

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234097**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424478**

(22) Data zgłoszenia: **02.02.2018**

(51) Int.Cl.

C07C 251/36 (2006.01)

C07C 249/08 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **(E)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu i (Z)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu
oraz sposób ich jednoczesnego otrzymywania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
12.08.2019 BUP 17/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.01.2020 WUP 01/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**BARTŁOMIEJ POTANIEC, Wrocław, PL
MIROSLAW ANIOŁ, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

recz. pat. Anna Kasperowicz

PL 234097 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest (*E*)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu o wzorze 2 i (*Z*)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu o wzorze 3 przedstawione na rysunku. Przedmiotem wynalazku jest również sposób jednoczesnego otrzymywania (*E*)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu i (*Z*)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu.

Wynalazek może znaleźć zastosowanie jako potencjalny inhibitor wzrostu mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii, drożdży oraz grzybów strzępkowych.

Wynalazek może znaleźć zastosowanie jako składnik potencjalnego leku w terapii przeciwnowotworowej.

Chalkony, (*E*)-1,3-difenylo-2-propen-1-ony, należą do licznej grupy bioflawonoidów występujących w roślinach. Są one prekursorami w biosyntezie wszystkich klas związków flawonoidowych. Posiadając strukturę α,β -nienasyconych bicyklicznych naturalnych ketonów wykazują szerokie spektrum działania w zależności od rodzaju podstawników przyłączonych do pierścieni aromatycznych. Wykazują one aktywność antybakteryjną, antynowotworową i przeciwzapalną. [D. Kumar, N.M. Kumar, K. Akamatsu, E. Kusaka, H. Harada, T. Ito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, 20, 3916–3919; M.L. Go, X. Wu, X.L. Liu, *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, 483–499; P.M. Sivakumar, S. Ganesan, P. Veluchamy, M. Doble, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2010, 76, 407–411; Z. Nowakowska, *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, 42, 125–137; S.Y. Shin, Y.H. Lee, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 2013, 56, 113–116]. Wysoka aktywność biologiczna naturalnie występujących chalkonów zachęciła środowisko naukowe do syntezy nowych pochodnych o szkielecie *trans*-chalkonu.

Jednymi z pochodnych są oksymy chalkonów. Oksymy stanowią ważną klasę związków organicznych o ogólnej budowie $RR'C=N-OH$. Są one prekursorami takich grup funkcyjnych jak aminy, związki nitrowe, amidy. Ponadto mogą również działać jako ważne ligandy w mono i wielopierścieniowych kompleksach metali. [Marti-Rujas, J.; Colombo, L.; Lü, J.; Dey, A.; Terraneo, G.; Metrangolo, P.; Pilati, T.; Resnati, G. *Chem. Commun.* 2012, 8207; Aakeröy, C. B.; Panikkattu, S.; Chopade, P. D., Desper, J. *Cryst. Eng. Comm.* 2013, 15, 3125]. W wyniku deprotonacji mogą funkcjonować jako silne ligandy mające zastosowanie w chemii koordynacyjnej metali. [Konidaris, K. F.; Katsoulakou, E.; Kaplanis, M.; Bekiari, V.; Terzis, A.; Raptopoulou, C. P.; Manessi-Zoupa, E.; Perlepes, S. P. *Dalton Trans.* 2003, 39, 4492; Chaudhuri, P.; Weyhermüller, T.; Wagner, R.; Khanra, S.; Biswas, B.; Bothe, E.; Bill, E. *Inorg. Chem.* 2007, 46, 9003]. Oksymy wykazują również immunosupresyjną aktywność i niską cytotoksyczność. Istnieją również dowody na ich zdolność do zahamowania klinicznego i histologicznego obrazu zapalenia mózgu i rdzenia podczas terapii przeprowadzonej na szczurach [Levine, S.; Sowiński, R. *J. Immunol.* 1978, 2, 602]. Pochodne oksymowe dezoksybenzoiny posiadają działanie immunosupresyjne. Cztery oksymy dezoksybenzoiny wykazywały niższą cytotoksyczność i aktywność hamującą proliferację przeciwciał CD3 i przeciwciał CD28 limfocytów T niż inne związki. Dodatkowo oksym 3-bromo-2-hydrokso-dezoksybenzoiny wykazuje 100-krotnie niższą cytotoksyczność niż cyklosporyna A (CsA). Wstępne badania wykazały, że związek ten wykazuje działanie immunosupresyjne przez indukowanie apoptozy w aktywowanych komórkach węzłów chłonnych, w sposób zależny od dawki. [Li, H. Q.; Luo, Y.; Song, R.; Li, Z. L.; Yan, T.; Zhu, H. L. *ChemMedChem* 2010, 5, 1117].

Oksymy chalkonów mogą mieć zastosowanie jako potencjalne środki immunosupresyjne charakteryzujące się wysoką skutecznością i niską cytotoksycznością. Istnieją w literaturze doniesienia o ich aktywności hamującej proliferację przeciwciał CD3 i przeciwciał CD28 limfocytów T. Ponadto oksym 4-metoksy-4'-metoksychalkonu wykazywał 200-krotnie mniejsze właściwości cytotoksyczne niż CsA. [Yin Luo, Ran Song, Yao Li, Shuai Zhang, Zhi-Jun Liu, Jie Fu, Hai-Liang Zhu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 2012, 3039–3043]. Dodatkowo wykazano, że oksymy chalkonów hamują namnażanie przeciwciał linii komórkowych raka płuc A549, raka szyjki macicy Hela i raka MCF-7. Najsilniejsze działanie antyproliferacyjne miał oksym 5'-amino-2,4,6-trimetoksychalkonu, co znalazło również potwierdzenie w badaniach symulacji dokowania. Związek ten wiąże się ściśle do domeny kolchicyny na tubulinie i działa jako inhibitor polimeryzacji mikrotubul. [Yan-Ting Wang, Ya-Juan Qin, Ya-Liang Zhang, Yu-Jing Li, Bing Rao, Yan-Qing Zhang, Meng-Ru Yang, Ai-Qin Jiang, Jin-Liang Qi, Hai-Liang Zhu, *RSC Adv.*, 2014, 4, 32263–32275]. Istnieją również doniesienia literaturowe dotyczące badań symulacji wiązania pomiędzy tyrozynazą i hydroksypodstawionym oksymem naftylochalkonu. Niektóre z nich zostały zidentyfikowane jako inhibitory konkurencyjne tyrozynazy, wykazując działanie dwa razy silniejsze od kontroli – kwasu kojowego. Opracowanie inhibitorów tyrozynazy jest obiecującym podejściem do zwalczania przebarwień, plam soczewicowatych, piegów i przebarwień pozapalnych. Może dać to podstawę

do tworzenia nowych związków przeciwko odbarwieniom oraz zapobiegającym brązowieniu żywności. [Sini Radhakrishnan, Ronald Shimmon, Costa Conn, Anthony Baker, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 2015, 4085–4091]. Ponadto, oksymy, popularne w chemii supramolekularnej są silnymi dawcami wiązania wodorowego, które może być zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych z aminokwasami enzymu.

W dostępnej literaturze nie znaleziono doniesień na temat (*E*)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu oraz (*Z*)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu i sposobu ich wytwarzania.

Dotychczas nie są znane doniesienia dotyczące zastosowania oksymów 4'-fenylochalkonu jako związków o działaniu hamującym rozwój bakterii, drożdży oraz grzybów strzępkowych, a także jako związków o działaniu przeciwnowotworowym.

Istotą wynalazku jest (*E*)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu oraz (*Z*)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu.

Istotą wynalazku jest także sposób jednoczesnego otrzymywania (*E*)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu oraz (*Z*)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu polegający na tym, że do substratu, którym jest 4-bromo-4'-fenylochalkon o wzorze 1 dodaje się chlorowodorek hydroksyloaminy, bezwodny siarczan(VI) sodu w stosunku molowym co najmniej 1 : 1 : 1. Następnie dodaje się mieszaninę alkoholu i 1,4-dioksanu, po czym po rozpuszczeniu się substratów dodaje się pirydynę w stosunku molowym od 3 do 12 do chalkonu. Całość stanowi mieszaninę reakcyjną, którą zabezpiecza się przed dostępem światła i pozostawia w temperaturze od 18°C do 28°C na okres od 5 do 14 dni. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną wylewa się do schłodzonej wody albo wody z lodem, a następnie prowadzi się ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, osusza bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i/lub bezwodnym siarczanem(VI) sodu, a rozpuszczalnik odparowuje się. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej.

Korzystne jest, gdy stosunek molowy chalkon : chlorowodorek hydroksyloaminy : siarczan(VI) sodu wynosi 1 : 2 : 2 oraz pirydyny 3,53 w stosunku do chalkonu.

Korzystne także jest, gdy alkoholem jest alkohol etylowy i/lub alkohol metylowy.

Korzystne również jest, gdy w reakcji stosowana jest bezwodna pirydyna.

Korzystnym jest także, gdy rozpuszczalnikiem organicznym stosowanym do ekstrakcji jest octan etylu.

Korzystnie jest także, gdy reakcję prowadzi się przy ciągłym mieszaniu.

Korzystnie jest także, gdy reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej.

Korzystne jest również, gdy reakcję prowadzi się w atmosferze azotu.

Korzystnie jest także, gdy eluent stosowany do oczyszczania na kolumnie chromatograficznej stanowi mieszanina heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 5 : 1.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie (*E*)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu i (*Z*)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu w stosunku *E* : *Z* 0,94 : 1 z wydajnością 72,9%, z użyciem łatwo dostępnych odczynników.

Sposób wykonania wynalazku objaśniony jest w przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d otrzymywania

Do kolby okrągłodennej o pojemności 100 ml naważono 600 mg (1,65 mmol) 4-bromo-4'-fenylochalkonu oraz 230 mg (3,30 mmol) chlorowodoru hydroksyloaminy i 469 mg (3,30 mmol) bezwodnego siarczanu(VI) sodu. Całość rozpuszczono w 50 ml mieszaniny metanolu i 1,4-dioksanu (1 : 1, v/v). Aparaturę wypełniono azotem, dodano 0,472 ml (5,84 mmol) bezwodnej pirydyny i mieszano na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 13 dni bez dostępu światła. Następnie mieszaninę reakcyjną wylano do wody z lodem, w wyniku czego wytrącił się kleisty osad. Całość ekstrahowano octanem etylu (3 × 50 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto nasyconym roztworem chlorku sodu i suszono nad bezwodnym siarczanem(VI) sodu, po czym odsączono środek suszący, a rozpuszczalnik odparowano. Surowe produkty oczyszczono przy pomocy chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę heksan : octan etylu 5 : 1 (v/v), w wyniku czego uzyskano czyste stereoizomery *E* i *Z* oksymów 4-bromo-4'-fenylochalkonu w postaci białych proszków z wydajnością 72,9% (0,455 g) w stosunku *E* : *Z* 0,94 : 1.

Stałe fizyczne i spektroskopowe otrzymanych związków są następujące:

(*E*)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu, czyli oksym (1*E*,2*E*)-1-([1,1'-bifenyli]-4-ylo)-3-(4-bromofenylo)prop-2-en-1-onu:

Temp. topnienia = 130–133°C;

^1H NMR (600 MHz, aceton- d_6) δ [ppm]: 10,80 (1H, s, C=N-OH), 7,78 (1H, d, $J = 16,7$ Hz, H- α), 7,74 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3', H-5', AA'BB'), 7,72 (2H, m, $J = 7,4$ Hz, H-2'', H-6''), 7,65 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2, H-6), 7,62 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-2', H-6', AA'BB'), 7,51–7,45 (4H, m, H-3'', H-5'', H-3, H-5), 7,39 (1H, m, $J = 7,4$ Hz, H-4''), 6,88 (1H, d, $J = 16,7$ Hz, H- β);

^{13}C NMR (150 MHz, aceton- d_6) δ [ppm]: 156,47 (C=N-OH), 142,18 (C-4'), 141,18 (C-1''), 136,93 (C- β), 136,76 (C-1'), 132,09 (C-1), 130,38 (C-2', C-6'), 129,96 (C-2, C-6), 129,81 (C-3'', C-5''), 128,47 (C-4''), 127,71 (C-3, C-5), 127,70 (C-2'', C-6''), 127,58 (C-3', C-5'), 123,14 (C-4), 119,14 (C- α);

UV (MeOH) λ_{max} [nm]: 275,07;

HR ESI-MS m/z : 378,0488 [M+H]⁺; obliczona dla C₂₁H₁₇BrNO: 378,0488 [M+H]⁺;

(Z)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu, czyli oksym (1Z,2E)-1-([1,1'-bifenyl]-4-ylo)-3-(4-bromofenylo)prop-2-en-1-onu:

Temperatura topnienia = 120–123°C;

^1H NMR (600 MHz, aceton- d_6) δ [ppm]: 10,47 (1H, s, C=N-OH), 7,79 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5', AA'BB'), 7,74 (2H, m, $J = 8,3$ Hz, H-2'', H-6''), 7,53–7,48 (4H, m, $J = 8,5, 8,1$ Hz, H-3, H-5, H-3'', H-5''), 7,46 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2, H-6, AA'BB'), 7,44 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2', H-6', AA'BB'), 7,40 (1H, m, $J = 7,4$ Hz, H-4''), 7,17 (1H, d, $J = 16,4$ Hz, H- α), 6,52 (1H, d, $J = 16,4$ Hz, H- β);

^{13}C NMR (150 MHz, aceton- d_6) δ [ppm]: 158,21 (C=N-OH), 141,81 (C-4'), 141,30 (C-1''), 136,82 (C-1'), 134,09 (C- β), 132,63 (C-3, C-5), 131,62 (C-1), 130,31 (C-2', C-6'), 129,81 (C-2, C-6), 129,45 (C-3'', C-5''), 128,75 (C- α), 128,46 (C-4''), 127,77 (C-2'', C-6''), 127,46 (C-3', C-5'), 122,33 (C-4);

UV (MeOH) λ_{max} [nm]: 281,04;

HR ESI-MS m/z : 378,0491 [M+H]⁺; obliczona dla C₂₁H₁₇BrNO: 378,0488 [M+H]⁺.

Zastrzeżenia patentowe

1. (E)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu o wzorze 2 przedstawiony na rysunku.
2. (Z)-oksym 4-bromo-4'-fenylochalkonu o wzorze 3 przedstawiony na rysunku.
3. Sposób jednoczesnego otrzymywania (E)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu o wzorze 2 i (Z)-oksymu 4-bromo-4'-fenylochalkonu, **znamienny tym**, że do substratu, którym jest 4-chloro-4'-fenylochalkon o wzorze 1 dodaje się chlorowodorek hydroksyloaminy, bezwodny siarczan(VI) sodu w stosunku molowym co najmniej 1 : 1 : 1, następnie dodaje się mieszaninę alkoholu i 1,4-dioksanu, po czym po rozpuszczeniu się substratów dodaje się pirydynę w stosunku molowym od 3 do 12 do chalkonu, co stanowi mieszaninę reakcyjną, którą zabezpiecza się przed dostępem światła i pozostawia w temperaturze od 18°C do 28°C na okres od 5 do 14 dni, po czym mieszaninę reakcyjną wylewa się do schłodzonej wody albo wody z lodem, a następnie prowadzi się ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, osusza bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i/lub bezwodnym siarczanem(VI) sodu, a rozpuszczalnik odparowuje się, następnie otrzymany ekstrakt oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stosunek molowy chalkon : chlorowodorek hydroksyloaminy : siarczan(VI) sodu wynosi 1 : 2 : 2.
5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że w reakcji stosowana jest bezwodna pirydyna.
6. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że alkoholem jest alkohol etylowy i/lub alkohol metylowy.
7. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że rozpuszczalnikiem organicznym stosowanym do ekstrakcji jest octan etylu.
8. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się przy ciągłym mieszaniu.
9. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej.
10. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w atmosferze azotu.
11. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że eluent stosowany do oczyszczania na kolumnie chromatograficznej stanowi mieszanina heksanu i octanu etylu w stosunku objętościowym 5 : 1.

Rysunki

