RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **205635**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **346955**

(22) Data zgłoszenia: **09.04.2001**

(51) Int.Cl.
C07D 311/36 (2006.01)
C07F 7/08 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)

(54) **Nowe pochodne genisteiny i zawierające je środki farmaceutyczne**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
21.10.2002 BUP 22/02

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.05.2010 WUP 05/10

(73) Uprawniony z patentu:
INSTYTUT FARMACEUTYCZNY, WARSZAWA, PL
NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO, WARSZAWA, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
OSMAN ACHMATOWICZ, WARSZAWA, PL
GRZEGORZ GRYNKIEWICZ, ŁOMIANKI, PL
WIESŁAW PUCKO, WARSZAWA, PL
ALEKSANDER P. MAZUREK, WARSZAWA, PL
KRZYSZTOF POLKOWSKI, WARSZAWA, PL
JERZY BORYSKI, POZNAŃ, PL
WIESŁAW SZEJA, GLIWICE, PL
WIESŁAW SZELEJEWSKI, WARSZAWA, PL
ADAM OPOLSKI, OBORNIKI ŚLĄSKIE, PL
GABRIELA PASTUCH-GAWOŁEK, BYTOM, PL
CZESŁAW RADZIKOWSKI, KSAWERÓW, PL
BARBARA SZECHNER, WARSZAWA, PL
JOANNA WIETRZYK, WROCŁAW, PL
JANUSZ SKIERSKI, WARSZAWA, PL
ILONA WANDZIK, GLIWICE, PL
PIOTR KRZECZYŃSKI, WARSZAWA, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Krzywdzińska Ewa
Instytut Farmaceutyczny

PL 205635 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne genisteiny i zawierające je środki farmaceutyczne. Nowe pochodne genisteiny wykazują działanie przeciwnowotworowe.

Naturalne izoflawony, a szczególnie genisteina (5,7,4'-trihydroksy-3-fenylochromen-4-on), charakteryzują się wielokierunkowym działaniem biologicznym, w szczególności zdolnością hamowania aktywności białkowych kinaz tyrozynowych - grupy enzymów mających istotne znaczenie dla ekspresji protoonkogenów i onkogenów. Aktywność ta rzutuje na potencjalną przydatność genisteiny w terapii i prewencji chorób nowotworowych, chorób układu krążenia, osteoporozy i innych. Niestety całkowita ilość izoflawonów w surowcach roślinnych jest niewielka. W surowcach sojowych wynosi na przykład od 0,1 do 0,3%, przy czym główne składniki flawonowe nasion *Glycine max* Merill (fasola sojowa) stanowią β-D-glukozydy: genistyna, daidzyna i glicytyna, zaś odpowiadające im aglikony (genisteina, daidzeina i glicyteina) są praktycznie nieobecne w surowcu i pojawiają się w znaczących ilościach dopiero pod wpływem obróbki termicznej lub fermentacji w procesie przetwórczym.

W związku z wysuwaną przez badaczy sugestią, że za korzystne działanie soi odpowiedzialne są glikozydy izoflawonów, a nie ich aglikony, rośnie zainteresowanie wytwarzaniem glikozydów i innych pochodnych genisteiny w sposób syntetyczny.

Prowadzone uprzednio prace nad otrzymywaniem genistyny (7-O-β-D-glukopiranozydu genisteiny) (J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1998, 2481) wskazują, że grupy fenolowe genisteiny są nierównocenne pod względem reaktywności chemicznej i grupa 7-hydroksylowa wykazuje 100-krotnie większą kwasowość niż grupa 4'-hydroksylowa. Oczekiwana na podstawie obliczeń kwasowości kolejność podstawienia atomów wodoru w grupach fenolowych (7-OH>>4'-OH>5-OH) nie znajduje jednak odzwierciedlenia w znanych strukturach prostych pochodnych genisteiny, które stanowią na ogół wynik wyczerpującego alkilowania lub acylowania (na przykład znane są pochodne trimetylosililowa, trimetylowa, trietylowa, triacetylowa i tribenzoilowa).

Ostatnio, w publikacji w Tetrahedron 56 (2000), 7805 ujawniono mono- i diestry genisteiny z kwasem oleinowym i stearynowym oraz regioselektywny sposób ich otrzymywania.

Obecny wynalazek dostarcza szeregu pochodnych genisteiny zawierających selektywnie wprowadzone określone grupy funkcyjne, które mogą odgrywać ważne funkcje biologiczne, w szczególności mogą ulegać eliminacji bądź przekształcaniu w wyniku procesów metabolicznych zachodzących w organizmie.

Istotę wynalazku stanowią pochodne genisteiny o wzorze 1, w którym R_1 i R_2 są takie same lub różne i niezależnie oznaczają:

- atom wodoru,
- allil,
- benzyl,
- grupę $-COCH_3$ (acetyl),
- C_{15}-alkilokarbonyl,
- grupę R_5 (R_6) R_7-Si-, gdzie R_5, R_6 i R_7 są takie same lub różne i oznaczają C_{1-3}-alkil,
- grupę monosacharydową, w której co najmniej jedna grupa hydroksylowa może być podstawiona grupami acylowymi lub benzylowymi;

R_3 oznacza atom wodoru lub grupę $-COCH_3$;

R_4 oznacza atom wodoru;

oraz ich farmaceutycznie dopuszczalne sole.

Przez określenie grupa sacharydowa należy rozumieć pochodną cukrów prostych: pentozy, heksozy lub heptozy w postaci łańcuchowej lub cyklicznej.

W pierwszej odmianie wynalazku korzystne pochodne genisteiny przedstawione są wzorem 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru, benzyl lub grupę R_5 (R_6) R_7-Si-, R_2 oznacza atom wodoru, grupę $-COCH_3$ lub grupę R_5 (R_6) R_7-Si-, a R_3 i R_4 oznaczają atom wodoru lub grupę $-COCH_3$.

W drugiej odmianie wynalazku korzystne pochodne genisteiny według wynalazku przedstawione są wzorem 1, w którym jeden podstawnik spośród R_1 i R_2 oznacza atom wodoru, podczas gdy drugi oznacza allil lub C_{15}-alkilokarbonyl, R_3 stanowi atom wodoru lub grupę $-COCH_3$, a R_4 stanowi atom wodoru.

Do korzystnej grupy związków według wynalazku należą glikozydy genisteiny przedstawione wzorem 1, w którym jeden spośród podstawników R_1 i R_2 oznacza grupę monosacharydową, podczas gdy drugi oznacza atom wodoru, a R_3 i R_4 oznaczają atom wodoru.

Szczególnie korzystne glikozydy stanowią furanozydy.

Pochodne genisteiny według wynalazku wykazują silne i selektywne działanie antyproliferacyjne i cytotoksyczne, a dodatkowo niektóre z nich, na przykład pochodne sililowe, mogą stanowić cenne związki pośrednie w otrzymywaniu innych pochodnych.

Pochodne genisteiny przedstawione wzorem 1 można otrzymać, zależnie od rodzaju i miejsca podstawienia podstawnika, wykorzystując jako związek wyjściowy genisteinę, jej syntetyczny prekursor 2,4,6,4'-tetradeoksybenzoinę lub genistynę (7-O-β-D-glukopiranozylogenisteinę).

Genisteinę z grupami hydroksylowymi w pozycjach 7 i 4" zabezpieczonymi w postaci pochodnych sililowych, przedstawione wzorem 1, w którym R_1 i R_2 jednocześnie oznaczają grupę $R_5(R_6)R_7$-Si-, a R_3 i R_4 stanowią atom wodoru, otrzymuje się poddając genisteinę działaniu nadmiaru chlorku alkilosililowego w obecności imidazolu, w rozpuszczalniku organicznym takim jak dimetyloformamid. Otrzymane w ten sposób pochodne disililowe można następnie poddawać reakcji selektywnego acylowania w pozycji 7, działając na nie odpowiednim chlorkiem lub bezwodnikiem kwasowym w obecności zasady organicznej, takiej jak na przykład pirydyna. Uzyskuje się w ten sposób mono-O-acylowe pochodne genisteiny o wzorze 1, w którym R_1 oznacza alkilokarbonyl lub arylokarbonyl, R_2 oznacza grupę $R_5(R_6)R_7$-Si-, a R_3 i R_4 stanowią atom wodoru.

Mono-O-acylowe pochodne genisteiny posiadają silnie zróżnicowane grupy funkcyjne: zasadolabilną grupę 7-O-acylową, kwasolabilną grupę 4-O-alkilosililową i niereaktywną grupę hydroksylową w pozycji 5, „zabezpieczoną" wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym. Pochodne te mogą stanowić substrat do otrzymywania niesymetrycznych pochodnych genisteiny zawierających dwa różne podstawniki w pozycjach 4' i 7.

7-Mono-O-acylowe pochodne genisteiny przedstawione wzorem 1, w którym R_1 oznacza alkilokarbonyl lub arylokarbonyl, a R_2, R_3 i R_4 stanowią atom wodoru, otrzymuje się ze związków disililowych, usuwając sililową grupę zabezpieczającą z pozycji 4' przez działanie rozcieńczonych kwasów lub jonów fluorkowych.

Diacylowe pochodne genisteiny przedstawione wzorem 1, w którym R_1 i R_2 są takie same i oznaczają alkilokarbonyl lub arylokarbonyl, a R_3 i R_4 stanowią atom wodoru, otrzymuje się działając na genisteinę co najmniej 4-krotnym nadmiarem molowym czynnika acylującego, takiego jak chlorek lub bezwodnik kwasowy, wobec zasady. Odpowiednie zasady stanowią aminy trzeciorzędowe, np. pirydyna, trialkiloaminy (w tym cykliczne) oraz zasady nieorganiczne, takie jak wodorotlenki lub węglany metali alkalicznych.

Działając na genisteinę niewielkim nadmiarem molowym czynnika acylującego (1,2-1,8 moli na mol genisteiny), otrzymuje się mieszaninę 7-O-acetylo- i 4'-O-acetylo-pochodnych genisteiny, które następnie można ewentualnie rozdzielić metodą chromatograficzną.

Pochodne genisteiny przedstawione wzorem 1, w którym R_1, R_3 i R_4 stanowią atom wodoru, R_2 oznacza alkil, allil lub aryl, otrzymuje się znanym ze stanu techniki sposobem, polegającym na działaniu na genisteinę niewielkim nadmiarem molowym czynnika alkilującego, takiego jak halogenek alkilu, w obecności zasady, albo też najpierw generując anion fenolanowy genisteiny przez działanie silną zasadą lub wodorkiem metalu i następnie poddając go reakcji z czynnikiem alkilującym.

Z kolei pochodne genisteiny zawierające podstawnik alkilowy w pozycji 5 otrzymuje się na drodze monoalkilowania tetradeoksybenzoiny, którą następnie poddaje się reakcji formylowania i cyklizacji, analogicznie jak to opisano w zgłoszeniu patentowym P-343505 dla genisteiny.

Wreszcie pochodne genisteiny podstawione w pozycji 3' przedstawione wzorem ogólnym 1, w którym R_4 oznacza grupę $-SO_3H$, SO_3^-, $-NH_2$ lub $-NO_2$, otrzymuje się w wyniku typowych reakcji sulfonowania, nitrowania czy wprowadzania grupy aminowej, stosując jako związek wyjściowy genisteinę.

Pochodne genisteiny przedstawione wzorem 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru, R_2 oznacza grupę sacharydową, a R_3 i R_4 stanowią atom wodoru, można otrzymać jednym ze znanych w chemii cukrów sposobów utworzenia wiązania glikozydowego w reakcji donora glikozylowego z akceptorem glikozylowym, wobec promotora, korzystnie w rozpuszczalniku organicznym, przy zastosowaniu aktywacji termicznej lub mikrofalowej. W powszechnie znanych z literatury sposobach jako donory glikozylowe stosuje się 1-pochodne glikozylowe, takie jak halogenki, estry, etery oraz glikale, których podstawnik anomeryczny można przekształcić w dobrą grupę opuszczającą. Zależnie od rodzaju podstawnika anomerycznego, reakcję glikozydowania prowadzić można w warunkach kwaśnych wobec kwasów Lewisa lub Bronsteda lub też, w przypadku reakcji wymiany anomerycznej, w warunkach zasadowych. Odpowiednie kwasy Bronsteda stanowią na przykład kwas toluenosulfonowy lub triflowy, zaś odpowiednie kwasy Lewisa stanowią tetrachlorek cyny, trichlorek glinu lub tetrachlorek tytanu.

Glikozydy genisteiny według wynalazku korzystnie otrzymuje się w reakcji wymiany anomerycznej, znanej na przykład z publikacji w Nucleosides, Nucleotides, 15, 771 (1996).

Jako akceptor glikozylowy stosuje się genisteinę lub jej pochodne acylowe, alkilowe bądź sililowe. Korzystne jest stosowanie selektywnie funkcjonalizowanych pochodnych ze względu na ich lepszą rozpuszczalność w środkowisku reakcji. Reakcja ta zapewnia nieoczekiwaną regioselektywność reakcji glikozydowania, pozwalającą uzyskiwać glikozydy genisteiny podstawione w pozycji 4' jako główne produkty reakcji.

Reakcję glikozydowania prowadzi się w warunkach bezwodnych, korzystnie w atmosferze gazu obojętnego, w rozpuszczalniku aprotonowym lub ich mieszaninie, w podwyższonej temperaturze.

W wyniku glikozydowania otrzymuje się mieszaninę anomerów glikozydów genisteiny, którą w razie potrzeby można rozdzielić metodą chromatografii żelowej lub krystalizacji.

Otrzymane glikozydowe pochodne genisteiny można dalej poddać selektywnemu funkcjonalizowaniu pozycji 5" grupy sacharydowej za pomocą odczynników acylujących, alkilujących, sililujących lub glikozydujących. W szczególności, grupę hydroksylową w pozycji 5" można selektywnie zabezpieczyć w sposób znany w chemii cukrów w postaci estrów kwasów mono- lub dikarboksylowych, ortoestrów, karbaminianów, sulfonianów, fosforanów oraz eterów, na przykład trytylowych, sililowych, alkoksyalkilowych lub tetrahydropiranylowych.

Pochodne genisteiny według wynalazku charakteryzują się różnorodnymi własnościami fizykochemicznymi, przy zachowaniu pożądanej aktywności biologicznej związku macierzystego.

Selektywne funkcjonalizowanie genisteiny pozwala uzyskiwać związki o pożądanych własnościach, takich jak rozpuszczalność w płynach ustrojowych, powinowactwo do biopolimerów, podatność na biodegradację, lipofilowość (powinowactwo do błon komórkowych), które z kolei decydują o własnościach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych związku. W szczególności 4'-furanozydy genisteiny oraz ich pochodne estrowe i eterowe wykazują wielokierunkową aktywność biologiczną, zarówno jako bezpośrednie prekursory genisteiny o dużej biodostępności, jak również jako integralne ligandy ważnych pod względem funkcjonalnym endogennych biopolimerów, w związku z czym zakres możliwych działań biologicznych i zastosowań medycznych nowych pochodnych obejmuje wszystkie działania genisteiny, ale się do nich nie ogranicza.

Pochodne genisteiny według wynalazku badano pod kątem aktywności biologicznej na wybranych liniach komórek nowotworowych, w różnych testach cytotoksyczności i cytostatyczności, posługując się technikami cytomerii statystycznej (SC) i cytometrii przepływowej (FC).

Metodyka badań.

Badanie aktywności przeciwnowotworowej pochodnych genisteiny wykonano oceniając wpływ tych związków na przeżywalność oraz namnażanie komórek w hodowli *in vitro*. W doświadczeniach wykorzystano komórki nowotworowe linii białaczkowych: Tib-152, Molt-4, Hl-60, L-1210, które inkubowano w obecności genisteiny (substancja referencyjna) lub badanych substancji w stężeniach z zakresu od 1 do 150 μM/l. Czas inkubacji wynosił od 12 do 72 godzin. Następnie komórki poddawano procesowi barwienia zestawem barwników fluorescencyjnych FDA (fluorescein diacetate) i PI (propidium iodide). FDA znakuje komórki żywe, natomiast PI komórki martwe. (Metoda FDA/PI jest rutynowo używana do pomiarów cytotoksyczności: Kenneth H., Senft JA., Senft J.: J. Histochem. and Cytometry 33, 77, 1985). Wybarwione próbki analizowano techniką cytometrii przepływowej. Wyniki pomiarów przedstawiano na dwuwymiarowych cytogramach i przeprowadzano analizę z uwzględnieniem następujących kryteriów: stopień wybarwienia FDA, stopień wybarwienia PI, wielkość i ziarnistość komórek. Każdy punkt doświadczalny wykonano w dwóch powtórzeniach, a w trakcie pomiaru cytometrycznego analizowano od 5000-10000 komórek. Przeżywalność komórek w hodowli kontrolnej była wyższa niż 90%.

Wyniki

Siłę działania toksycznego (cytotoksyczność względna) badanych związków wyrażono w odniesieniu do genisteiny, jako stosunek ilości procentowej żywych komórek w hodowli z genisteina do ilości procentowej komórek żywych w hodowli z badanym związkiem.

Wpływ badanych związków na tempo proliferacji (cytostatyczność względna) wyrażono w odniesieniu do genisteiny, jako stosunek gęstości hodowli komórkowej w obecności genisteiny do gęstości komórkowej w obecności badanego związku.

Wyniki oznaczeń zebrano w Tabeli 1.

T a b e l a 1

Lp.	Substancja	Siła działania cytotoksycznego względem genisteiny (zakres wartości uzyskany w badaniach)	Siła działania cytostatycznego względem genisteiny (zakres wartości uzyskany w badaniach)
1	11	1,0-32	1,0-4,3
2	12a i 12b	1,0-19	1,0-3,5
3	19	1,0-17	1,1-3,9
4	18	n.akt.*	0,1
5	16	n.akt.*	0,3
6	4	0,9-23	0,9-4,6
7	5	0,9-11	0,9-5,0
8	6	0,8-1,0	0,4-1,3
9	7	1,0-12	0,9-10
10	20	1,0-85	1,0-1,8

n.akt.* - związek nieaktywny

Wykazana w testach *in vitro* aktywność antyproliferacyjna (cytostatyczna) oraz przeciwnowotworowa (cytotoksyczna) nowych pochodnych genisteiny jednoznacznie wskazuje na możliwość ich potencjalnego zastosowania w onkologii klinicznej (chemioterapia nowotworów) i/lub chemoprewencji nowotworów.

Wynalazek obejmuje ponadto środek farmaceutyczny zawierający pochodną genisteiny o wzorze 1, w którym R_1 i R_2 są takie same lub różne i niezależnie oznaczają:

- atom wodoru,
- allil, benzyl,
- grupę $-COCH_3$ (acetyl),
- C_{15}-alkilokarbonyl,
- grupę $R_5(R_6)R_7$-Si-, gdzie R_5, R_6 i R_7 są takie same lub różne i oznaczają C_{1-3}-alkil,
- grupę monosacharydową, w której co najmniej jedna grupa hydroksylowa może być podstawiona grupami acylowymi lub benzylowymi;

R_3 oznacza atom wodoru lub grupę $-COCH_3$;

R_4 oznacza atom wodoru;

lub jej sól, w połączeniu z farmaceutycznie dopuszczalnymi nośnikami i substancjami pomocniczymi.

Środek farmaceutyczny według wynalazku może mieć postać odpowiednią do podawania drogą doustną, pozajelitową, donosową, podjęzykową lub doodbytniczą albo do podawania przez wdychanie lub wdmuchiwanie. W szczególności środek może mieć postać tabletki, pigułki, kapsułki, proszku, granulek, jałowego roztworu lub zawiesiny, aerozolu, ampułki lub czopka.

Odpowiednie postaci farmaceutyczne środka według wynalazku sporządza się w znany w farmacji sposób.

Postaci stałe, takie jak tabletki, pigułki, proszki, granulki lub kapsułki, sporządza się mieszając składnik aktywny z farmaceutycznym nośnikiem, takim jak skrobia kukurydziana, laktoza, sacharoza, sorbitol, talk, kwas stearynowy, stearynian magnezu, fosforan diwapniowy lub gumy, oraz innymi rozcieńczalnikami farmaceutycznymi, na przykład wodą, do utworzenia stałej mieszanki wstępnej, zawierającej jednorodną mieszaninę związku według wynalazku lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli. Tak uzyskaną mieszankę można następnie poddawać tabletkowaniu lub drażowaniu bądź napełniać nią kapsułki. Tabletki lub granulki nowej kompozycji można powlekać lub przetwarzać w inny sposób dla uzyskania postaci jednostkowej zapewniającej korzystne wydłużone działanie. Do wytwarzania takich warstw zabezpieczających lub powlekających można stosować szereg różnych substancji, obejmujących różnorodne kwasy polimeryczne i mieszaniny kwasów polimerycznych z takimi substancjami jak szelak, alkohol cetylowy lub octan celulozy.

Postaci ciekłe odpowiednie do podawania środków według wynalazku doustnie lub przez iniekcje, obejmują roztwory wodne, syropy, zawiesiny wodne lub olejowe, emulsje z olejami jadalnymi,

takimi jak olej z nasion bawełny, olej sezamowy, olej kokosowy lub z orzechów ziemnych, jak również eliksiry z podobnymi nośnikami farmaceutycznymi. Odpowiednie środki dyspergujące lub zawieszające dla zawiesin wodnych obejmują syntetyczne i naturalne gumy takie jak tragakanta, akacja, alginian, dekstran, karboksymetyloceluloza sodu, metyloceluloza, poliwinylopirolidon lub żelatyna.

Środki farmaceutyczne według wynalazku mogą znaleźć zastosowanie w chemioterapii i/lub chemioprewencji nowotworów.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania.

P r z y k ł a d 1

7-t-Butylodimetylosililoksy-5-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenylo)chromen-4-on (**2a**) i

5,7-dihydroksy-3-(4'-t-butylodimetylosililoksyfenylo)chromen-4-on (**2b**)

Do roztworu genisteiny **1** (2,7 g, 10 mmol) w bezwodnym N,N-dimetyloformamidzie (DMF), dodano imidazol (1,36 g, 20 mmol) oraz chlorek t-butylodimetylosililowy (1,65 g, 11 mmol) i prowadzono reakcję w temperaturze pokojowej przez 24 h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono toluenem (300 ml) i przemyto wodą (2 x 50 ml). Roztwór toluenu osuszono bezwodnym $MgSO_4$, zatężono na wyparce rotacyjnej i pozostałość 0,3 g żółtego oleju krzepnącego w temperaturze pokojowej oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej „flash", eluując mieszaniną heksan:octan etylu (10:1 obj/obj). Otrzymano 0,27g (wyd. 7%) mieszaniny produktów **2a** i **2b** w postaci białych kryształów.

Dla związków **2a** i **2b**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 0,21 (s, 6H, CH_3), 0,99 (s, 9H, t-Bu), 6,33-6,38 (m, 2H, H-6, H-8), 6,86-6,92 (m, 2H, H-3', H-5'), 7,38 (d, 2H, H-2', H-6', J=8,6 Hz), 7,85 (s, 1H, H-2), 12,92 (s, 1H, 5-OH).

HR MS dla $C_{21}H_{24}O_5Si$: obliczono 384,1393, znaleziono 384, 1382; m/z 384 (M+), 327 (100%).

P r z y k ł a d 2

7-t-Butylodimetylosililoksy-5-hydroksy-3-(4'-t-butylodimetylosililoksyfenylo)chromen-4-on (**3**)

Postępując według procedury opisanej w Przykładzie 1 do roztworu genisteiny **1** (2,7 g, 10 mmol) w DMF (30 ml), dodano imidazol (2,72 g, 40 mmol) oraz chlorek t-butylodimetylosililowy (3,3 g, 22 mmol), reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1,5 godz. Otrzymano 5,34 g żółtego osadu, który oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą heksan:octan etylu (20:1 obj/obj). Uzyskano 4,19 g (wyd. 84%) produktu **3** oraz 0,26 g (wyd. 6%) mieszaniny produktów **2a** i **2b** w postaci białych kryształów. Dla związku **3**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 0,23 (s, 6H, CH_3), 0,28 (s, 6H, CH_3), 0,99 (s,18H, t-Bu), 6,31 (d, 1H, H-6, J= 2,2 Hz), 6,35 (d, 1H, H-8, J=2,2 Hz), 6,91 (d, 2H, H-3', H-5', J=8,6 Hz), 7,39 (d, 2H, H-2', H-6', J= 8,6 Hz), 7,86 (s, 1H, H-2), 12,82 (s, 1H, 5-OH).

HR MS dla $C_{27}H_{38}O_5Si_2$: obliczono 498, 2257, znaleziono 498, 2248; m/z 498 (M+), 441 (100%).

P r z y k ł a d 3

7-t-Butylodimetylosililoksy-5-acetoksy-3-(4'-acetoksyfenylo)chromen-4-on (**4**)

7-t-Butylodimetylosililoksy-5-hydroksy-3-(4'-acetoksyfenylo)chromen-4-on (**5**)

Do roztworu związku **3** (4 g, 8 mmol), (otrzymanego według Przykładu 2) w bezwodnej pirydynie (15 ml) dodano bezwodnik octowy (1,5 ml, 16 mmol) i prowadzono reakcję w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Po tym czasie mieszaninę rozcieńczono toluenem (100 ml) i przemyto zimną wodą (3 x 30 ml). Roztwór toluenu osuszono bezwodnym $MgSO_4$, zatężono pod próżnią na wyparce i dodatkowo odparowano z toluenem (2 x 10 ml). Uzyskany żółty osad (4,03 g) oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując mieszaninę eluującą heksan: octan etylu (15:1 obj). Otrzymano 2,32 g (wyd. 62%) produktu **4** w postaci białych kryształów oraz 1,02 g (wyd. 30%) produktu **5** w postaci słomkowych kryształów.

Dla związku **4**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 0,21 (s, 6H, CH_3), 0,99 (s, 9H, t-Bu), 2,34 (s, 3H, CH_3CO), 2,42 (s, 3H, CH_3CO), 6,84 (d, 1H, J=2,4 Hz), 6,87 (d, 2H, H-3', H-5', J=8,6 Hz), 7,23 (d, 1H, H-6, J=2,4 Hz), 7,34 (d, 2H, H-2', H-6', J=8,6 Hz), 7,85 (s, 1H, H-2).

HR MS dla $C_{25}H_{28}O_7Si$: obliczono 468, 1604, znaleziono 468, 1620; m/z 468 (M+), 426 (54%), 369 (100%), 327 (99%). Dla związku **5**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 0,23 (s, 6H, CH_3), 1,00 (s, 9H, tBu), 2,33 (s, 3H, CH_3CO), 6,58 (d, 1H, H-6, J=2,2 Hz), 6,75 (d, 1H, H-8, J=2,2), 6,92 (d, 2H, H-3', H-5', J=8,6 Hz), 7,40 (d, 2H, H-2', H-6', J=8,6 Hz), 7,94 (s, 1H, 5-OH).

HR MS dla $C_{23}H_{26}O_6Si$: obliczono 426, 1498, znaleziono 426, 1506; m/z 426 (M+), 369 (62%), 327 (100%).

P r z y k ł a d 4

7-Hydroksy-5-acetoksy-3-(4'-acetoksyfenylo)chromen-4-on (**6**)

Do roztworu związku **4** (0,8 g, 1,6 mmol), (otrzymanego według Przykładu 3) w THF (20 ml) dodano 1 M roztwór wodny Bu_4NF (0,8 ml, 0,8 mmol). Całość mieszano w temperaturze pokojowej

kontrolując przebieg reakcji metodą TLC. Po kilku minutach zakończono reakcję, mieszaninę reakcyjną rozcieńczono chlorkiem metylenu (50 ml) i przemyto wodą (20 ml). Roztwór chlorku metylenu osuszono bezwodnym $MgSO_4$, zatężono i pozostałość w postaci osadu oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej, stosując mieszaninę eluującą benzen:octan etylu (4:1 obj/obj). Uzyskano 0,3 g (wyd. 53%) produktu **6** w postaci białych kryształów.

Dla związku **6**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 2,28 (s, 3H, CH_3CO), 2,29 (s, 3H, CH_3CO), 6,60 (d, 1H, H-6, J=2,38 Hz), 6,80 (d, 1H, H-8, J=2,38 Hz), 7,21 (d, 2H, H-3', H-5', J=8,6 Hz), 7,50 (d, 2H, H-2', H-6', J=8,6 Hz), 8,36 (s, 1H, H-2), 11,19 (s, 1H, 7-OH).

HR MS dla $C_{19}H_{14}O_7$: obliczono 354, 0739, znaleziono 354, 0722; m/z 354 (M+), 312 (37%), 270 (100%).

P r z y k ł a d 5

7-O-benzoilo-4'-O-tert-butylodimetylosililogenisteina (**7**)

Postępując według procedury opisanej w Przykładzie 3, do roztworu 7,4'-di(O-tert-butylodimetylosililo)genisteiny (**3**) (500 mg, 1 mmol) w bezwodnej pirydynie (2 ml) dodano bezwodnik kwasu benzoesowego (452 mg, 2 mmol). Całość mieszano w temp. pok. przez 24 godziny. Surowy produkt **7** oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą heksan:octan etylu. Otrzymano 312 mg (wyd. 64%) monobenzoesanu genisteiny (**7**).

Dla związku **7**: UV nm (log ε) 257 (4,62), 328 (3,67); IR (KBr) 3073, 2955, 2929, 2858, 1742 i 1670 cm^{-1}; MS (LSIMS(+) NBA): m/z 489 [M.+H]+;

Własności związków otrzymanych w Przykładach 1-5 zebrano w Tabeli 2. Dla wszystkich związków R_4 stanowi atom wodoru.

T a b e l a 2

Związek nr	R_1	R_2	R_3	Temp. topn. (°C)
2a	$tBu(CH_3)_2Si$-	OH	OH	-
2b	OH	$tBu(CH_3)_2Si$-	OH	-
3	$tBu(CH_3)_2Si$-	$tBu(CH_3)_2Si$-	OH	72-74
4	$tBu(CH_3)_2Si$-	CH_3CO-	CH_3CO-	120-121
5	$tBu(CH_3)_2Si$-	CH_3CO-	OH	134-135
6	OH	CH_3CO-	CH_3CO-	183-190
7	Bz	$tBu(CH_3)_2Si$-	OH	152-154

P r z y k ł a d 6

7-O-Palmitynian genisteiny (**8**) i

7,4'-O-dipalimitynian genisteiny (**9**)

Postępując według procedury opisanej w Przykładzie 3, do roztworu genisteiny (**1**) (270 mg, 1 mmol) w bezwodnej pirydynie (5 ml) dodano chlorek palmityloilowy (328 mg, 1,2 mmol). Całość mieszano w temp. pok. przez 24 godziny. Surową mieszaninę 565 mg mono- i diacylowej pochodnej genisteiny (**8** i **9**) rozdzielano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą chloroform:etanol (98:2 obj/obj). Otrzymano 125 mg (wyd. 24,6%) związku **8** i 190 mg (wyd. 25,5%) związku **9** w postaci białych osadów.

Dla związku **8**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 0,9 (t, 3H, J=6,2 Hz), 1,16-1,36 (m, 24H), 1,7 (m, 2H), 2,58 (t, 2H, J=7,4 Hz), 6,56 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,7 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,85 (dd, 2H, J1=8,8 Hz, J2=2,2 Hz), 7,4 (dd, 2H, J1=8,8 Hz, J2=2,2 Hz), 7,9 (s, 1H), 12,8 (s, 1H);

HR MS dla $C_{31}H_{40}O_6$: obliczono 508, 2825, znaleziono 508, 2837; m/z 508 (M+), 270 (100%).

Dla związku **9**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 0,9 (t, 6H, J=6,2 Hz), 1,16-1,36 (m, 48H), 1,7 (m, 4H), 2,58 (t, 4H, J=7,4 Hz), 6,56 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,7 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,17 (dd, 2H, J_1=8,8 Hz, J_2=2,2 Hz), 7,54 (dd, 2H, J_1=8,8 Hz, J_2=2,2 Hz), 7,96 (s, 1H), 12,8 (s, 1H);

HR MS (LSIMS(+), [M.+H]+): dla $C_{47}H_{71}O_7$: obliczono 747, 5199, znaleziono 747, 5249; m/z 747 [M.+H]+.

P r z y k ł a d 7

7-O-palmitynian genisteiny (**8**)

Postępując według procedury opisanej w Przykładzie 6, do roztworu genisteiny (1) (108 mg, 0,4 mmol) w N,N-dimetyloformamidzie (DMF) (15 ml) dodano t-butanolan potasu (45 mg, 0,4 mmol) i całość mieszano w temp. Pokojowej przez 1 godzinę. Następnie do mieszaniny dodano chlorek

palmityloilowy (121 mg, 0,44 mmol) i mieszanie kontynuowano w temp. pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę wylano na wodę z lodem (75 g) i ekstrahowano 2 x 30 ml mieszaniną eter dietylowy:octan etylu (1:1 obj/obj). Zebrane ekstrakty przemyto nasyconym roztworem $NaHCO_3$, wodą, osuszono bezwodnym siarczanem sodu, zatężono na wyparce i pozostałość oczyszczono chromatograficznie. Otrzymano 90 mg (wyd. 44,3%) 7-O-palmitynianowej pochodnej genisteiny (**8**) w postaci białego osadu dla której dane spektroskopowe ^{1}H NMR są zgodne z opisanymi dla związku **8** otrzymanego według Przykładu 6.

P r z y k ł a d 8

4'-O-Palmitynian genisteiny (**10**)

Postępując według procedury opisanej w Przykładzie 7 w reakcji genisteiny (**1**) (108 mg, 0,4 mmol) z chlorkiem palmityloilowym (121 mg, 0,44 mmol) wobec t-butanolanu potasu (148 mg, 1,32 mmol) otrzymano 95 mg (wyd. 46,8%) 4'-O-palmitynianowej pochodnej genisteiny (**10**) w postaci białego osadu.

Dla związku **10**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 0,9 (t, 3H, J=6,2 Hz), 1,26-1,35 (m, 24H), 1,7 (m, 2H), 2,58 (t, 2H, J= 7,4 Hz), 6,24 (d, 1H, J=2,0 Hz), 6,30 (d, 1H, J=2,0 Hz), 7,15 (d, 2H, J=8,4 Hz), 7,5 (d, 2H, J=8,4 Hz), 7,8 (s, 1H), 12,8 (s, 1H);

HR MS dla $C_{31}H_{40}O_6$: obliczono 508, 2825, znaleziono 508, 2800; m/z 508 (M+), 270 (100%).

P r z y k ł a d 9

4'-O-Antranilan genisteiny (**11**)

Postępując według procedury opisanej w Przykładzie 7 ,do roztworu genisteiny (**1**) (1,35 g, 5 mmol) w DMF (10 ml) dodano bezwodnik izatynowy (0,897g, 5,5 mmol) i katalityczną ilość 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) (61 mg, 0,5 mmol). Całość mieszano w temp. 95-100°C przez 6 godzin. Po ochłodzeniu do temp. pokojowej mieszaninę wylano na wodę z lodem (90 g), wytrącony surowy osad produktu **11** odsączono, przemyto wodą, wysuszono i oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą chloroform:etanol (100:2 obj/obj). Otrzymano 1,33 g (wyd. 68%) związku **11** w postaci jasno-żółtego osadu.

Dla związku **11**: ^{1}H NMR (DMSO-d_6), δ (ppm); 6,25 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,42 (d, 1H, J=2,2), 6,6 (m., 1H), 6,7 (bs, 2H), 6,84 (dd, 1H, J=8,6 Hz), 7,3 (m., 3H), 7,6 (dd, 2H, J_1=6,8 Hz, J_2=2,0 Hz), 7,9 (dd, 1H, J_1=8,2 Hz, J_2=1,6 Hz), 8,49 (s, 1H), 10,95 (bs, 1H), 12,88 (s, 1H);

UV nm (log ε) 259 (4,57); IR (KBr) 3458, 3352, 1689 1652 i 1620 cm^{-1};

HR MS dla $C_{22}H_{15}O_6N$: obliczono 389, 0899, znaleziono 389, 0882; m/z 389 (M+).

Własności związków otrzymanych w Przykładach 6-9 zebrano w Tabeli 3. We wszystkich związkach R_4 stanowi atom wodoru.

T a b e l a 3

Związek nr	R_1	R_2	R_3	Temp. topn. (°C)
8	$C_{15}H_{31}CO$	OH	OH	120-121
9	$C_{15}H_{31}CO$	$C_{15}H_{31}CO$	OH	97-98
10	OH	$C_{15}H_{31}CO$	OH	115-116
11	OH	2-(H_2N)-Ar-CO	OH	241

P r z y k ł a d 10

7-O-Piwaloiloksymetylogenisteina (**12a**) i

4'-O-piwaloiloksymetylogenisteina (**12b**)

Roztwór genisteiny (**1**) (270 mg, 1 mmol) w DMF (3 ml) z dodatkiem diizopropyloetyloaminy (DIPEA) (155 mg, 1,2 mmol) mieszano w temp. pokojowej przez 20 min. Po tym czasie do homogenicznej mieszaniny dodano chlorek piwaloiloksymetylu (180, 1,2 mola) i katalityczne ilości 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP). Całość mieszano w temp. pokojowej przez 5 dni. Następnie mieszaninę wylano na wodę z lodem (50 g) i wytrząśnięto z chlorkiem metylenu (2 x 25 ml). Połączone ekstrakty przemyto wodą do odczynu obojętnego, wysuszono bezwodnym Na_2SO_4 i zatężono na wyparce. Oleistą pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i naniesiono na kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym. Produkty alkilowania genisteiny **12a** i **12b** wymywano mieszaniną chloroform: etanol (100:2 obj/obj). Otrzymano po zatężeniu frakcji 120 mg (wyd. 31%) biało-kremowego osadu mieszaniny związków **12a** i **12b**. Dla związków **12a** i **12b**: UV nm (log ε) 260 (4, 59); IR (KBr) 3438 2973 1733 1653 i 1614 cm^{-1};

HR MS (LSIMS (+), [M.+H]+): dla $C_{21}H_{21}O_7$: obliczono 385, 1287, znaleziono 385, 1299; m/z 385 [M.+H]+.

P r z y k ł a d 11

7-O-Allilogenisteina (**13**)

Postępując według procedury opisanej w Przykładzie 10 mieszaninę genisteiny (**1**) (270 mg, 1 mmol) z bromkiem allilu (145 mg, 1,2 mmol) wobec diizopropyloetyloaminy (155 mg, 1,2 mmol) w DMF (5 ml) ogrzewano w temp. 60°C przez 24 godziny. Surowy produkt **13** oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą heksan:octan etylu (7:3 obj/obj). Otrzymano 150 mg (wyd. 48%) związku **13** w postaci biało-kremowego osadu.

Dla związku **13**: ^{1}H NMR (DMSO-d_6), δ (ppm); 4,7 (d, 2H, J=5,2 Hz), 5,27-5,47 (m, 2H), 5,95--6,14 (m., 1H), 6,43 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,68 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,81 (d, 2H, J=8,6 Hz), 7,38 (d, 2H, J=8,6 Hz), 8,41 (s, 1H), 9,62 (bs, 1H), 12,95 (s, 1H);

UV nm (log ε) 262 (4, 57); IR (KBr) 3126, 1666, 1612 1573 i 1517 cm^{-1}.

P r z y k ł a d 12

7-O-Allilo-5-acetoksy-3-(4'-acetoksyfenylo)chromen-4-on (**14**)

Do roztworu związku (**13**) (310 mg, 1 mmol) w bezwodnej pirydynie (5 ml) dodano bezwodnik octowy (5 ml). Całość mieszano w temp. pokojowej przez 24 godziny. Następnie mieszaninę rozcieńczono octanem etylu (50 ml), przemyto wodą (50 ml), 1 M roztworem kwasu solnego, nasyconym roztworem $NaHCO_3$ i solanką. Ekstrakt octanu etylu osuszono bezwodnym Na_2SO_4, zatężono na wyparce i pozostałość oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą heksan:octan etylu (7:3 obj/obj). Otrzymano 315 mg (wyd. 80%) związku **14** w postaci białego sadu.

Dla związku **14**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 2,31 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,63 (d, 2H, J=5,3 Hz) 5,33-5,49 (m, 2H), 5,95-6,15 (m., 1H), 6,64 (d, 1H, J=2,4 Hz), 6,79 (d, 1H, J=2,4 Hz), 7,14 (d, 2H, J=8,6 Hz), 7,83 (s, 1H);

UV nm (log ε) 251 (4,45); IR (KBr) 3123, 3081 1773, 1644 1564 i 1507 cm^{-1}.

MS (LSIMS(+), NBA): m/z 395 [M.+H]+.

P r z y k ł a d 13

4'-O-[2-(3-cyjano-5-nitropirydylo)]genisteina (**15**)

Postępując według procedury opisanej w Przykładzie 10 mieszaninę genisteiny (**1**) (540 mg, 2 mmol), 2-chloro-3-cyjano-5-nitropirydyny (403 mg, 2,2 mmol) wobec diizopropyloetyloaminy (400 mg, 3,1 mmol) w DMF (6 ml) ogrzewano w temp. 80°C przez 3,5 godziny. Następnie mieszaninę ochłodzono do temp. pok. i wylano na wodę z lodem (60 g). Wytrącony osad produktu **15** odsączono, przemyto wodą i wysuszono. Otrzymano 718 mg (wyd. 86%) związku **15** w postaci jasno-beżowego osadu. Próbkę analityczną (100 mg) oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą heksan:octan (2:1 obj/obj).

Dla związku **15**: ^{1}H NMR (DMSO-d_6), δ (ppm); 6,25 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,43 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,41 (d, 2H, J=8,7 Hz), 7,70 (d, 2H, J=8,7 Hz), 8,51 (s, 1H), 9,25 (d, 1H, J=2,7), 9,35 (d, 1H, J=2,7), 9,95 (bs, 1H), 12,85 (s, 1H);

UV nm (log ε) 262 (4,57); IR (KBr), 3382, 3082, 2248 (CN), 1654, 1605 1578 i 1516 cm^{-1};

MS (LSIMS(+), NBA): m/z 418 [M.+H]+.

P r z y k ł a d 14

Sól cezowa 4'-O-propylosulfonianu genisteiny (**16**)

Mieszaninę genisteinianu cezu (100 mg, 0,25 mmol) (otrzymanego w postaci kremowego osadu w reakcji genisteiny (270 mg, 1 mmol) z węglanem cezu (162 mg, 0,5 mmol) w metanolu (10 ml) prowadzonej w temp. pok. w czasie 0,5 godziny i odparowaniu metanolu do sucha), siarczanu propano--1,3-diylu (42 mg, 0,3 mmol) w DMF (3 ml) ogrzewano w temp. 60°C przez 1,5 godziny. Następnie mieszaninę odparowano pod próżnią i pozostałość krystalizowano z etanolu. Otrzymano 85 mg (wyd. 65%) związku **16** w postaci krystalicznego osadu.

Dla związku **16**: ^{1}H NMR (DMSO-d_6), δ (ppm); 1,87 (t, 2H, J=6,0 Hz), 3,55 (t, 2H, J=6,0 Hz), 4,15 (t, 2H, J=6,0 Hz), 6,39 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,64 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,82 (d, 2H, J=8,6 Hz), 7,38 (d, 2H, J=8,6 Hz), 8,39 (s, 1H) 9,59 (bs, 1H), 12,95 (s, 1H);

UV nm (log ε) 262 (4,38); IR (KBr), 1668, 1573 i 1520 cm^{-1};

Własności związków otrzymanych w Przykładach 10-14 zebrano w Tabeli 3. Dla wszystkich związków R_4 stanowi atom wodoru.

T a b e l a 3

Związek nr	R_1	R_2	R_3	Temp. Topn. (°C)
12a	$(CH_3)_3CO_2CH_2$	OH	OH	-
12b	OH	$(CH_3)_3CO_2CH_2$	OH	-
13	$CH_2=CHCH_2$	OH	OH	146
14	$CH_2=CHCH_2$	CH_3CO-	CH_3CO-	176-177
15	OH	2-(3-CN-5-NO_2)pirydyl	OH	266
16	OH	$CH_2CH_2CH_2SO_3^-Cs^+$	OH	-

P r z y k ł a d 15

3'-Nitrogenisteina (**17**)

Do mieszaniny genisteiny (1) (270 mg, 1 mmol) w lodowatym kwasie octowym (3 ml) dodano roztwór 65% kwasu azotowego (1 ml) i całość mieszano w temp. 0-5°C przez 2 godziny, a następnie w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Po tym czasie mieszaninę wylano do wody z lodem (40 g). Wytrącony osad produktu **17** odsączono, przemyto wodą i wysuszono. Otrzymano 242 mg (wyd. 77%) związku **17** w postaci żółtego osadu. Próbkę analityczną (100 mg) oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą heksan:octan (2:1 obj/obj).

Dla związku **17**: ^{1}H NMR (DMSO-d_6), δ (ppm); 6,07 (d, 1H, J=2,0 Hz), 6,25 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,02 (d, 1H, J=8,79Hz), 7,58 (dd, 1H, J1=8,6 Hz, J2=2,2 Hz), 7,97 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,33 (s, 1H) 10,8 (bs, 1H), 11,05 (bs, 1H), 12,6 (bs, 1H);

UV nm (log ε) 262 (4,57); IR (KBr), 3515, 3449, 3279, 3087, 2656, 1663, 1633, 1612, 1581, 1537 i 1495 cm^{-1};

P r z y k ł a d 15

3'-Sulfogenisteina (**18**)

Zawiesinę genisteiny (**1**) (270 mg, 1 mmol) w kwasie siarkowym stęż. (5 ml) mieszano w temp. pok. przez 12 h. Po tym czasie mieszaninę wylano do wody z lodem (50 g) i ekstrahowano mieszaniną n-butanol:octan etylu (8:2 obj/obj) 2 x 25 ml. Połączone ekstrakty przemyto mieszaniną solanka:woda (6:4 obj/obj) 3 x 25 ml do pH 2,5 i osuszono bezwodnym siarczanem sodu. Po usunięciu rozpuszczalników do sucha otrzymano 213 mg (wyd. 60%) związku **18** w postaci krystalicznego osadu.

Dla związku **18**: ^{1}H NMR (DMSO-d_6), δ (ppm); 6,22 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,34 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,81 (d, 1H, J=8,4Hz), 7,37 (dd, 1H, J1=8,4 Hz, J2=2,3 Hz), 7,67 (d, 1H, J=2,2 Hz), 8,4 (s, 1H) 10,6 (bs, 1H), 10,85 (s, 1H), 12,95 (s, 1H);

UV nm (log ε) 262 (4,49); IR (KBr), 1665, 1633, 1612, 1512, 1437 i 1197 cm^{-1}.

Własności związków otrzymanych w Przykładach 15-16 zebrano w Tabeli 5.

T a b e l a 5

Związek nr	R_1	R_2	R_3	R_4	Temp. topn. (°C)
17	OH	OH	OH	NO_2	262-263
18	OH	OH	OH	SO_3H	-

P r z y k ł a d 17

7-O-(3",4"-di-O-acetylo-6-deoksy-glukopiranozylo)genisteina (**19**)

Do roztworu genisteniny (**1**) (270 mg, 1 mmol) w THF bezw. (5 ml) dodano 3,4-di-O-acetylo-6--deoksy-L-glukal (428, 2 mmol) i kat. ilość bromowodorku trifenylofosfiny (PPh_3xHBr) (34 mg, 0,1 mmol). Całość mieszano w temp. 50°C przez 24 godziny. Po ochłodzeniu do temp. pok. mieszaninę wylano na wodę z lodem (50 g) z dodatkiem nasyconego roztworu $NaHCO_3$, obojętną mieszaninę przemyto octanem etylu (50 ml) i wodą. Ekstrakt octanu etylu osuszono bezwodnym Na_2SO_4, zatężono i pozostałość oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą chloroform:etanol (100:2 obj/obj). Otrzymano 90 mg (wyd. 18%) związku **19** w postaci bezbarwnego osadu.

Dla związku **19**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 1,16 (m, 3H), 2,07 (s, 6H), 2,46 (m, 1H) 3,94 (m, 1H), 4,84 (t, 1H), 5,47 (m, 1H), 5,62 (d, 1H), 6,36 (d, 1H, J=2,2 Hz), 6,39 (d, 1H, J=2,2 Hz), 7,12 (d, 2H, J=8,6 Hz), 7,42 (d, 2H, J=8,6 Hz), 7,79 (s, 1H), 9,40 (bs, 1H), 12,78 (s, 1H);

UV nm (log ε) 261 (4,53); IR (KBr) 1745, 1654, 1512 i 1369 cm^{-1}.

P r z y k ł a d 18

7-O-(2",3",5"-tri-O-benzylo-arabinofuranozylo)genisteina (**20**)

Do mieszaniny genisteniny (**1**) (270 mg, 1 mmol), 2,3,5-tri-O-benzyloarabinofuranozy (428, 2 mmol) w bezw. acetonitrylu (5 ml) ochłodzonej do temp. 0°C dodano kat. ilość SnCl (333 mg, 1,28 mmol). Następnie całość mieszano w temp. pok. przez 40 minut. Po tym czasie mieszaninę wylano na wodę z lodem (30 g) z dodatkiem nasyconego roztworu $NaHCO_3$ (20 ml), obojętna mieszaninę przemyto octanem etylu (50 ml) i wodą. Ekstrakt octanu etylu osuszono bezwodnym Na_2SO_4, zatężono i pozostałość oczyszczano chromatograficznie stosując mieszaninę eluującą heksan:octan etylu (8:2 obj/obj). Po odparowaniu odpowiednich frakcji otrzymano 150 mg (wyd. 22%) związku **20** w postaci bezbarwnego osadu. Dla związku **20**: ^{1}H NMR ($CDCl_3$), δ (ppm); 3,69 (d, 2H), 3,99 (d, 1H), 4,19-4,28 (m, 2H) 4,26 (q, 2H), 4,48 (q, 2H), 5,59 (s, 2H), 6,41 (s, 1H), 6,89 (d, 2H), 7,05 (m, 2H), 7,18-7,35 (m, 14H), 7,39 (d, 2H), 7,83 (s, 1H), 9,79 (s, 1H), 13,21 (s, 1H);

HR MS (LSIMS(+), [M.+H]+): dla $C_{41}H_{37}O_9$: obliczono 673, 2437, znaleziono 673, 2452; m/z 673 [M+H]+.

P r z y k ł a d 19

4'-O-(2",3",5"-tri-O-acetylo-α,β-D-rybofuranozylo)genisteina i

4'-O-(2",3",5"-tri-O-acetylo-α,β-D-rybofuranozylo)genisteina (**21a**, **21b**)

Do bezwodnego roztworu tetraacetylorybozy (954,8 mg; 3,0 mmol) w 40 ml chlorku metylenu dodano w temperaturze pokojowej 4,36 ml 0,87 M roztworu $SnCl_4$ w CH_2Cl_2 (990 mg; 3,8 mmol). Po 20 minutach roztwór ten dodano do mieszanej zawiesiny genisteiny (540,5 mg; 2,0 mmol) w bezwodnym acetonitrylu, uzyskując klarowny, żółty roztwór. Po 50 minutach mieszania w temperaturze pokojowej reakcję zakończono, dodając 40 ml zimnego nasyconego roztworu $NaHCO_3$ oraz 80 ml chloroformu. Warstwę organiczną oddzielono, warstwę wodną przemyto mieszaniną chloroform--acetonitryl 4:1 (50 ml). Połączone warstwy organiczne suszono nad Na_2SO_4, a następnie odparowano do sucha. Pozostałość po odparowaniu potraktowano chloroformem, uzyskaną zawiesinę przesączono. Przesącz odparowano do oleju, który rozpuszczono w 5 ml mieszaniny chloroform:etanol 4:1 (obj/obj) i rozdzielano na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym 60 H (5 x 8 cm) w gradiencie chloroform-etanol (od 98:2 do 9:1). Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano 550 mg (52%) produktu głównego, stanowiącego mieszaninę anomerów α i β w stosunku 1:2 (NMR).

P r z y k ł a d 19

4'-O-α-D-rybofuranozylo) genisteina i 4'-O-β-D-rybofuranozylo)genisteina (**22a** i **22b**).

Surową mieszaninę anomerów α i β triacetylorybogenisteiny otrzymanych w poprzednim przykładzie (400 mg; 0,757 mmol) rozpuszczono w 12 ml metanolu i dodano 4 ml 25% NH_4OH. Po 24 godzinach w temperaturze pokojowej stwierdzono na podstawie TLC całkowite odblokowanie grup hydroksylowych. Mieszaninę odparowano do sucha, następnie współodparowano z wodą (2 x 50 ml) i z etanolem (2 x 50 ml). Otrzymany olej rozpuszczono w etanolu (100 ml) i zaadsorbowano na żelu krzemionkowym (70-230 mesh) przez odparowanie. Produkt rozdzielano na kolumnie z żelem krzemionkowym 60 H (3,5 x 15 cm) w układzie toluen-etanol (4:1).

Otrzymano:

128,8 mg (42,3%) anomeru β (Rf=), w postaci białego osadu, który krystalizowano z wody uzyskując drobne igiełki o lekko różowym zabarwieniu, t.t. 199,5-201°C, czystość według HPLC 98,9%.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ (ppm): 12,91 (s, 1H); 10,92 (s, 1H); 8,38 (s, 1H); 7,49 (d, 2H); 7,04 (d, 2H), 6,40 (d, 1H); 6,23 (d, 1H), 5,51 (s, 1H); 5,36 (d, 1H); 5,03 (d, 1H), 4,70 (t, 1H); 4,02 (m, 2H); 3,91 (m, 1H); 3,54 (m, 1H); 3,36 (m, 1H); 64,4 mg (21,1%) anomeru α (Rf=), który krystalizowano z 30% etanolu, otrzymując bardzo drobne różowe igiełki o t.t. 158-160°C, czystość według HPLC 90,0%.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6), δ (ppm): 12,92 (s, 1H); 10,93 (bs, 1H); 8,39 (s, 1H); 7,49 (d, 2H); 7,11 (d, 2H); 6,40 (d, 1H); 6,24 (d, 1H); 5,63 (d, 1H); 4,72 (d, 1H); 4,92 (d, 1H); 4,82 (t, 1H); 4,07 (m, 1H); 3,96 (m, 2H); 3,49 (m, 2H).

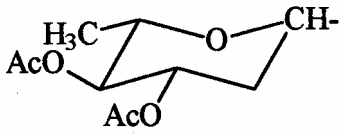
Własności związków otrzymanych w Przykładach 17-19 zebrano w Tabeli 6. We wszystkich związkach R_4 stanowi atom wodoru.

Tabela 6

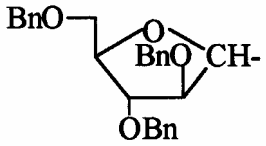
Związek nr	R_1	R_2	R_3	Temp. Topn. (°C)
19	a	OH	OH	-
20	b	OH	OH	133-134
21a	OH	c	OH	-
21b	OH	d	OH	-
22a	OH	e	OH	158-160
22b	OH	f	OH	199-201

Struktury podstawników we wzorach związków 19-22 przedstawiono poniżej.

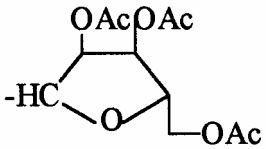
19: R_1 = a:



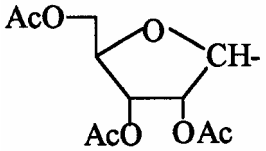
20: R_1 = b:



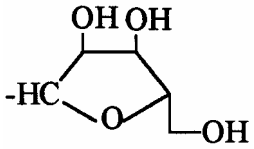
21a: R_2 = c



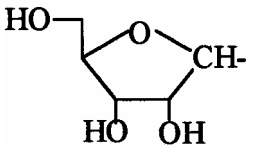
21b: R_2 = d:



22b: R_2 = e:



22b: R_2 = f:



Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodne genisteiny o wzorze 1, w którym R_1 i R_2 są takie same lub różne i niezależnie oznaczają:
- atom wodoru,
- allil, benzyl,
- grupę $-COCH_3$ (acetyl),

- C_{15}-alkilokarbonyl,
- grupę $R_5(R_6)R_7$-Si-, gdzie R_5, R_6 i R_7 są takie same lub różne i oznaczają C_{1-3}-alkil,
- grupę monosacharydową, w której co najmniej jedna grupa hydroksylowa może być podstawiona grupami acylowymi lub benzylowymi;

R_3 oznacza atom wodoru lub grupę $-COCH_3$;

R_4 oznacza atom wodoru;

oraz ich farmaceutycznie dopuszczalne sole.

2. Pochodne genisteiny według zastrz. 1, w których we wzorze 1, R_1 oznacza atom wodoru, benzyl lub grupę $R_5(R_6)R_7$-Si-, R_2 oznacza atom wodoru, grupę $-COCH_3$ lub grupę $R_5(R_6)R_7$-Si-, a R_3 i R_4 oznaczają atom wodoru lub grupę $-COCH_3$.

3. Pochodne genisteiny według zastrz. 1, w których we wzorze 1, jeden podstawnik spośród R_1 i R_2 oznacza atom wodoru, podczas gdy drugi oznacza allil lub C_{15}-alkilokarbonyl, R_3 stanowi atom wodoru lub grupę $-COCH_3$, a R_4 stanowi atom wodoru.

4. Pochodne genisteiny według zastrz. 1, w których we wzorze 1, jeden spośród podstawników R_1 i R_2 oznacza grupę monosacharydową, podczas gdy drugi oznacza atom wodoru, a R_3 i R_4 oznaczają atom wodoru.

5. Pochodne genisteiny według zastrz. 4, w których we wzorze 1, R_2 stanowi grupę furanozową, zaś R_1, R_3 i R_4 oznaczają atom wodoru.

6. Środek farmaceutyczny zawierający znane wypełniacze i/lub substancje pomocnicze, **znamienny tym**, że substancję czynną stanowi pochodna genisteiny o wzorze 1, w którym R_1 i R_2 są takie same lub różne i niezależnie oznaczają:

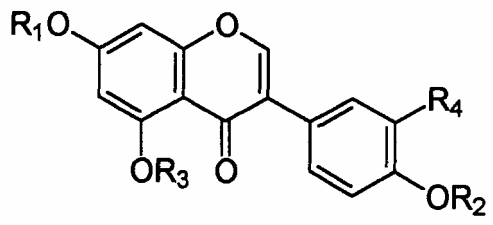
- atom wodoru,
- allil, benzyl,
- grupę $-COCH_3$ (acetyl), C_{15}-alkilokarbonyl,
- grupę R_5 (R_6) R_7-Si-, gdzie R_5, R_6 i R_7 są takie same lub różne i oznaczają C_{1-3}-alkil,
- grupę monosacharydową, w której co najmniej jedna grupa hydroksylowa może być podstawiona grupami acylowymi lub benzylowymi;

R_3 oznacza atom wodoru lub grupę $-COCH_3$;

R_4 oznacza atom wodoru;

albo jej farmaceutycznie dopuszczalna sól.

Rysunek



wzór 1

Departament Wydawnictw UP RP
Cena 4,00 zł.