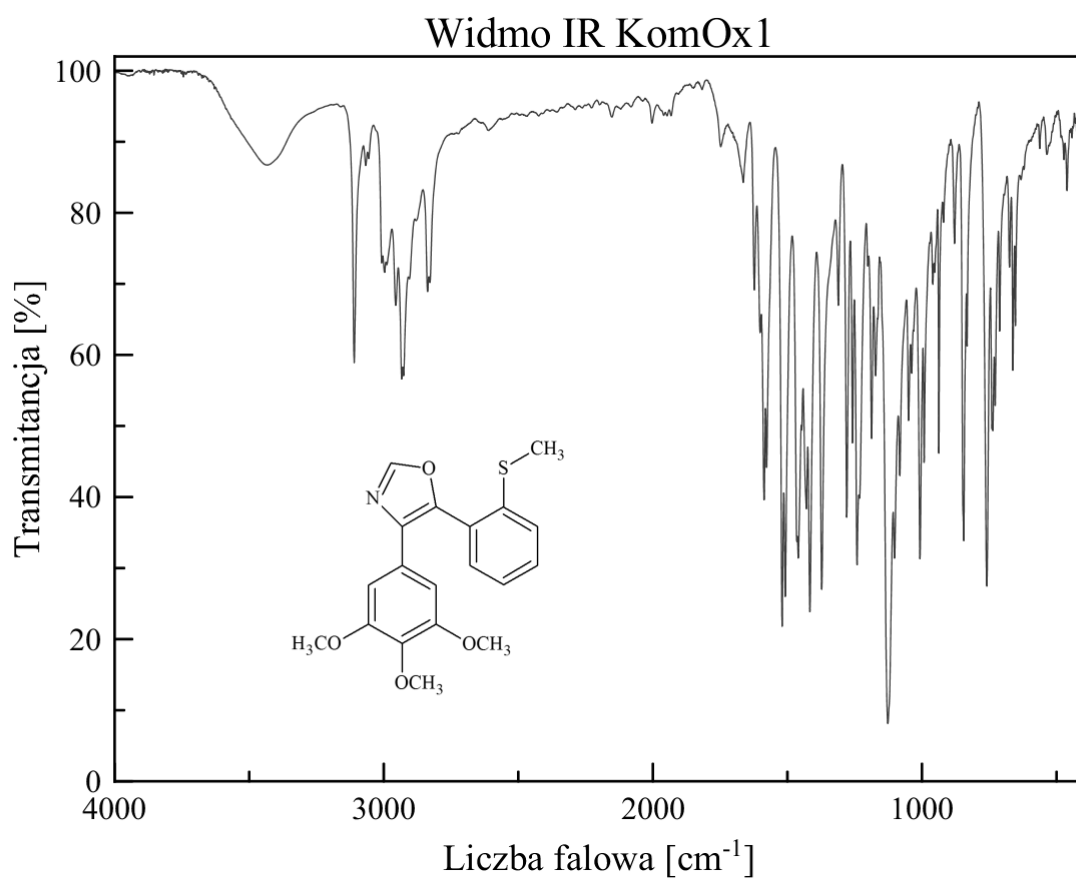
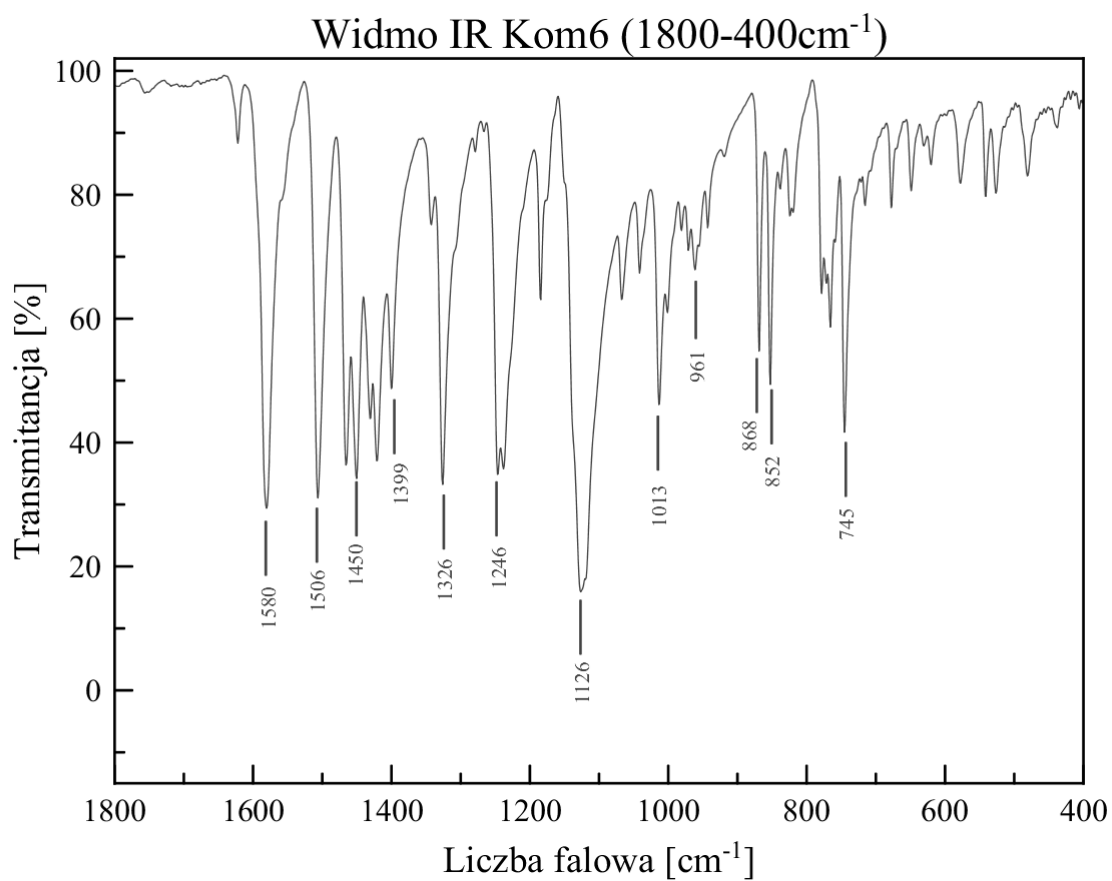
Widmo IR Kom-C6

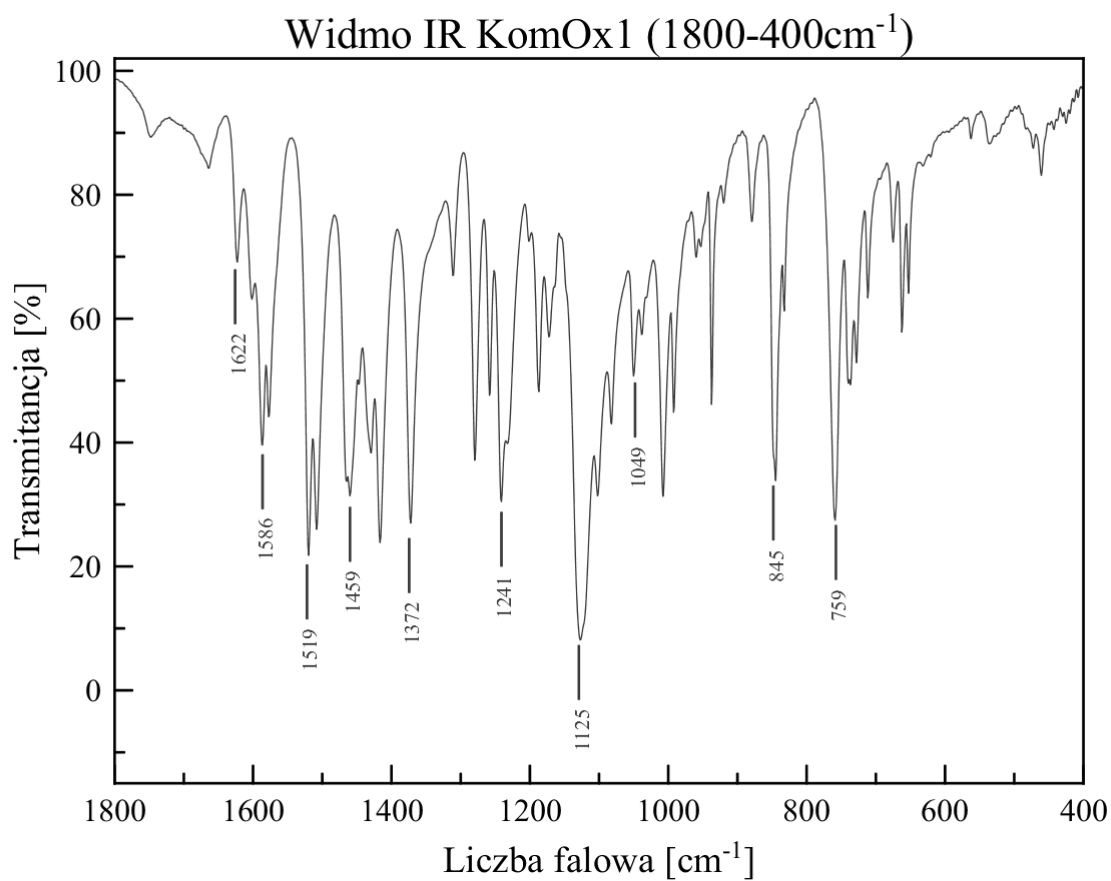
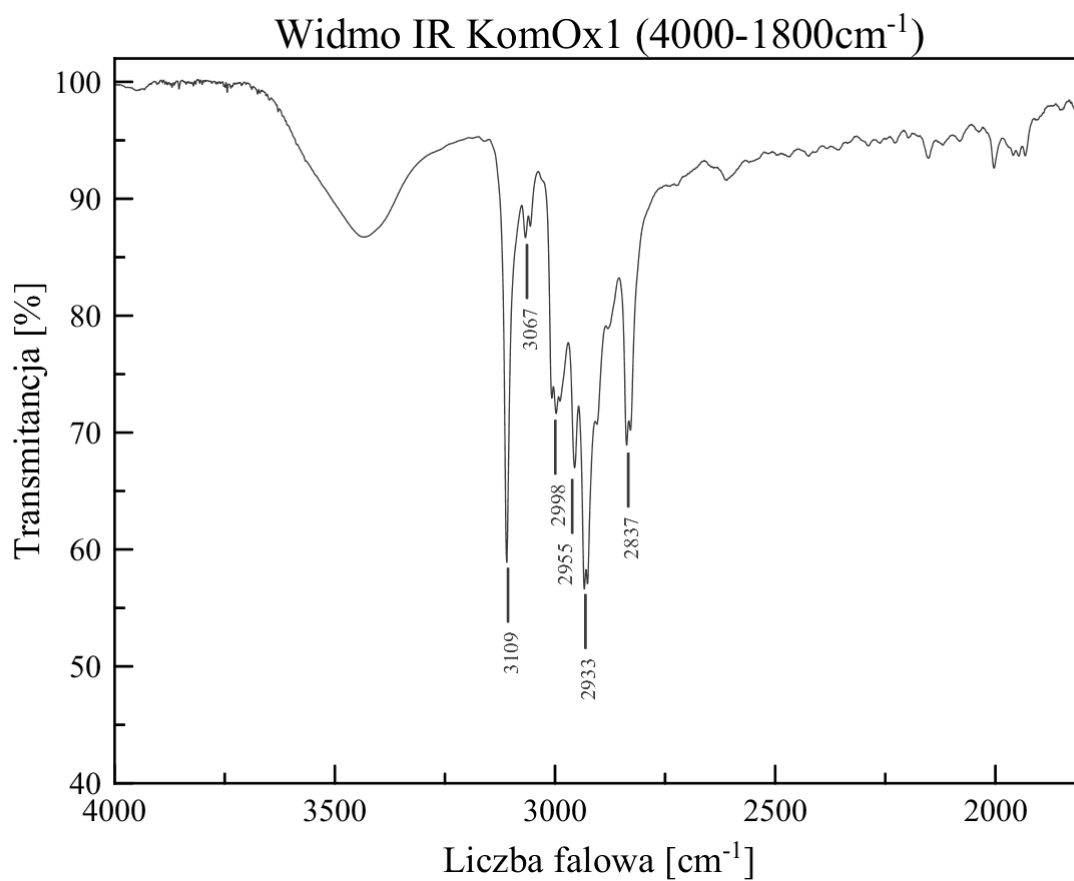
Widmo IR Kom-C6 (4000-1800cm⁻¹)

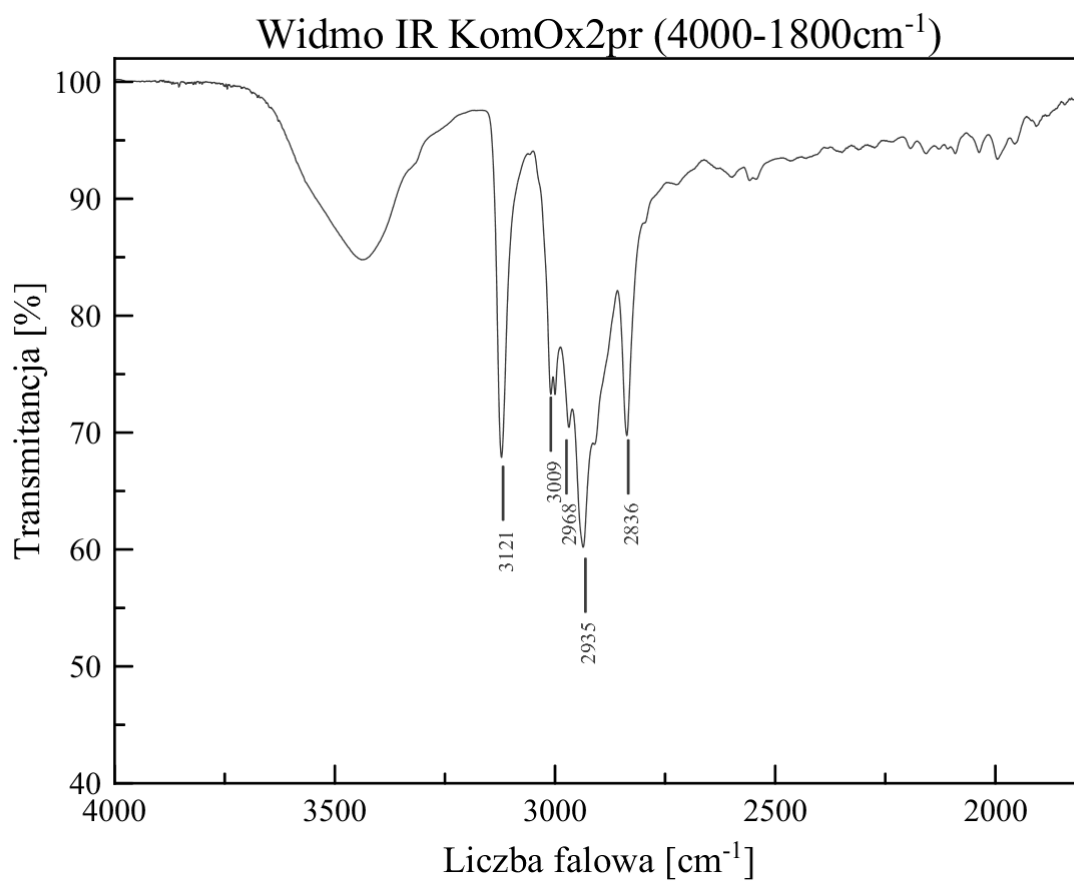
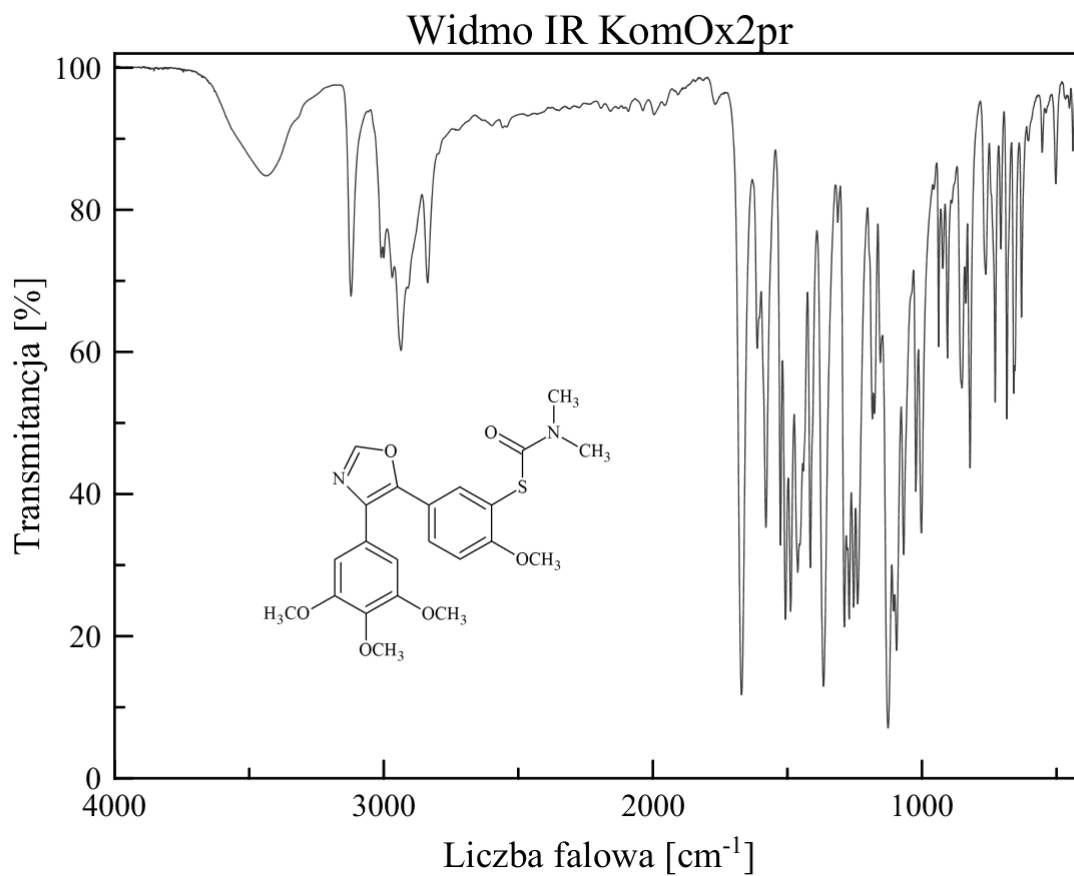


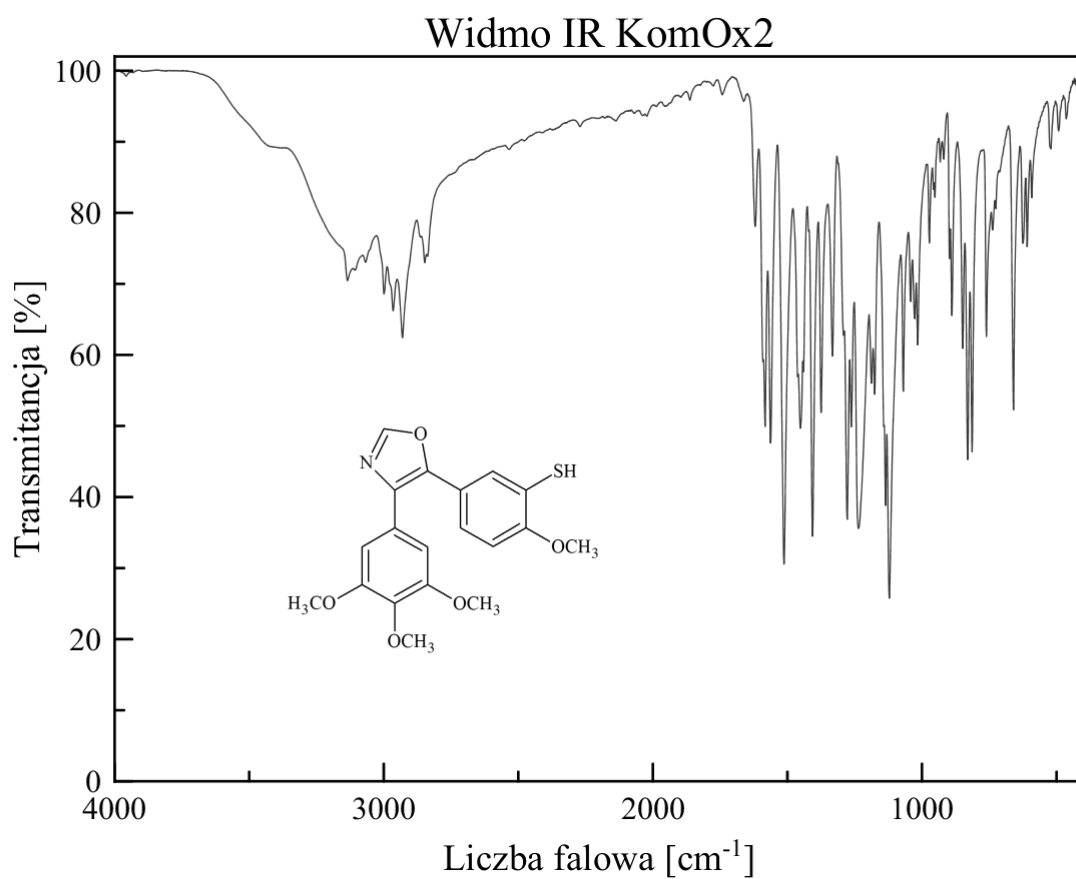
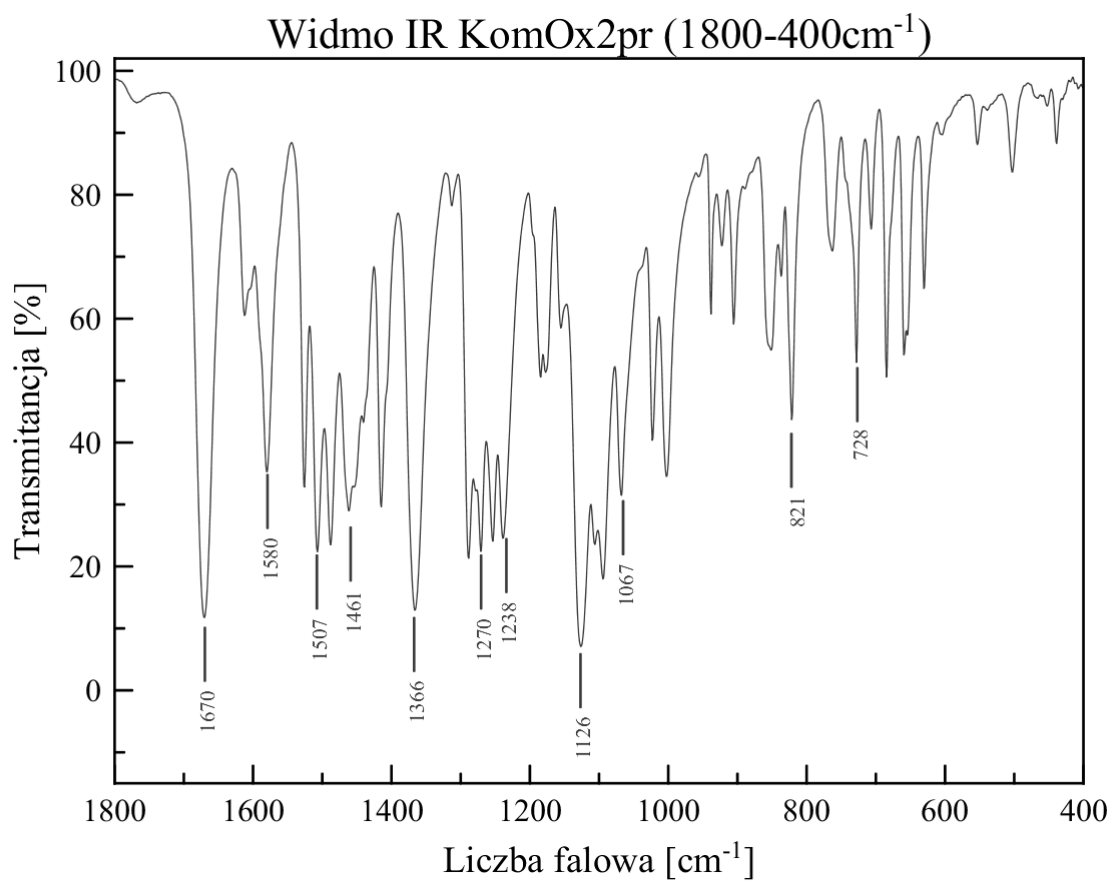
Widmo IR Kom4 (4000-1800 cm^{-1})Widmo IR Kom4 (1800-400 cm^{-1})

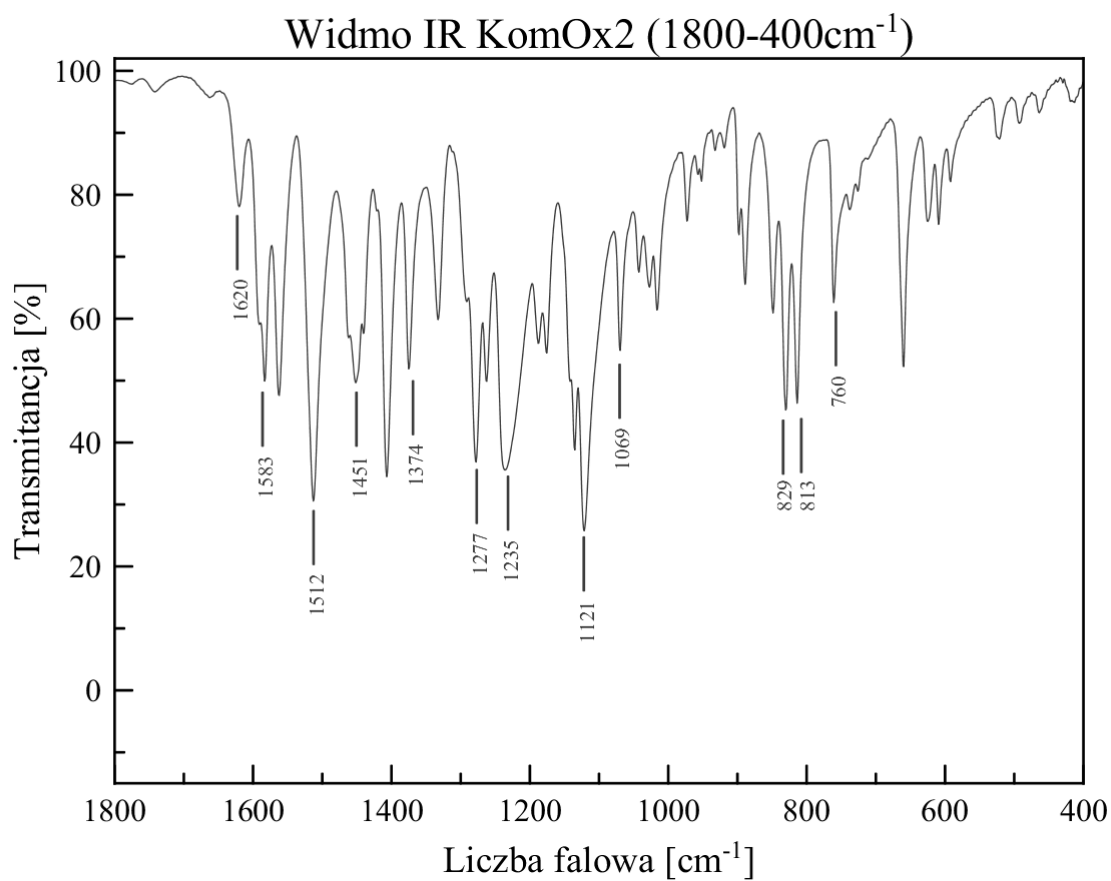
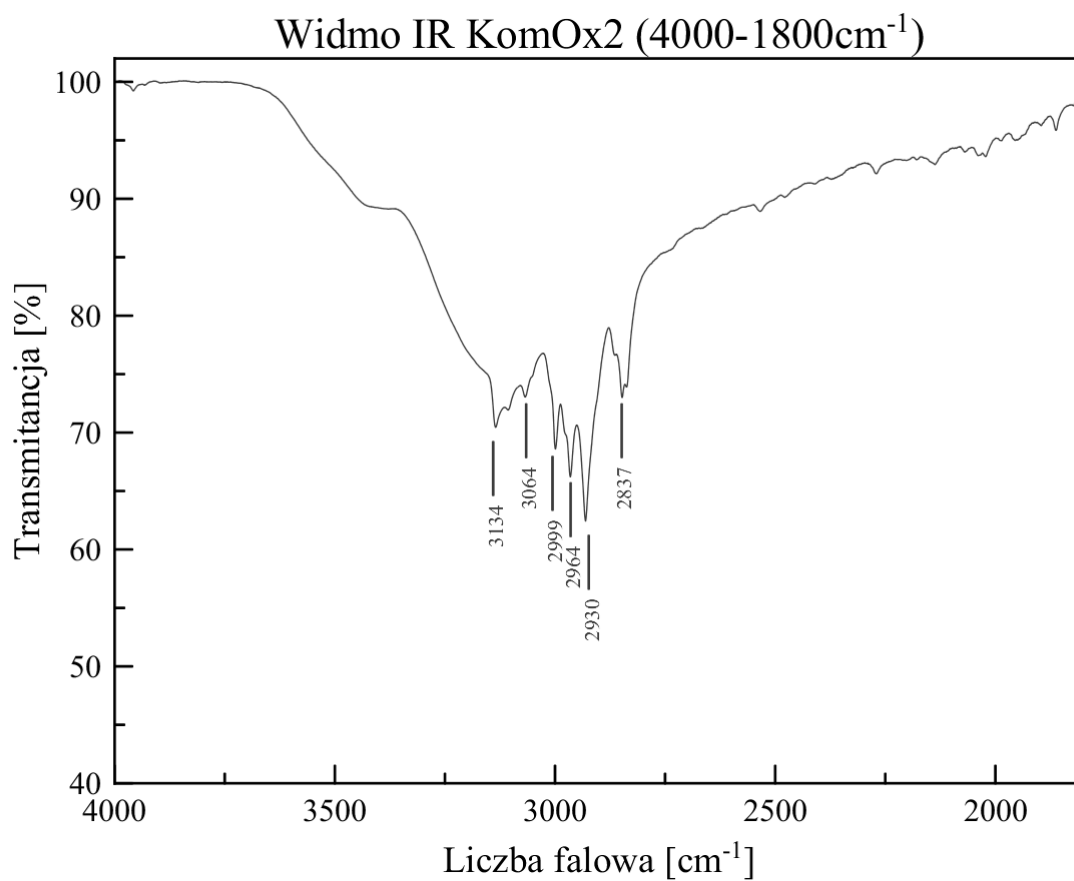


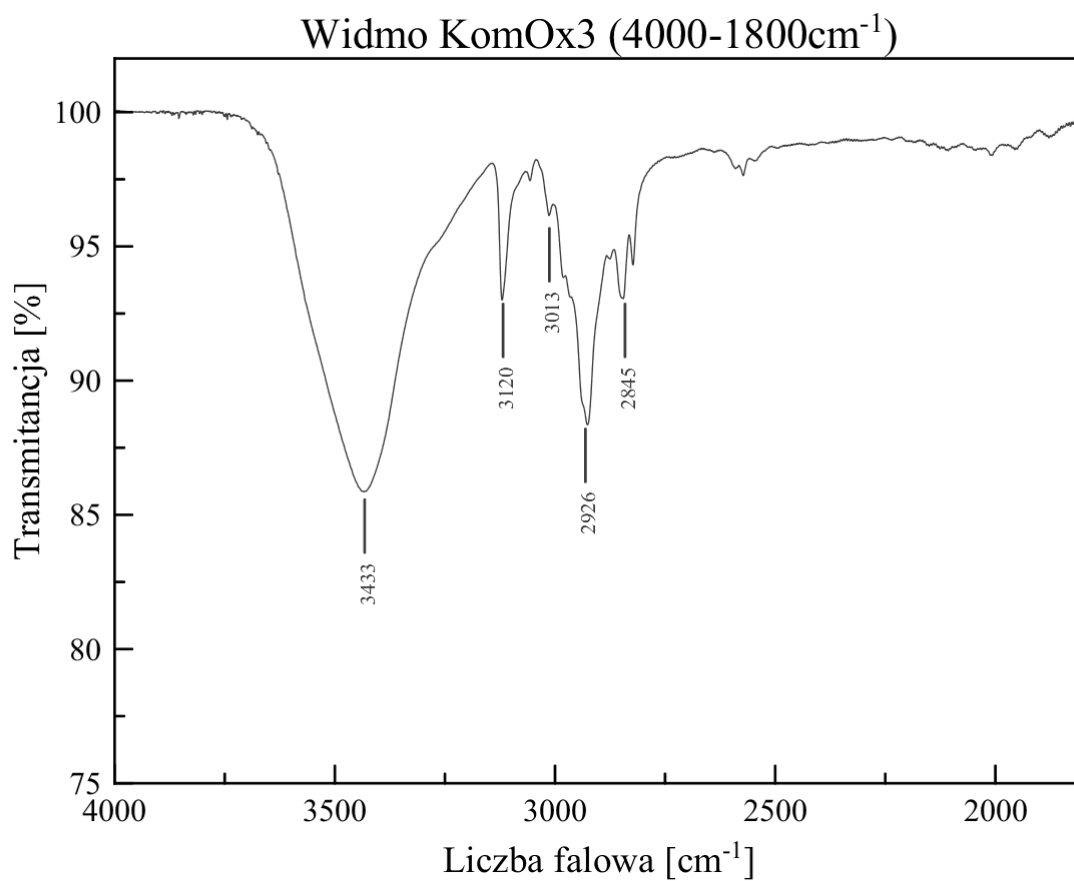
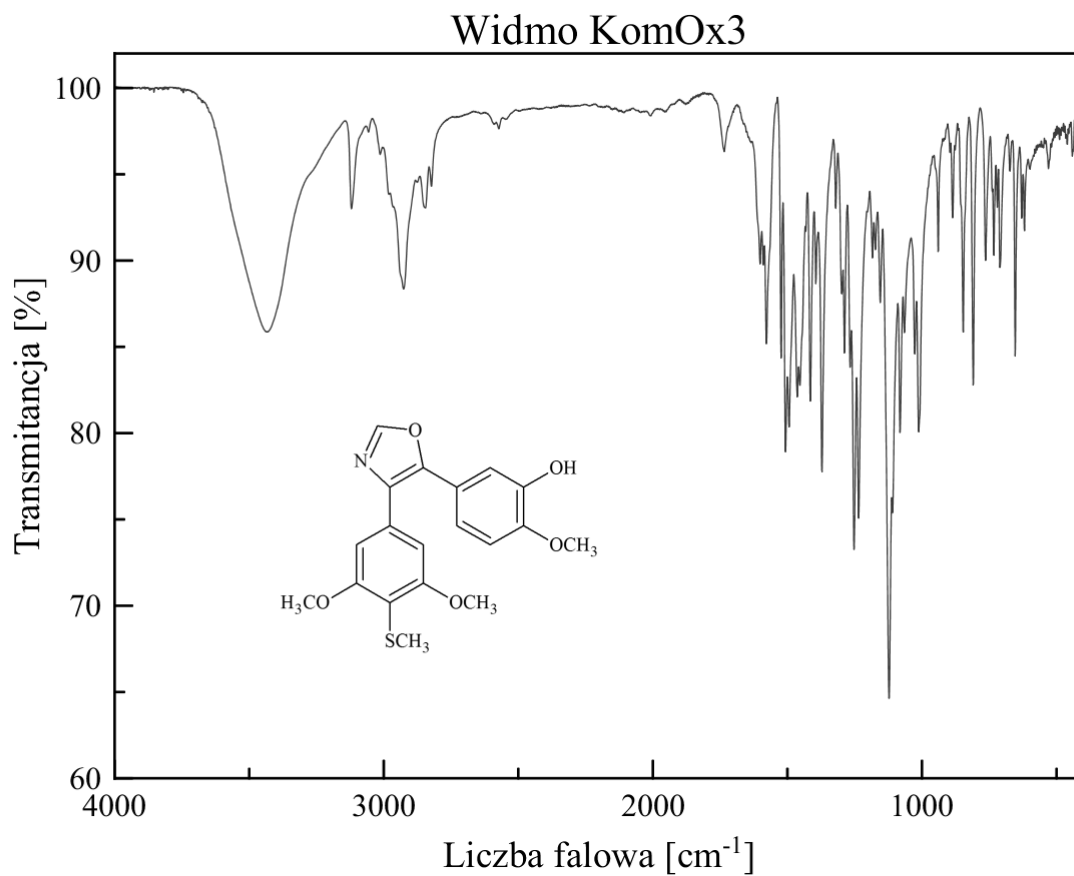


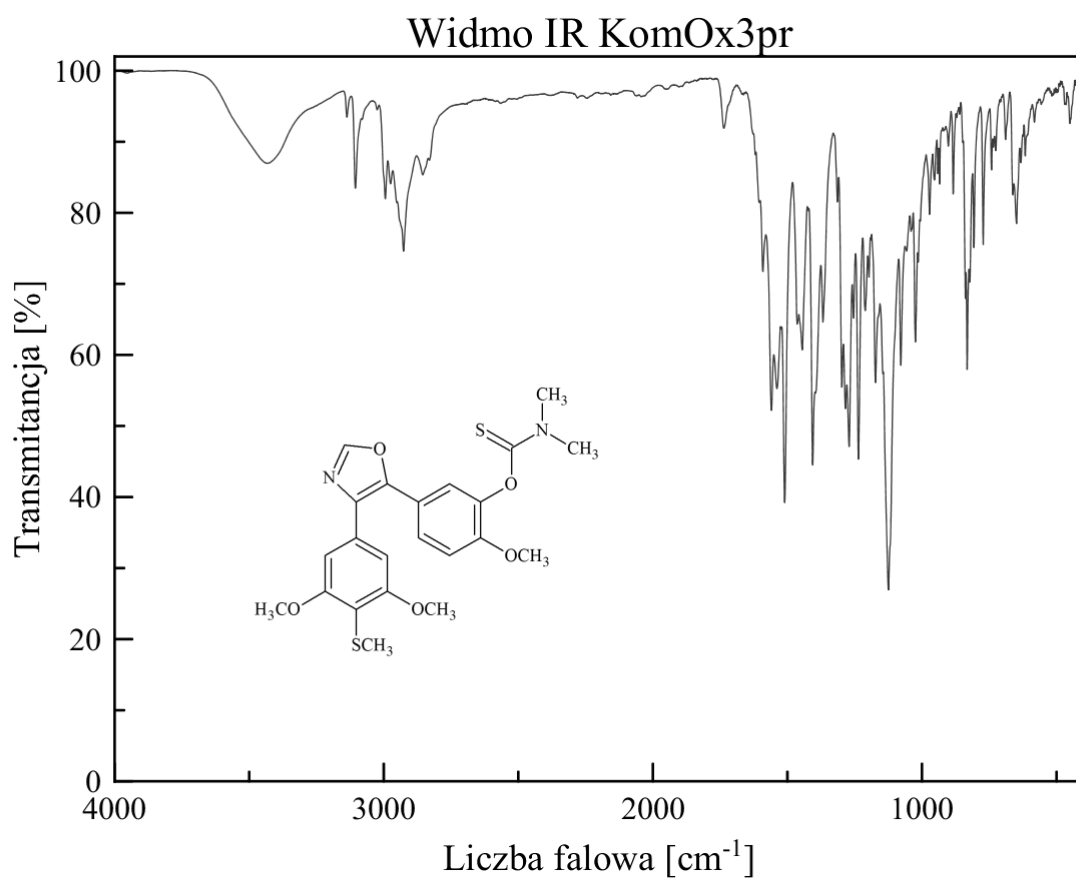
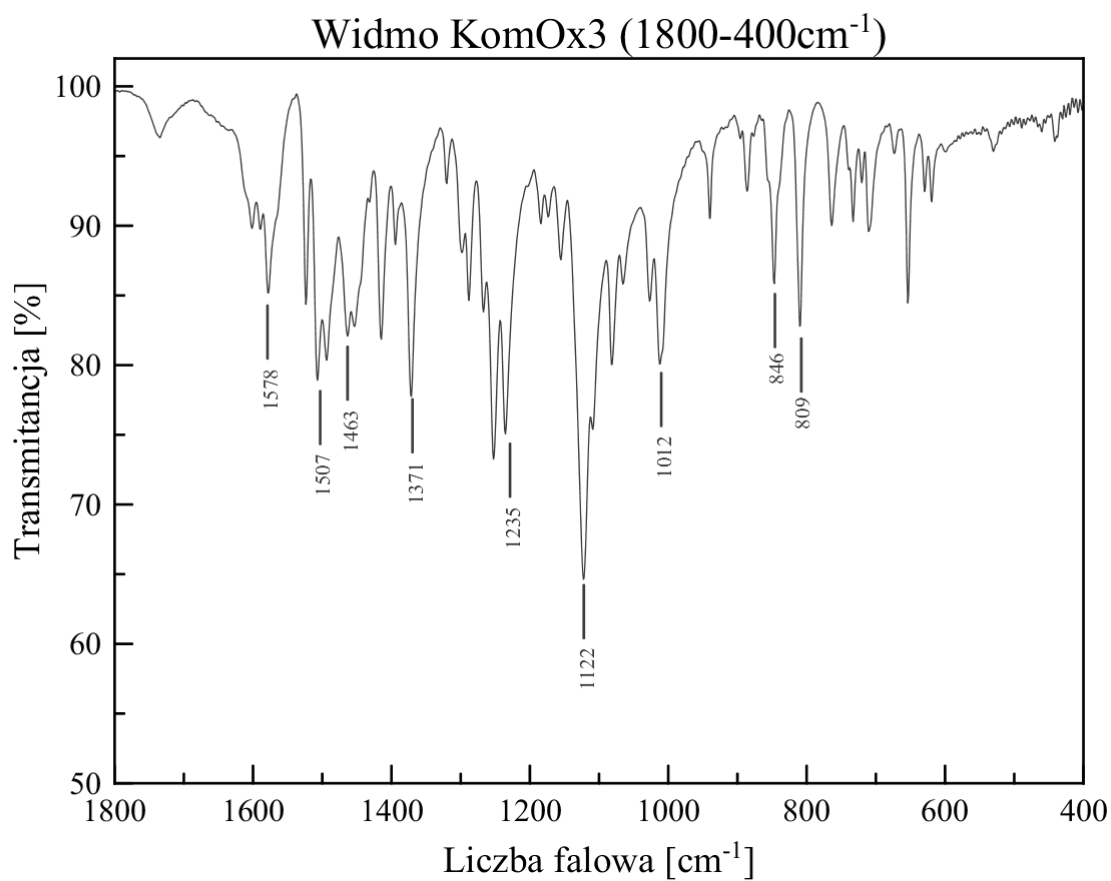


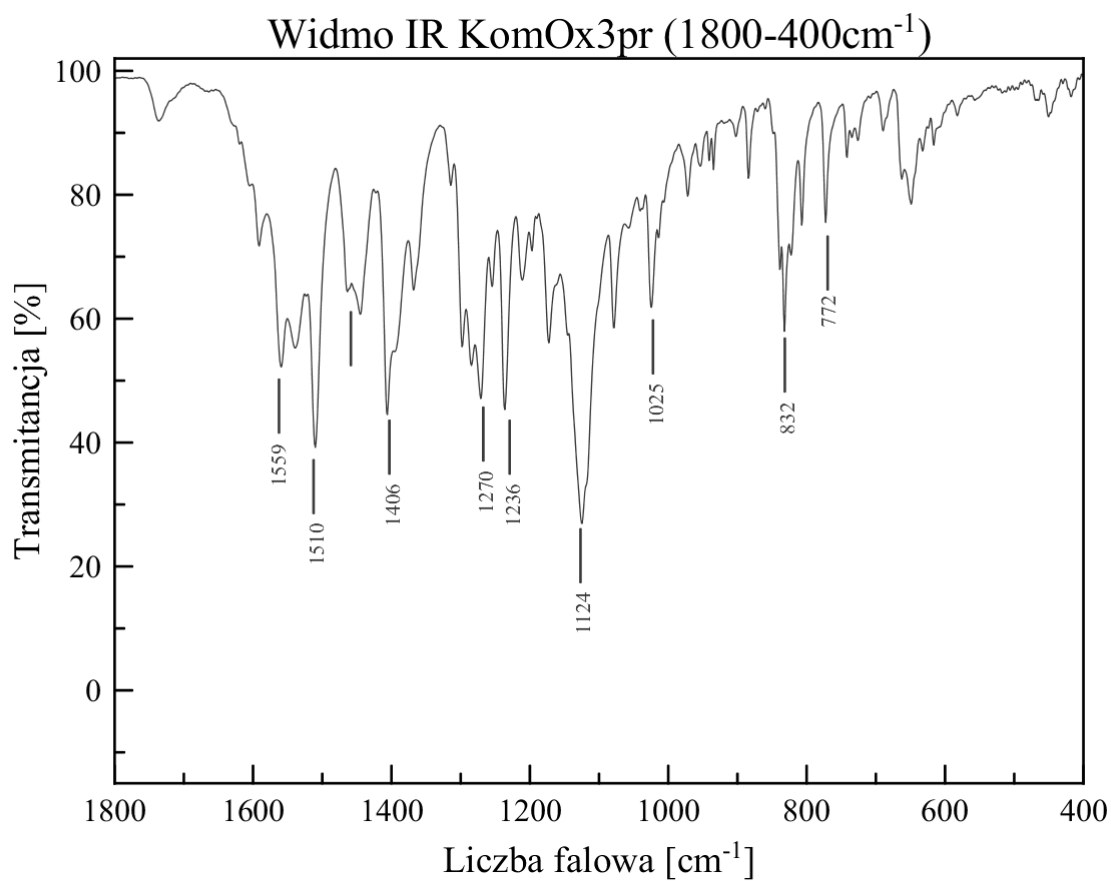
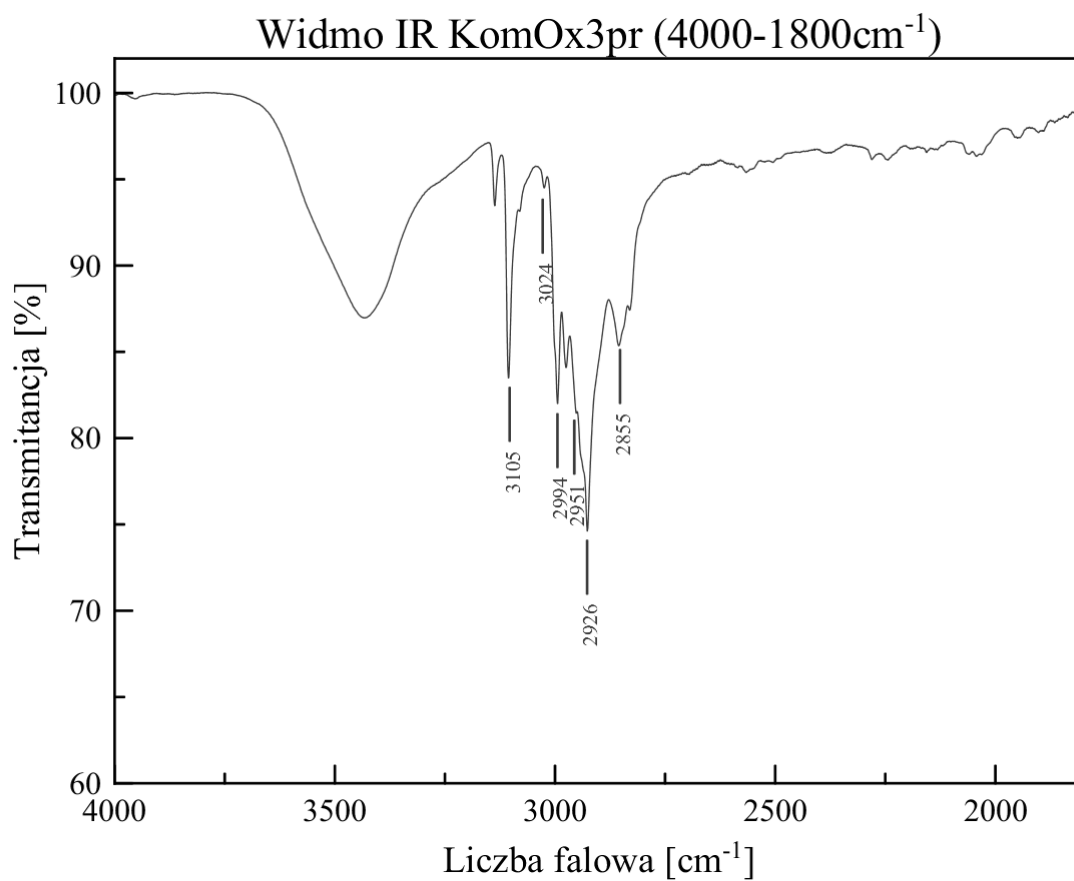


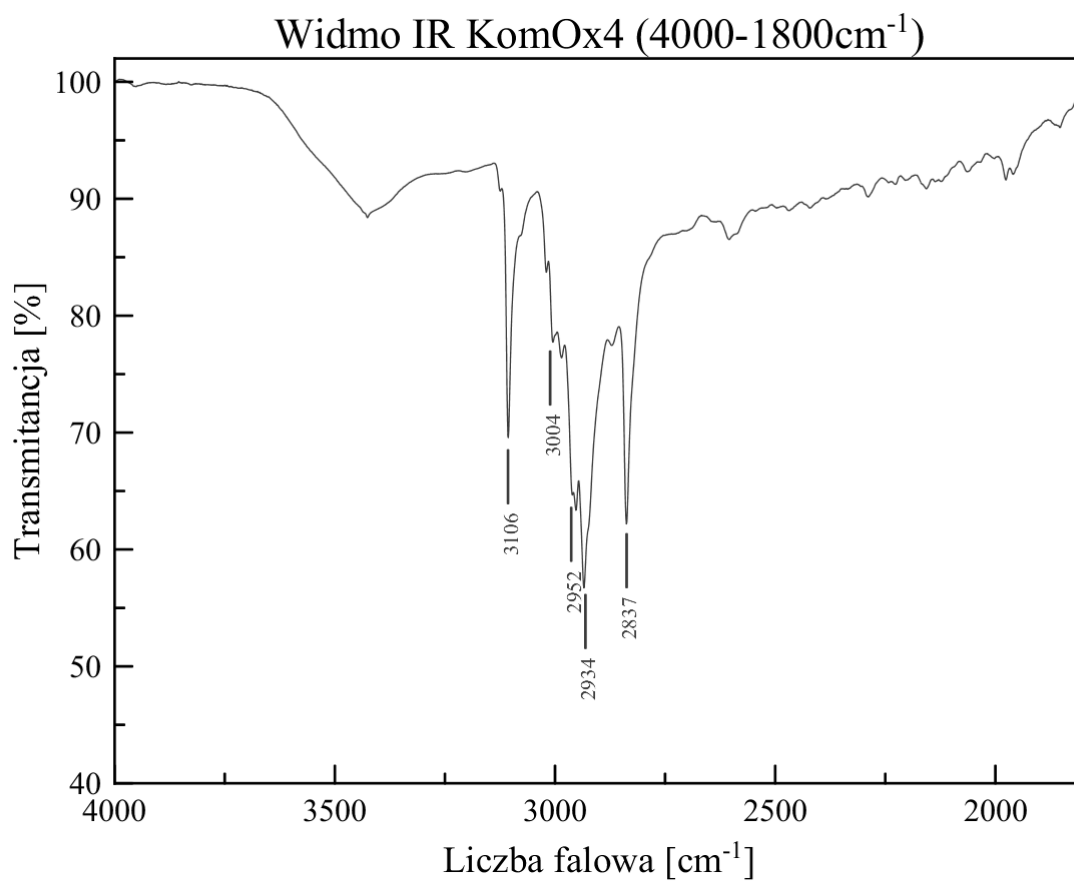
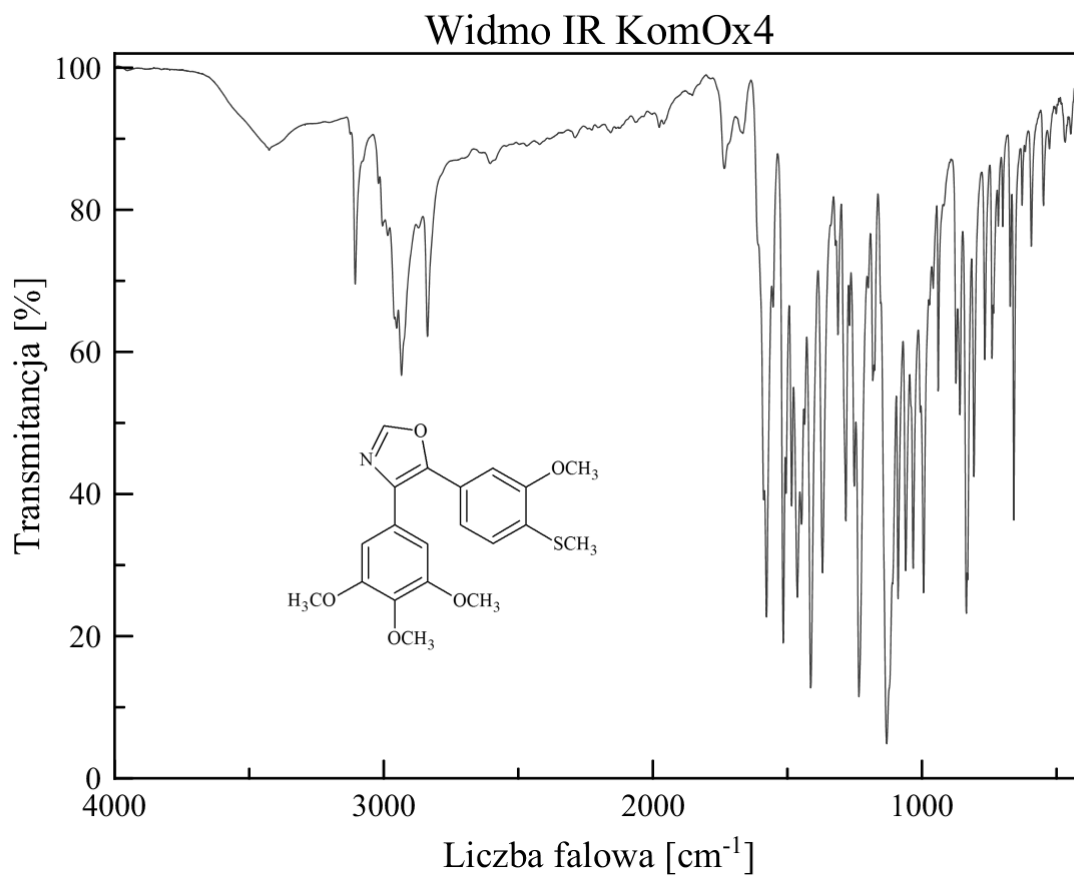


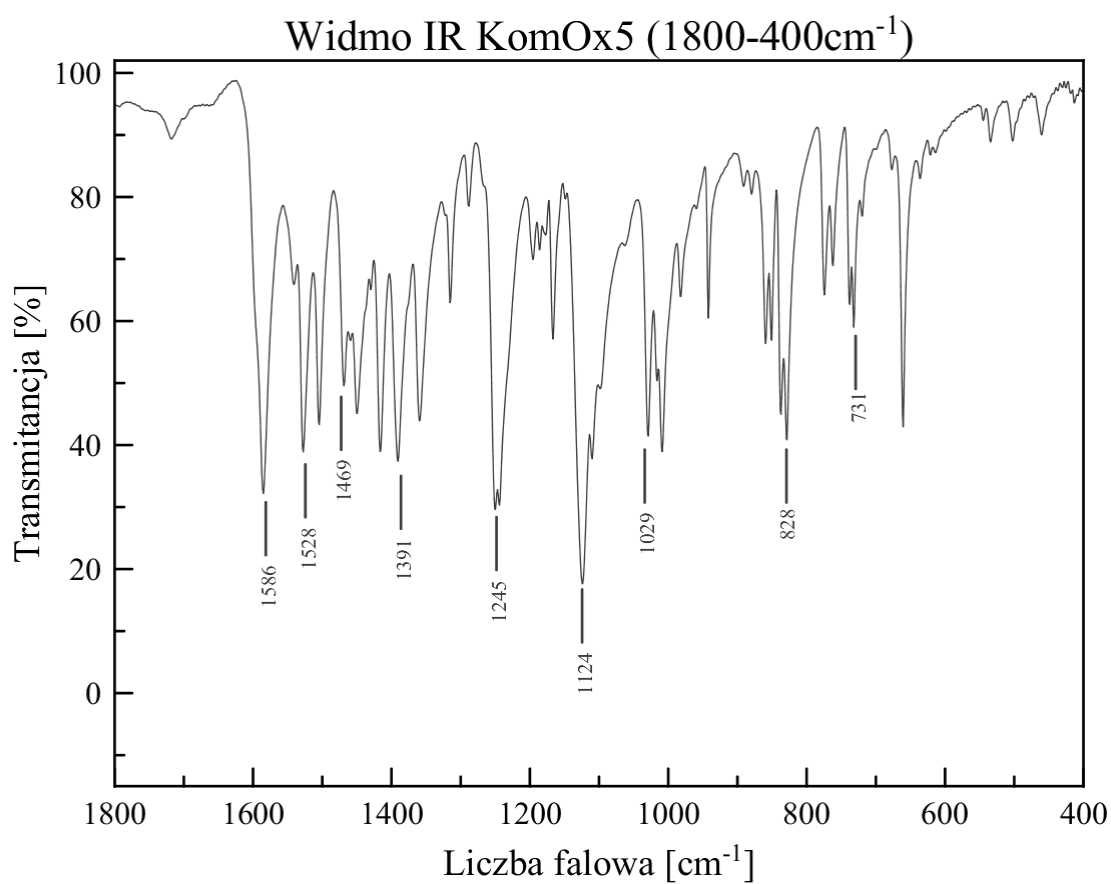
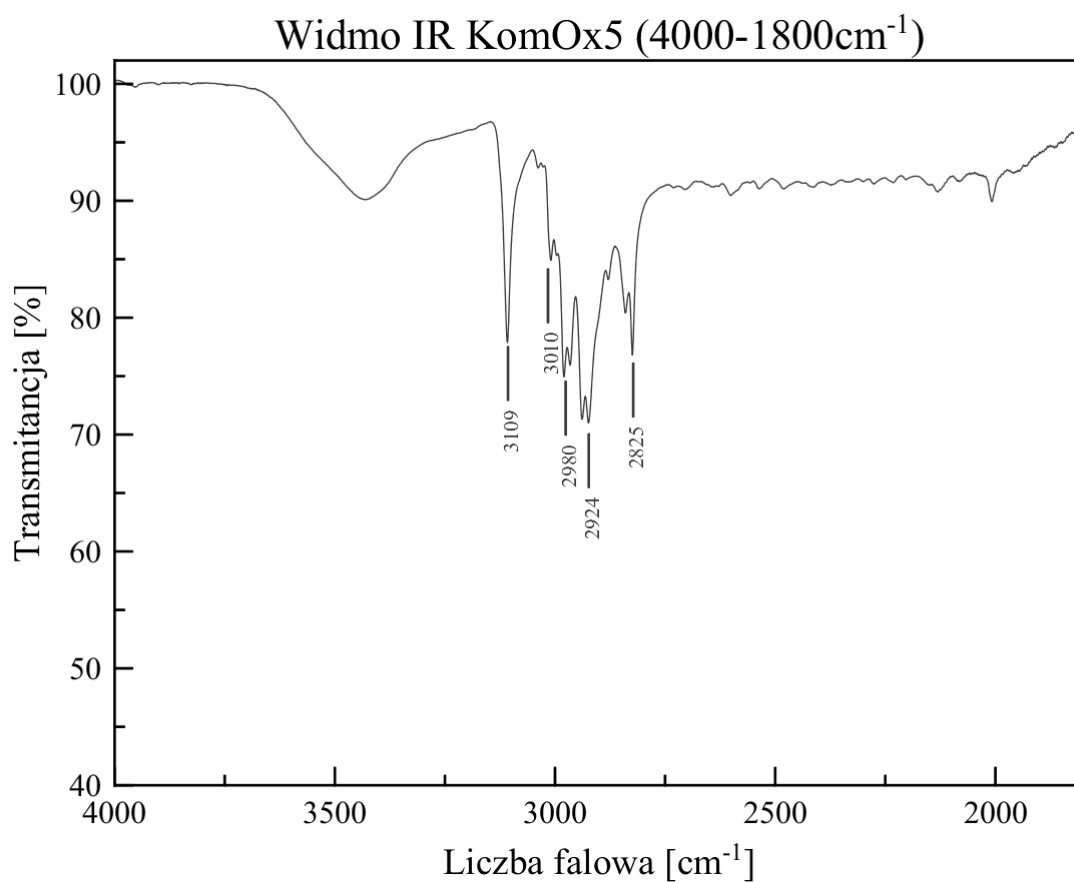


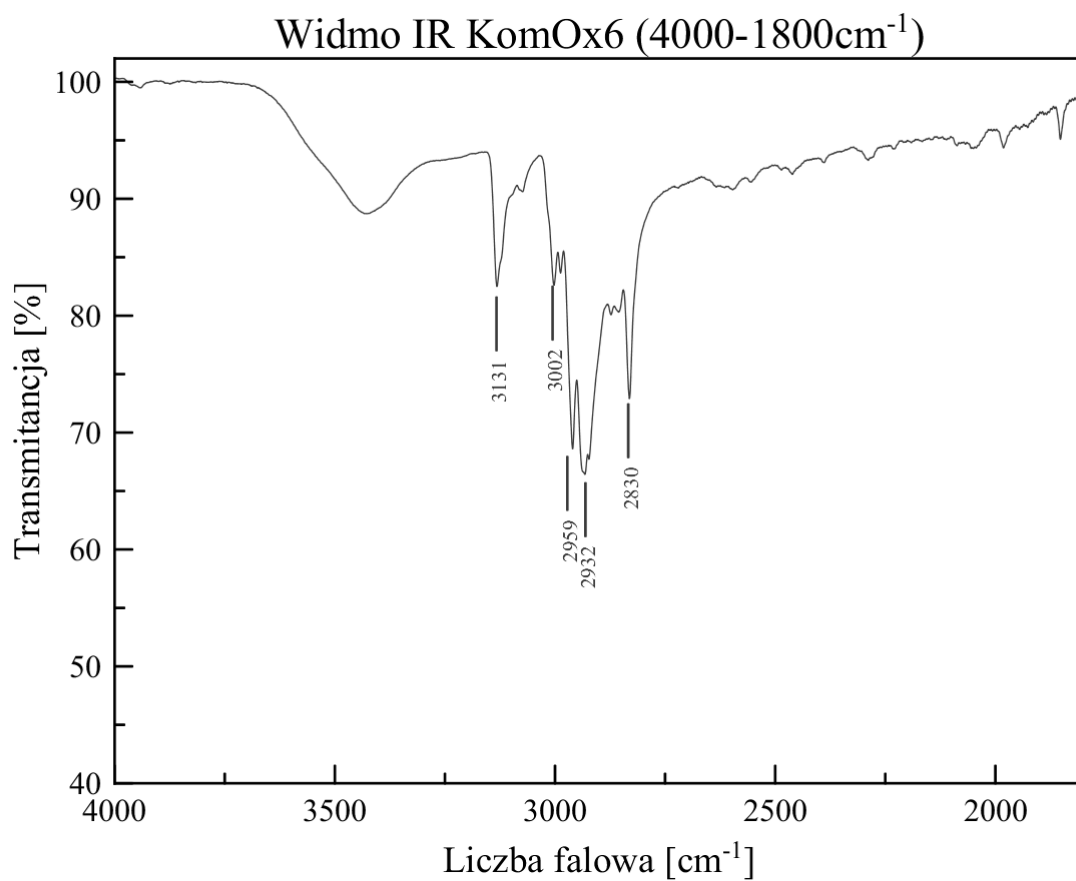
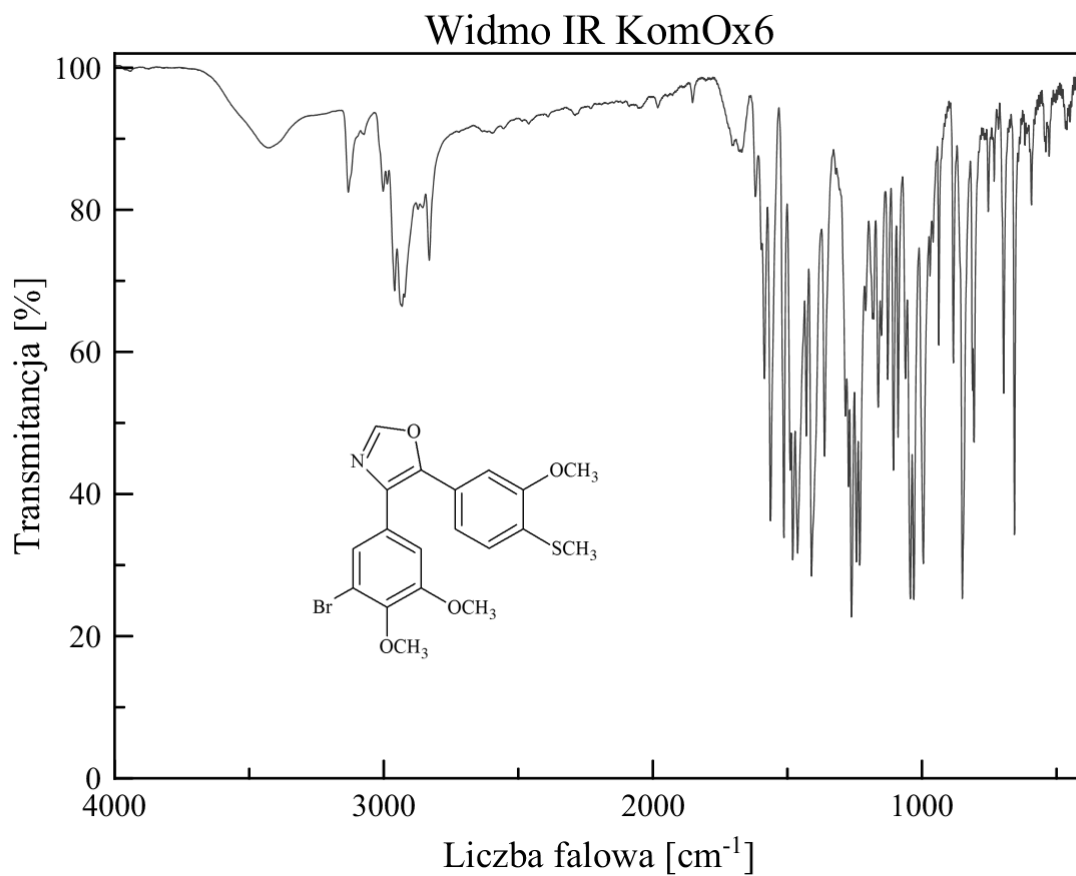


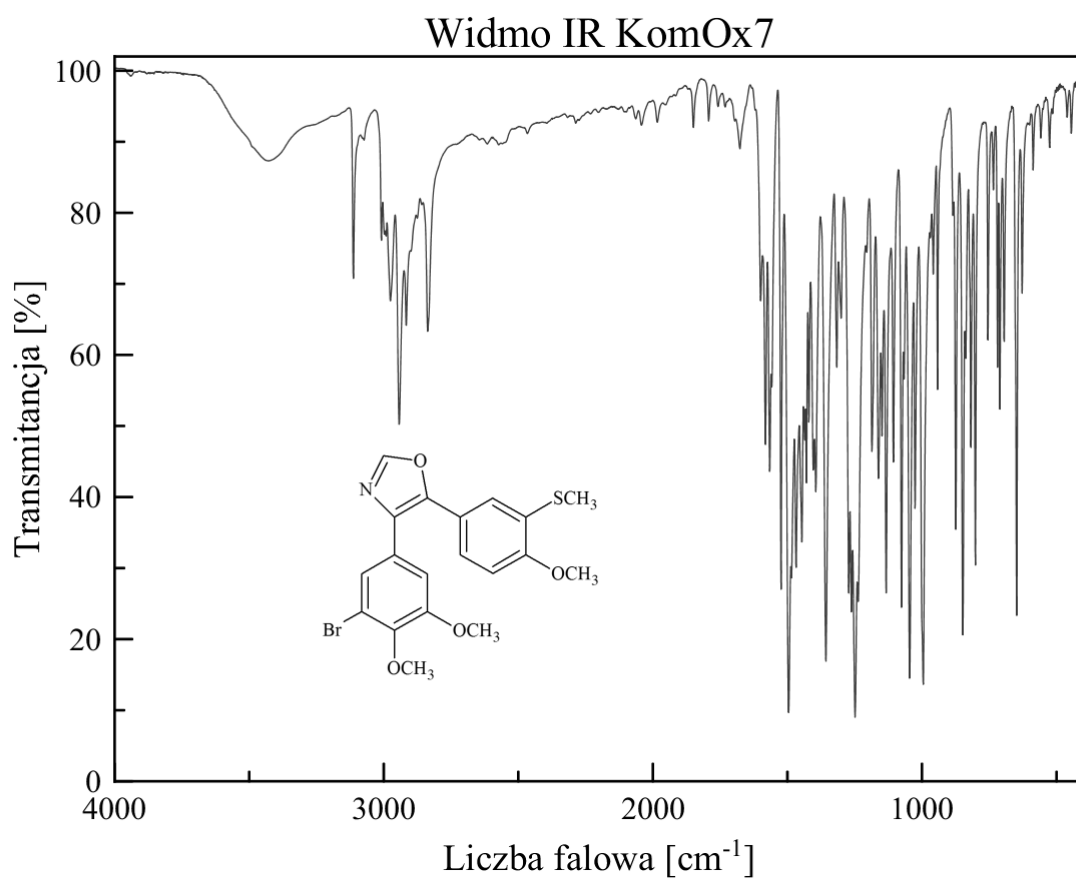
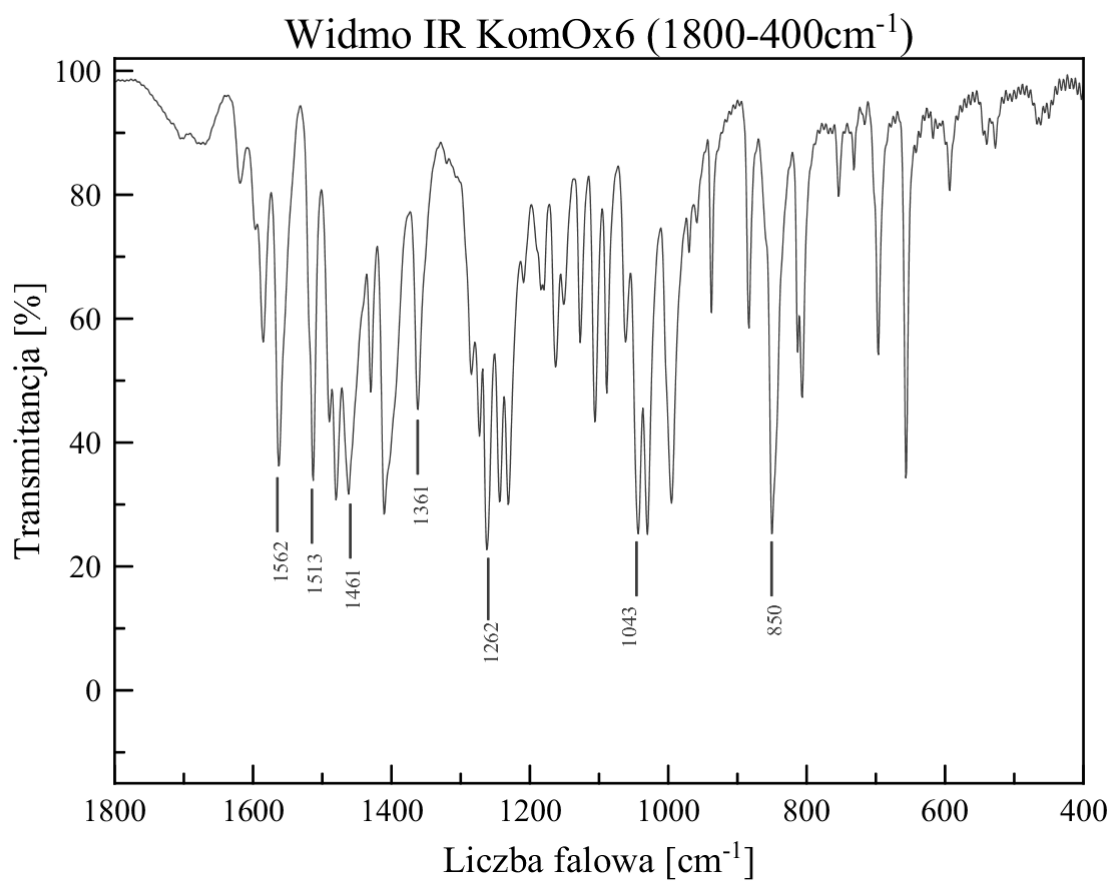


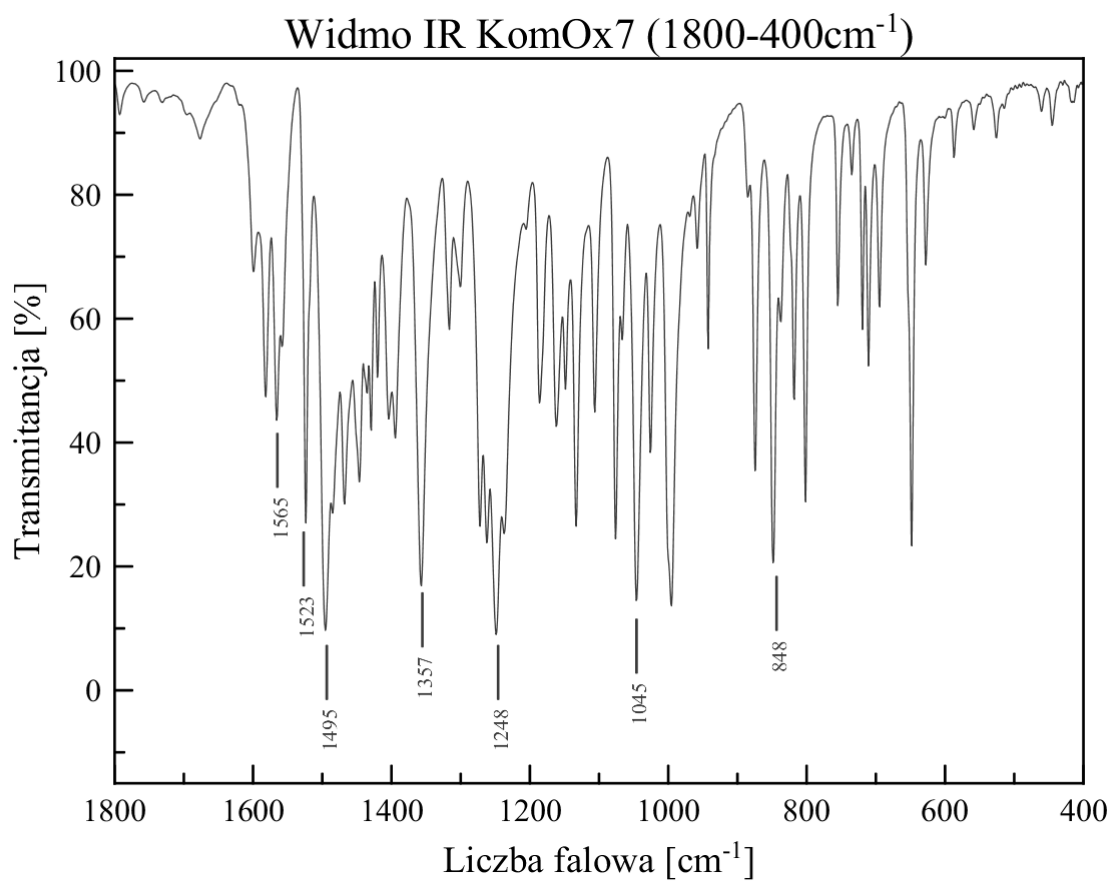
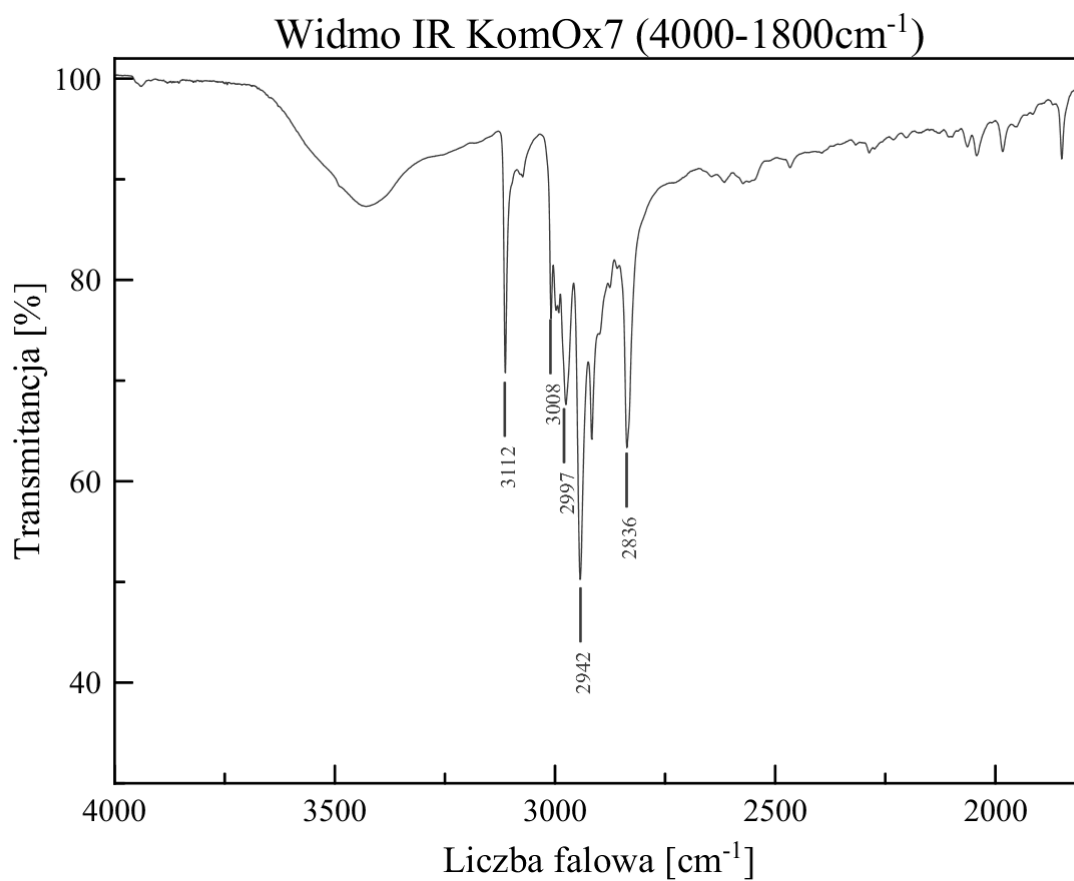


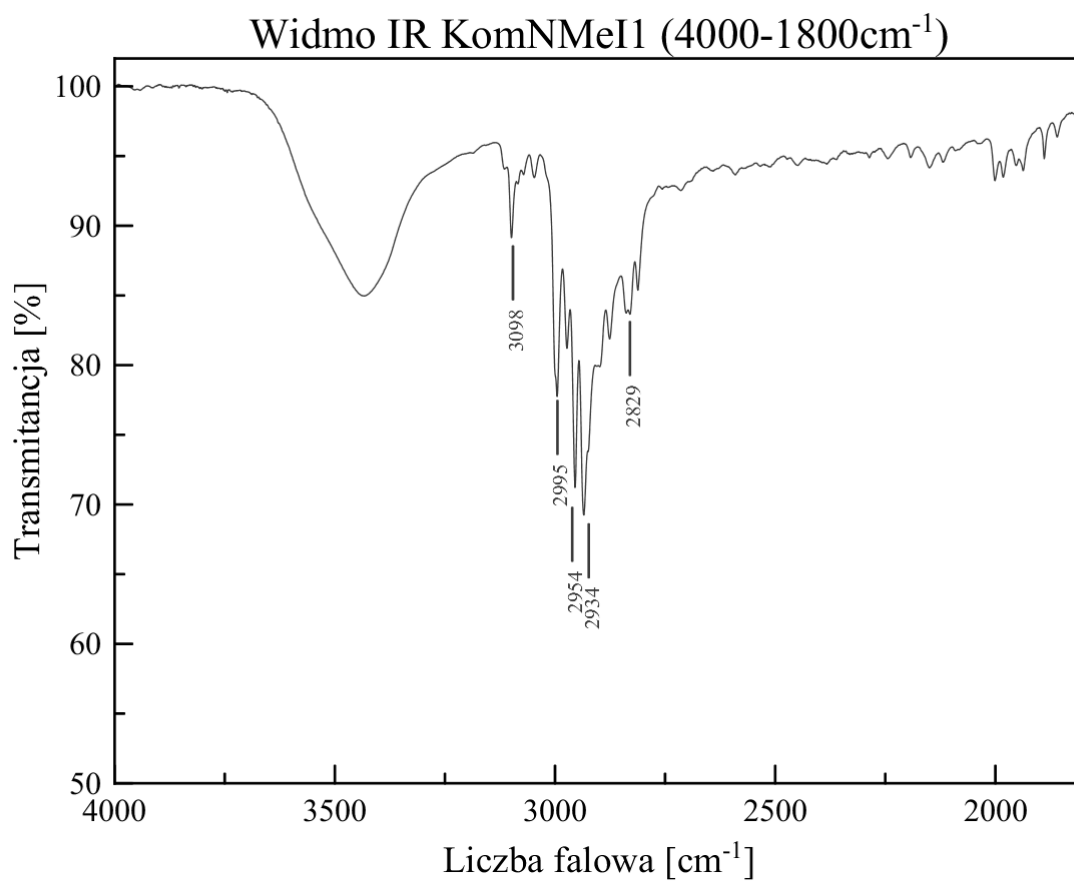
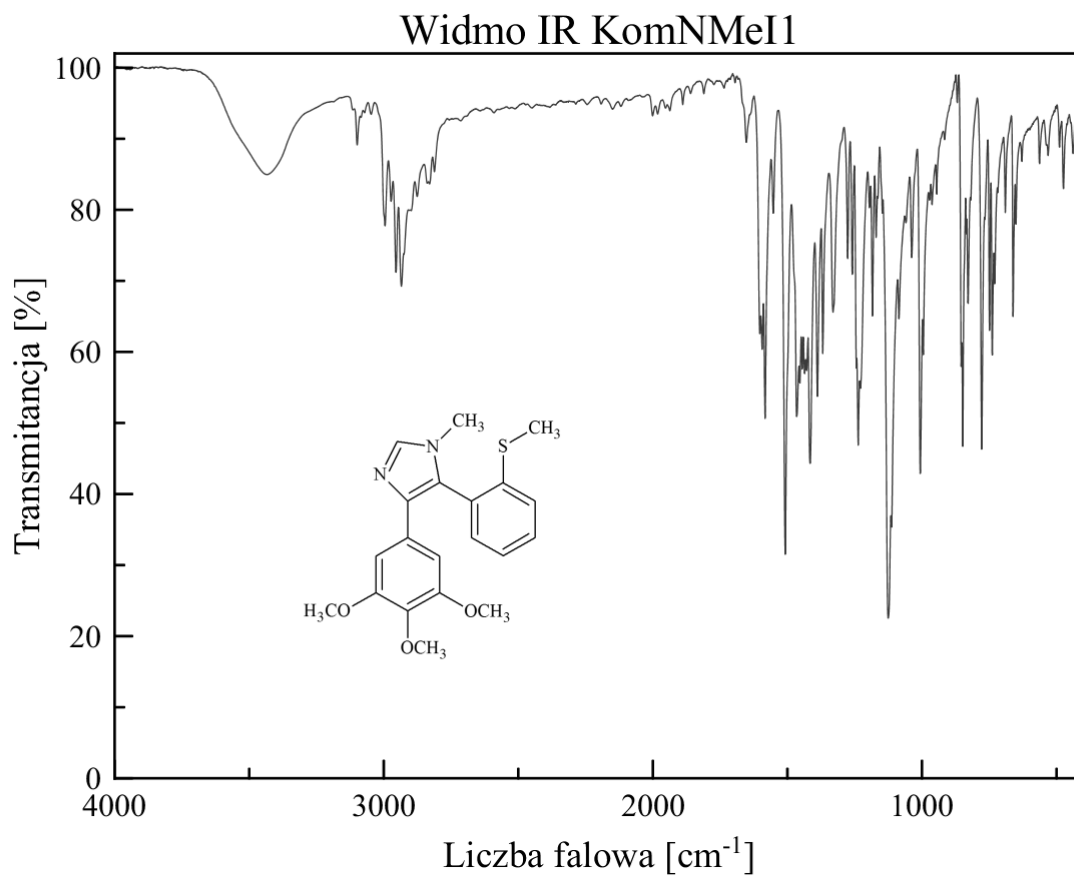


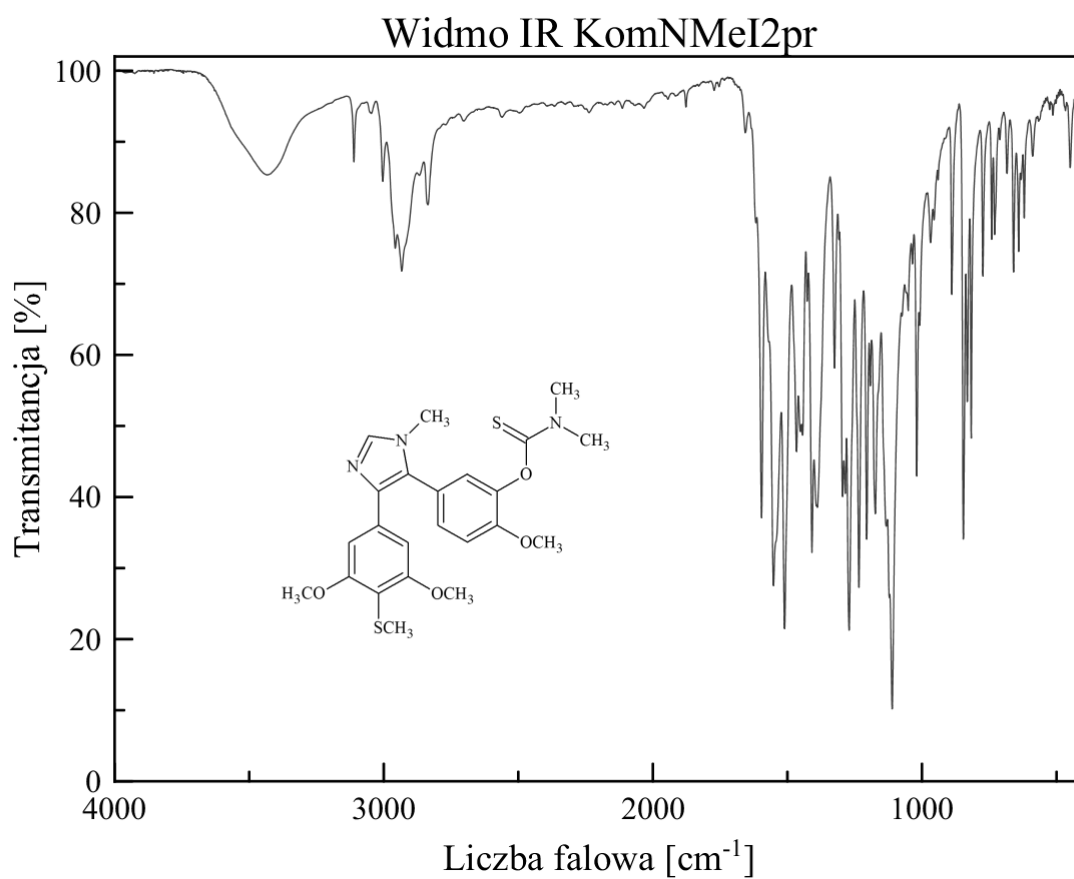
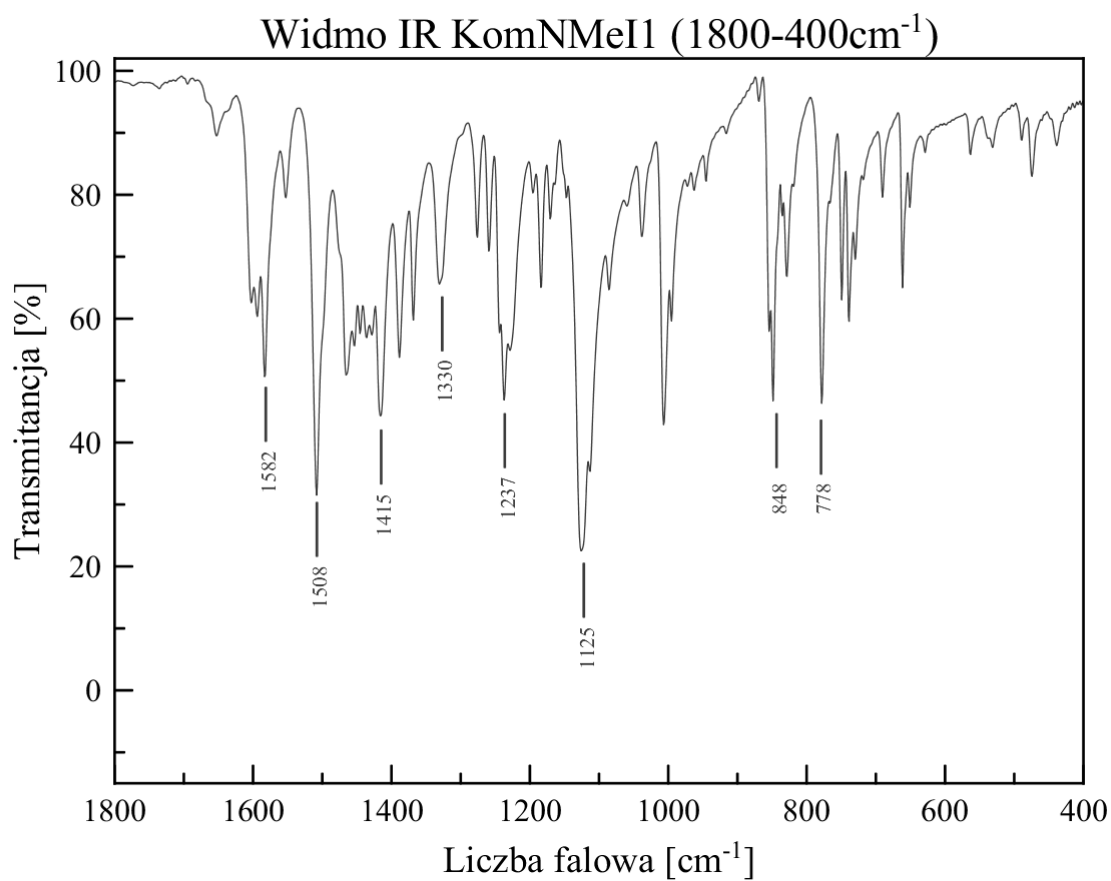


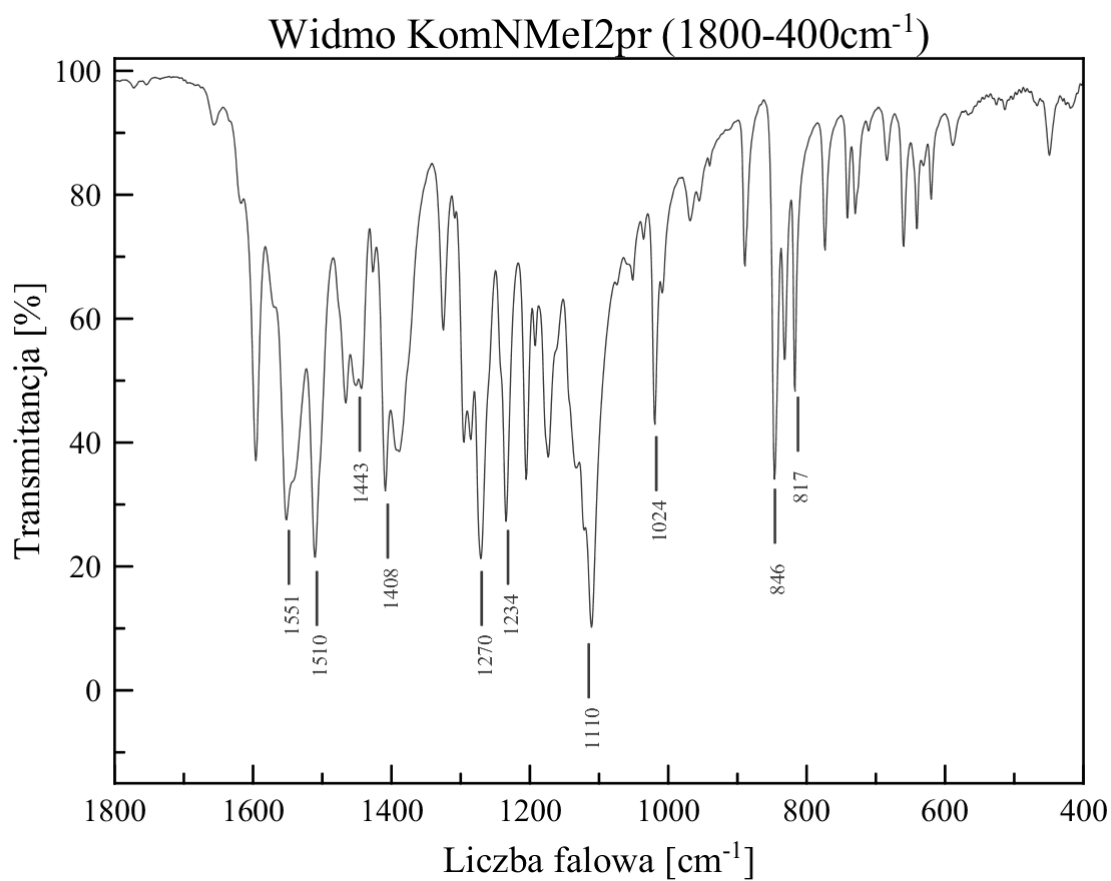
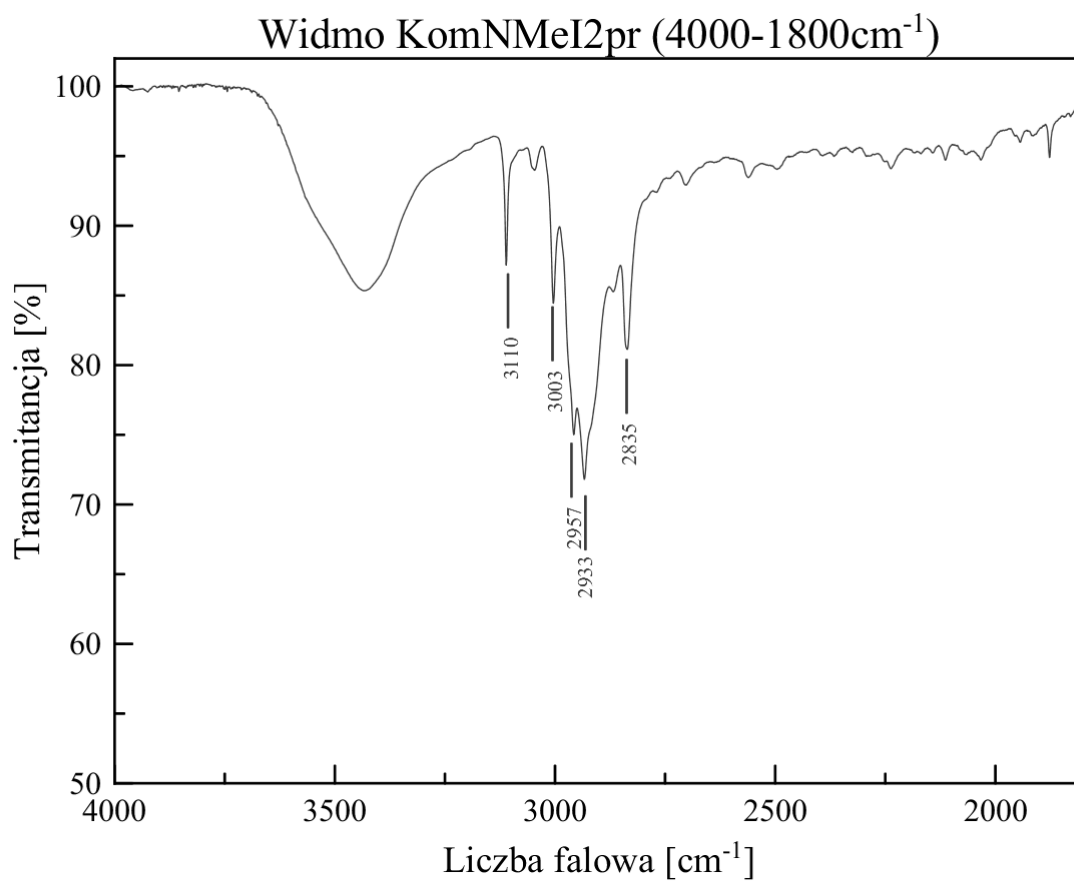




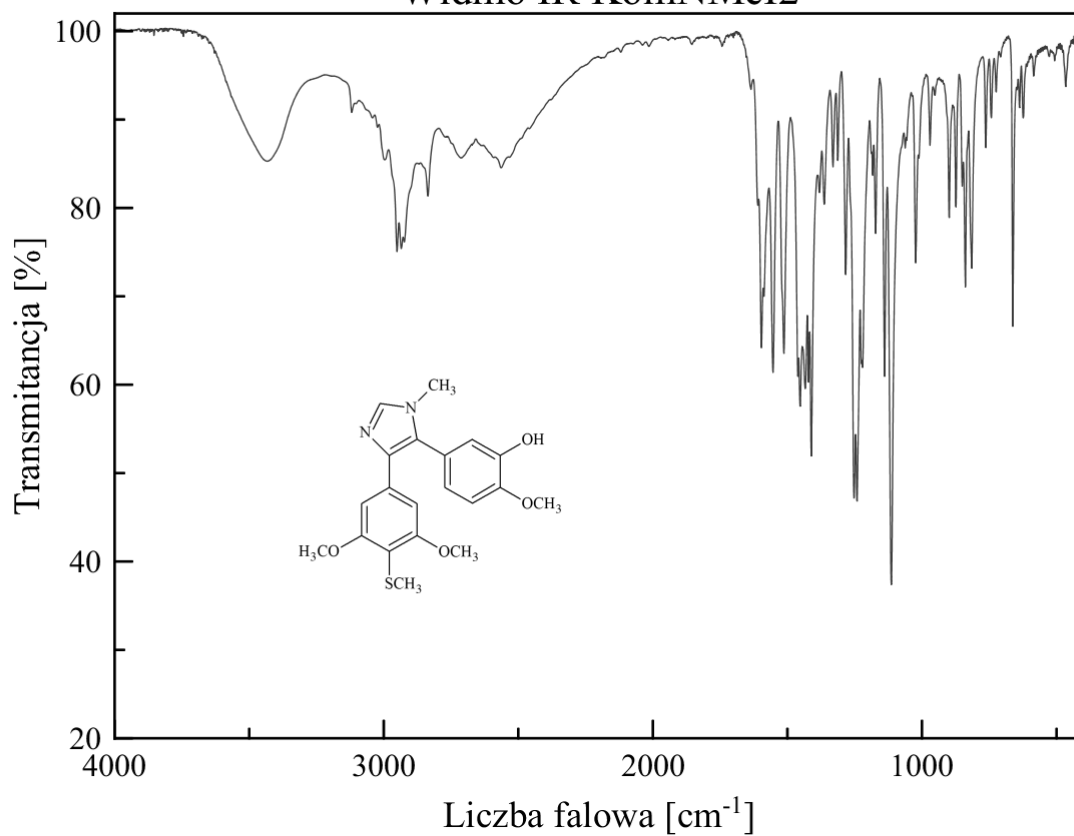
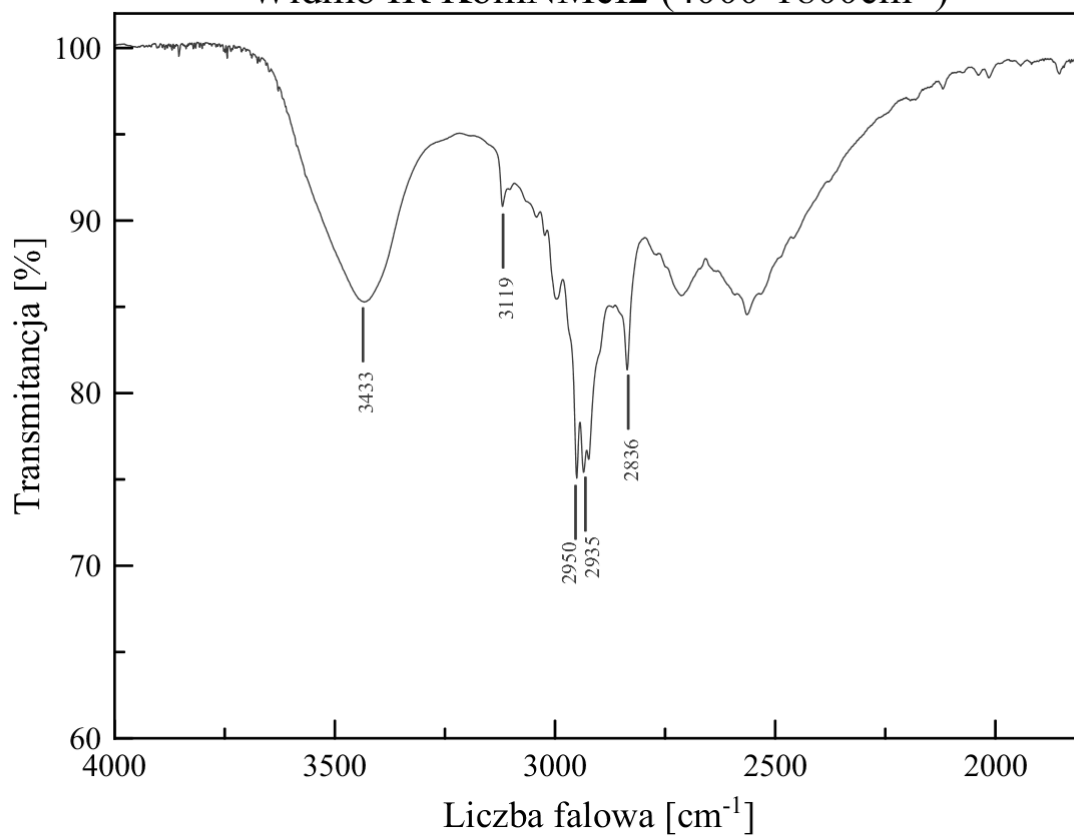


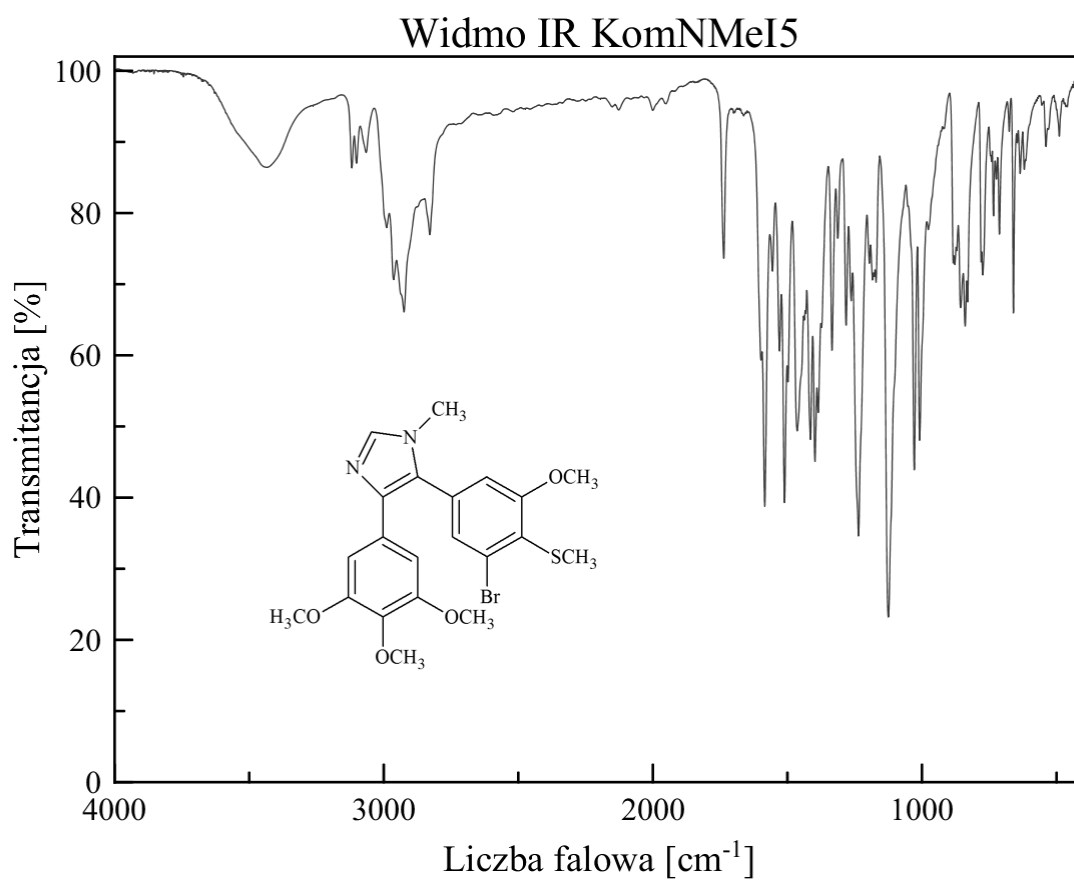
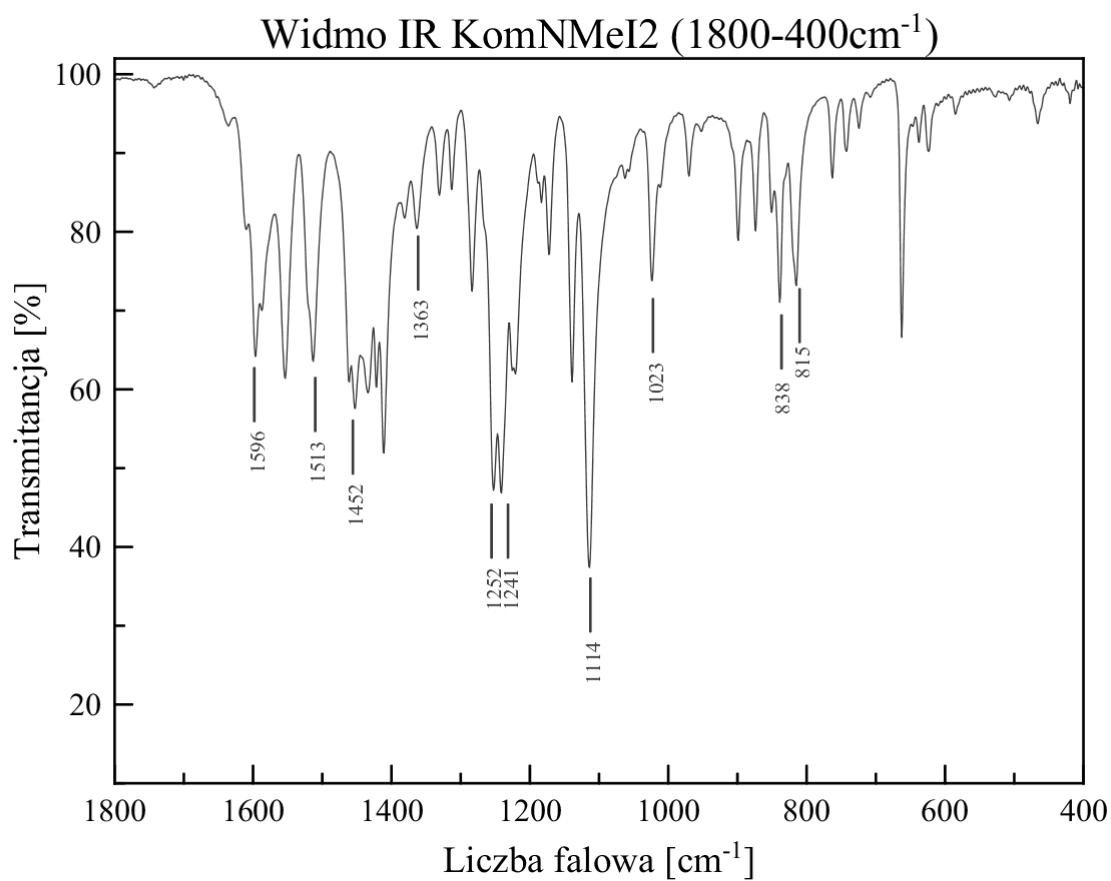


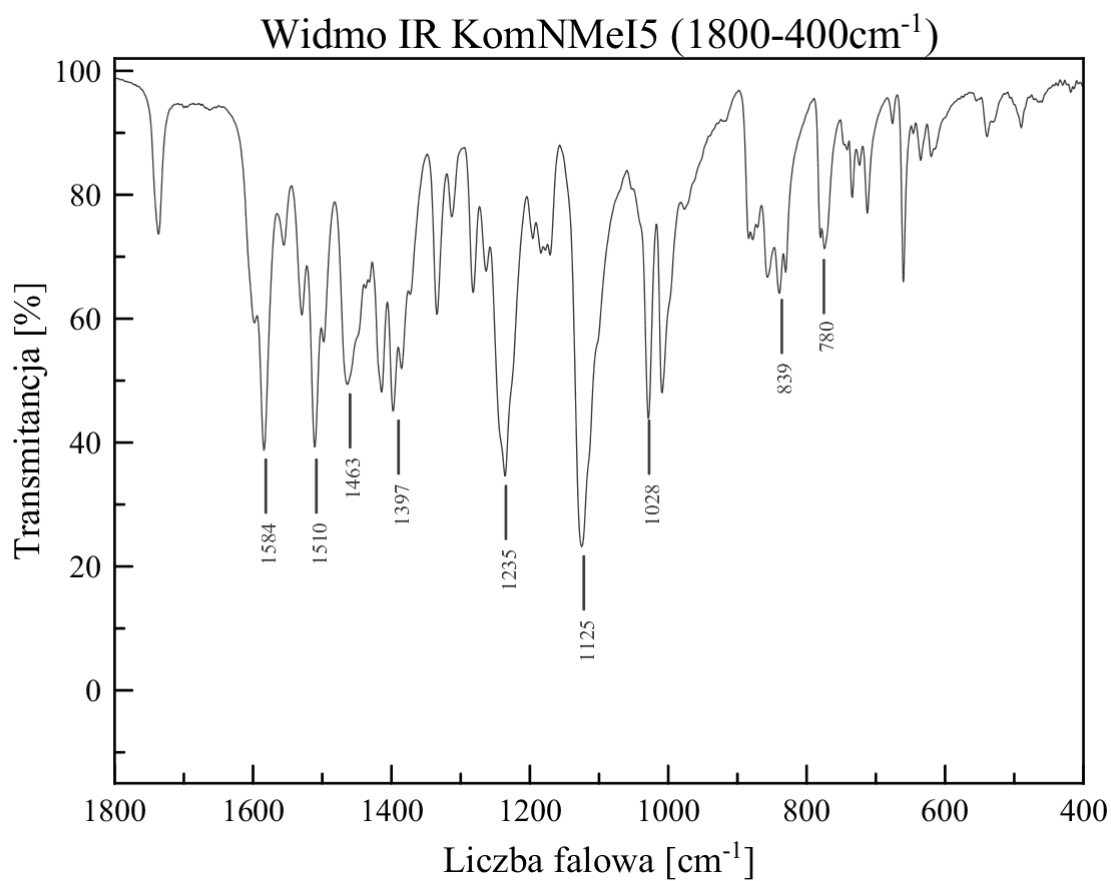
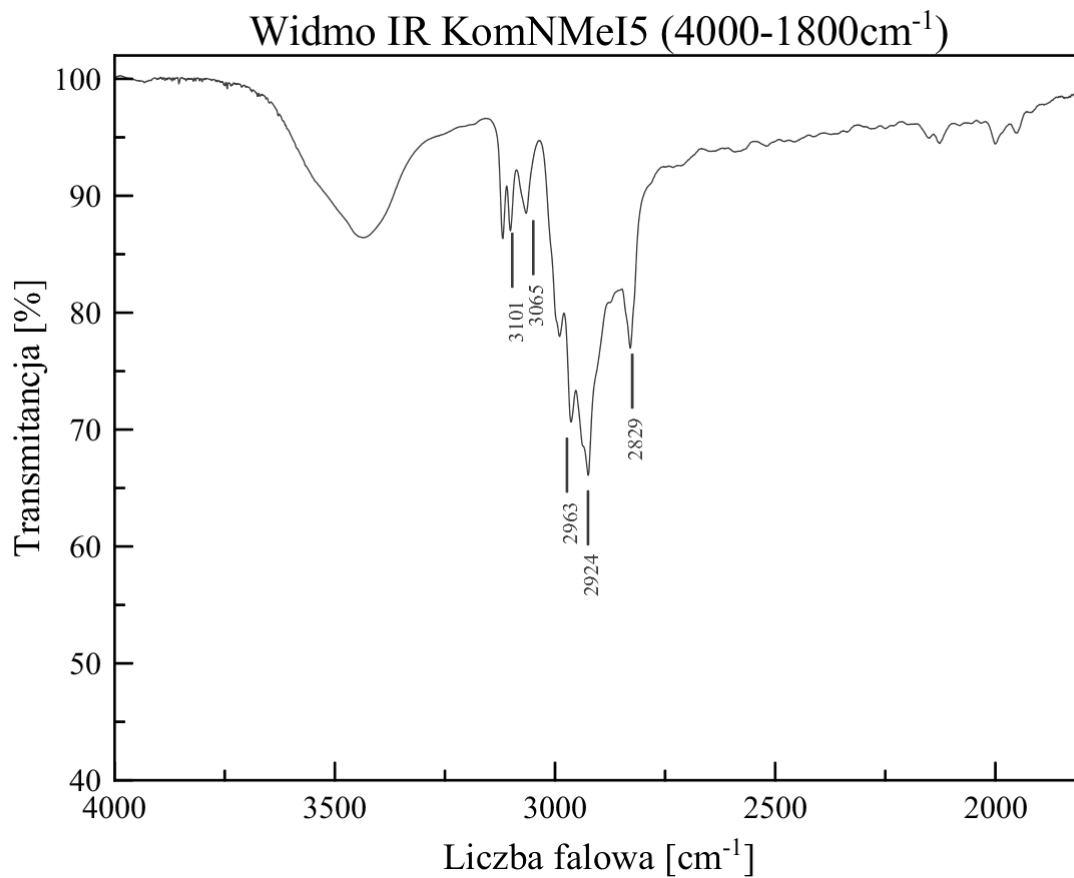


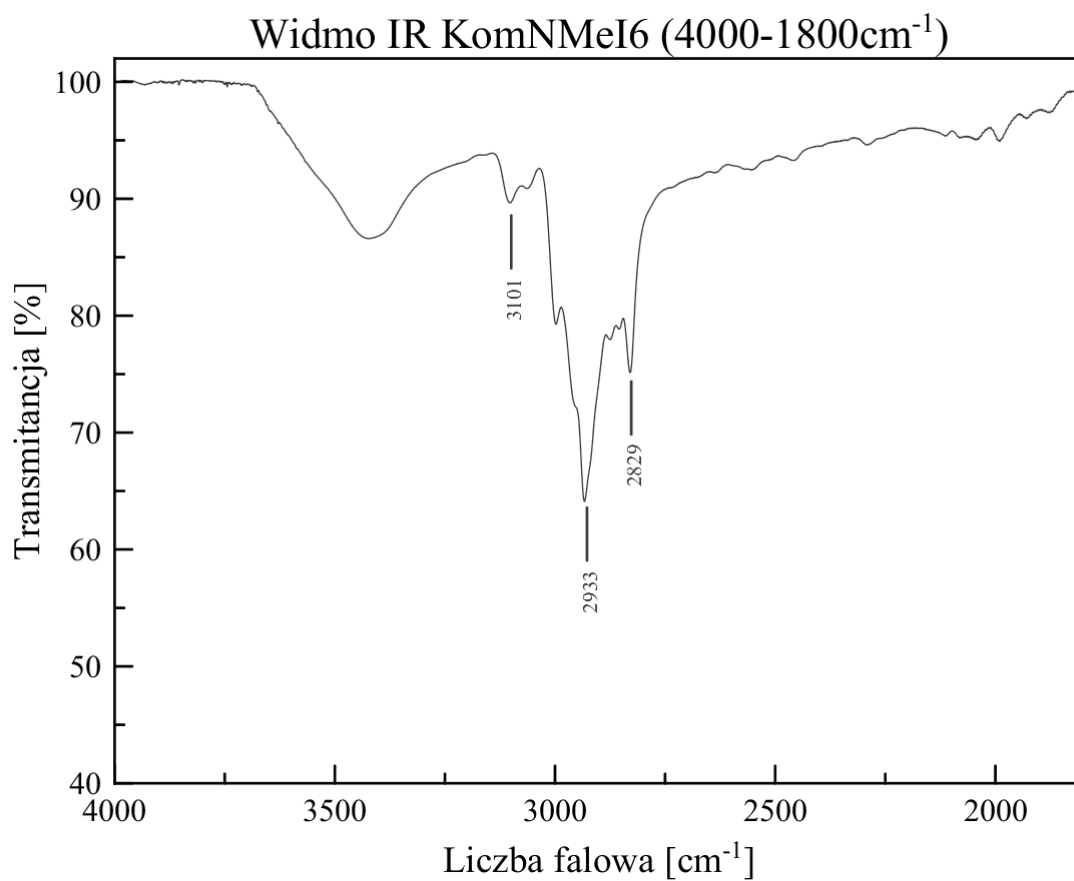
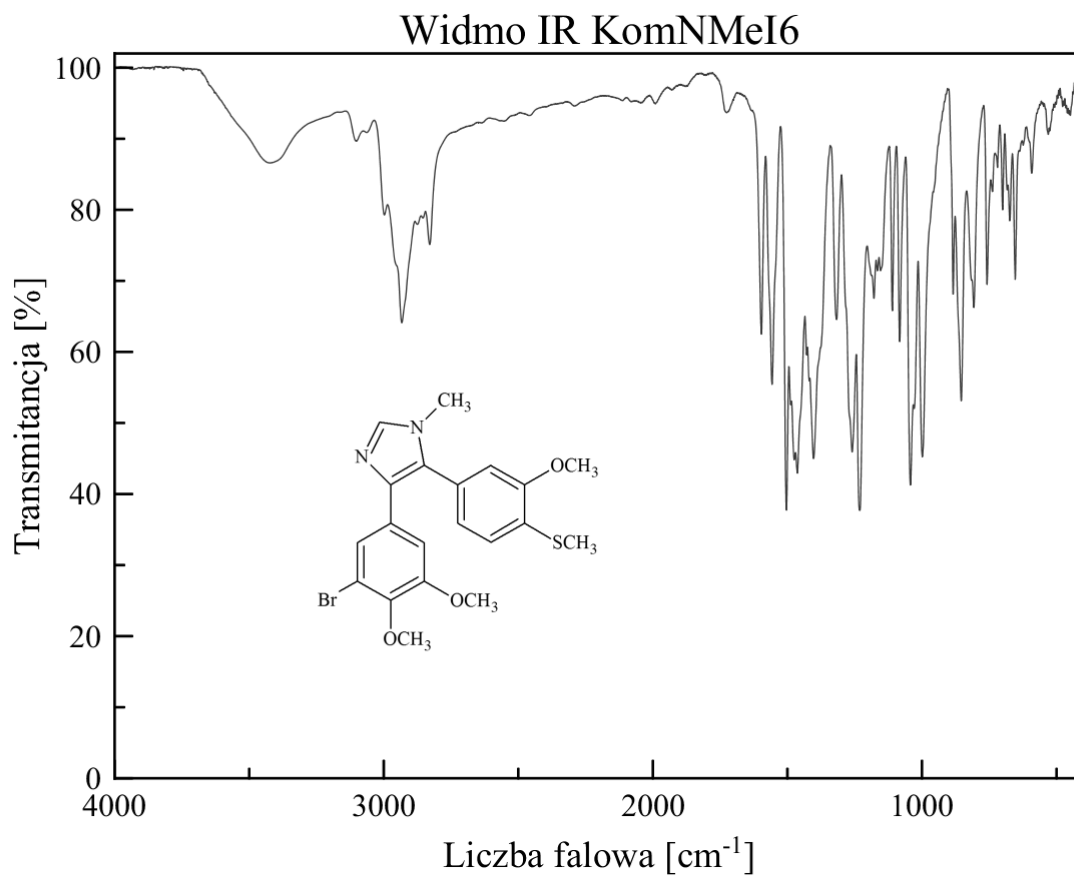


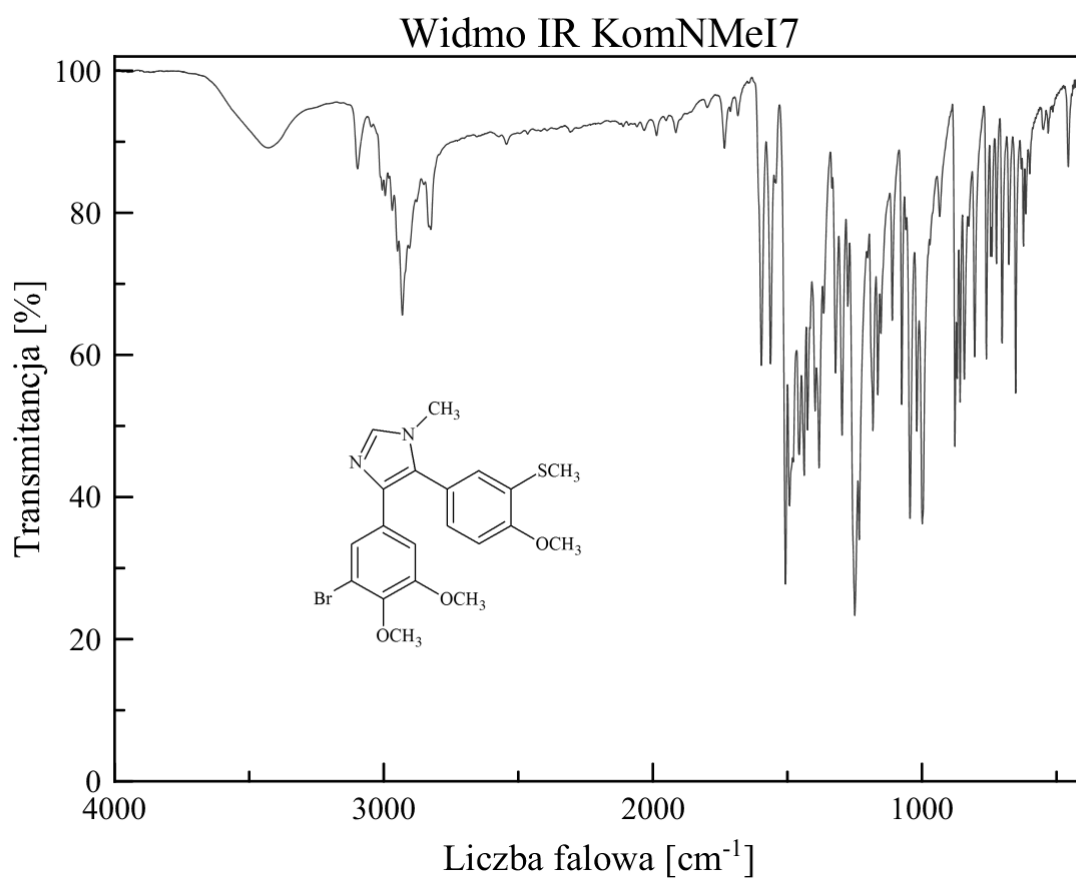
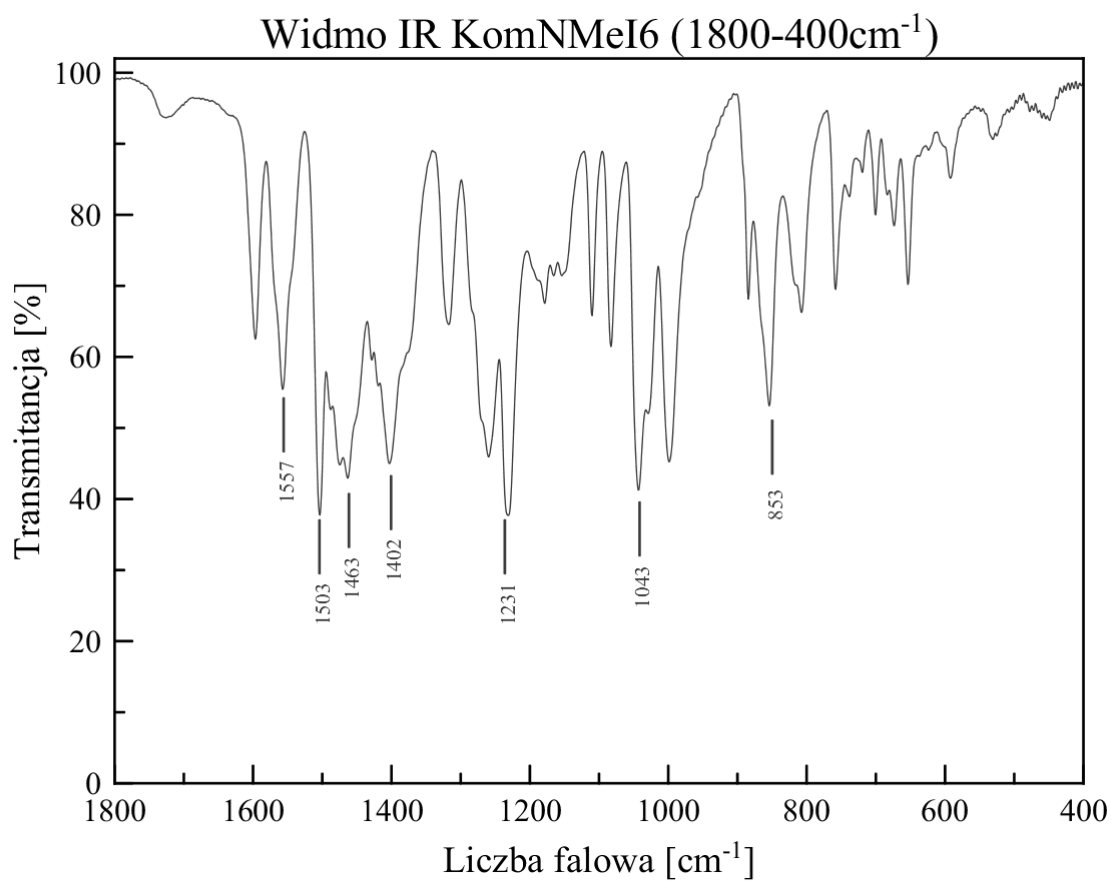
Widmo IR KomNMeI2

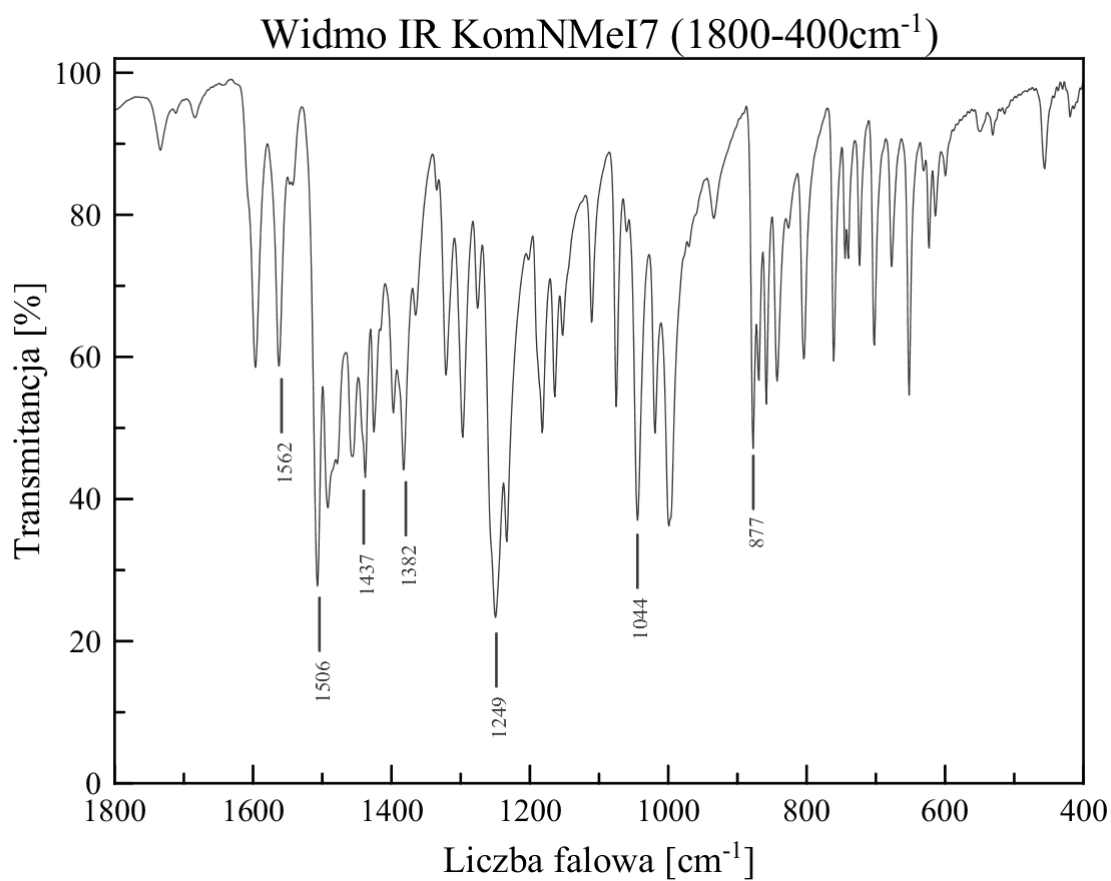
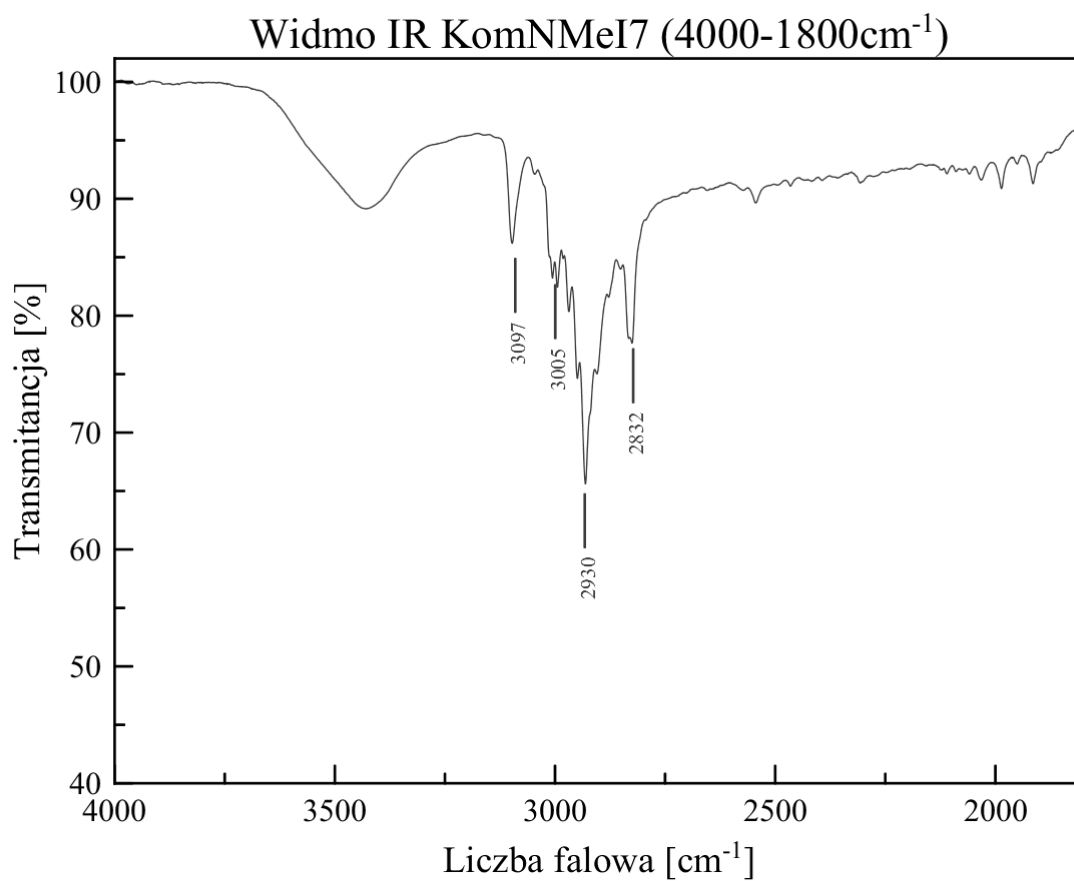
Widmo IR KomNMeI2 (4000-1800 cm^{-1})











OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (www.wbc.poznan.pl).

Poznań, dnia 04.04.2014r.

.....

(podpis)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy.....**doktorskiej**.....
p.t.:

"Projektowanie, synteza i ocena biologiczna tiopochodnych stilbenu".

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia **... naukowego: doktor nauk farmaceutycznych...**, a złożona przeze mnie dyskietka/płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko Tomasz Stefański

Data, podpis

.....