

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235351**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422526**

(22) Data zgłoszenia: **09.08.2017**

(51) Int.Cl.

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/473 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **N-podstawione związki takryny, sposób wytwarzania oraz zastosowanie tych związków**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

11.02.2019 BUP 04/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.06.2020 WUP 08/20

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

PAWEŁ SZYMAŃSKI, Branice, PL

ELŻBIETA MIKICIUK-OLASIK, Łódź, PL

IRENEUSZ MAJSTEREK, Łódź, PL

NINA CHUFAROVA, Łódź, PL

KAMILA CZARNECKA, Łódź, PL

ROBERT SKIBIŃSKI,

Jakubowice Konińskie Kolonia, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Piotr Kamiński

PL 235351 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy nowych N-podstawionych związków takryny, sposobu wytwarzania tych związków oraz zastosowania związków w terapii.

Takryna (9-aminoakrydyna) jest znana jako inhibitor acetylocholino-esterazy i jako taka znajduje zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera. Jednakże związek ten wykazuje wysoką hepatotoksyczność, co istotnie ogranicza jego stosowanie.

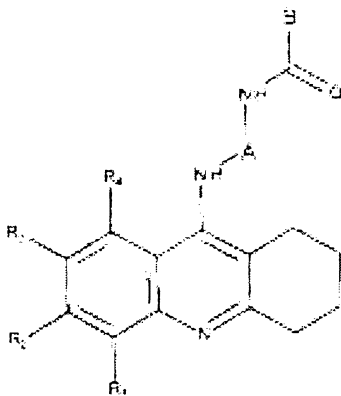
Trwają poszukiwania pochodnych takryny skutecznych terapeutycznie, ale wykazujących obniżoną toksyczność, w porównaniu z takryną. Opis patentowy US 6,194,403 ujawnia pochodne bis-takryny, które są sugerowane jako substancje biologicznie czynne do leczenia choroby Alzheimera.

Opis patentowy PL 213494 ujawnia pochodne zawierające skondensowany układ trójcykliczny połączony z hydrazynonikotynoamidem.

Wśród tych pochodnych ujawnione są także pochodne takryny. Wymienione pochodne skompleksowane z technetem mogą mieć zastosowanie jako związki kontrastujące dla nieinwazyjnej diagnostyki narządów wewnętrznych, a zwłaszcza mózgu, ze względu na tendencję do selektywnej kumulacji związków w ośrodkowym układzie nerwowym.

Celem przedmiotowego wynalazku jest dostarczenie nowych, N-podstawionych związków takryny, zwłaszcza wykazujących działanie terapeutyczne, oraz sposobu wytwarzania tych związków.

N-podstawiony związek takryny według wynalazku stanowi związek o wzorze I,

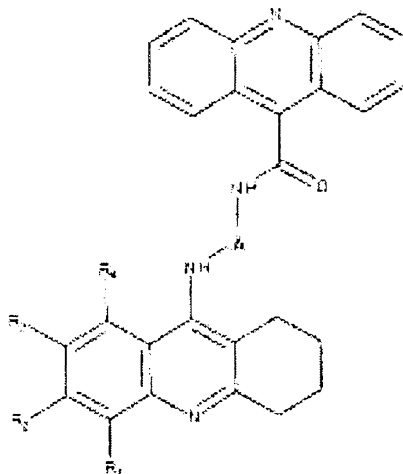


wzór 1

w którym R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależnie wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę aminową, grupę metylową, grupę metoksyową, grupę hydroksylową, grupę trifluorometylową, A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla, B oznacza akrydynę, przy czym linia poprowadzona pomiędzy atomem węgla ugrupowania karboksamidowego a podstawnikiem B oznacza wiązanie pojedyncze łączące niewęzłowy atom węgla akrydiny z atomem węgla grupy karbonylowej,

albo jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalna sól.

Korzystnie, N-podstawiony związek takryny odpowiada wzorowi VI,



wzór VI

w którym R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależne wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę aminową, grupę metylową, grupę metoksyłową, grupę hydroksyłową, grupę trifluorometylową, A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,

albo stanowi jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalną sól.

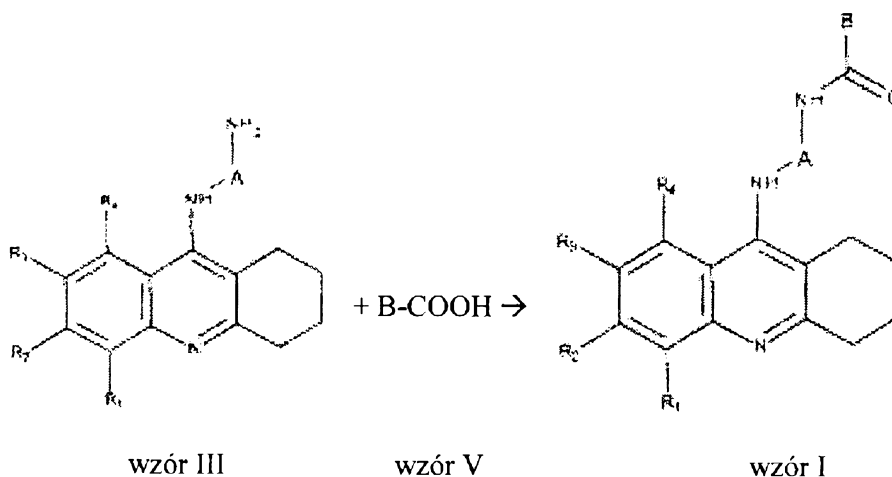
W szczególności, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależne wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę metylową, grupę metoksyłową, grupę trifluorometylową, A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dziesięciu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla.

Związkami o wzorze VI jest zwłaszcza:

- [2-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)etylo]akrydino-9-karboksamid,
- [3-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)propylo]akrydino-9-karboksamid,
- [4-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)butylo]akrydino-9-karboksamid,
- [5-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)pentylo]akrydino-9-karboksamid,
- [6-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)hexylo]akrydino-9-karboksamid,
- [7-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)heptylo]akrydino-9-karboksamid,
- [8-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)oktylo]akrydino-9-karboksamid,
- [9-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)nonylo]akrydino-9-karboksamid.

albo jego hydrat, solwat lub sól chlorowodorkowa.

Sposób wytwarzania N-podstawionych związków takryny określonych powyżej, według wynalazku charakteryzuje się tym, że N¹-(9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-diaminoalkan o wzorze III, w którym A oznacza alkilen, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,



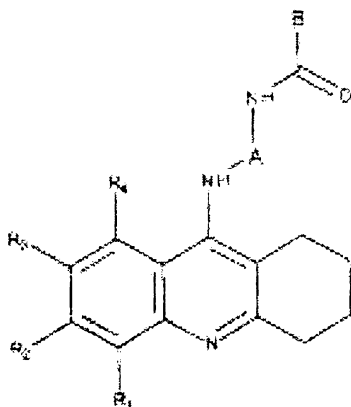
poddaje się reakcji z kwasem akrydynokarboksylowym o wzorze V, jego hydrat lub solwatem, w obecności N-metylomorfoliny i chlorodimetoksytriazyny, w temperaturze -5°C do 0°C , w środowisku co najmniej jednego organicznego rozpuszczalnika aprotowego, a wyizolowany produkt ewentualnie przekształca się w sól. Korzystnie, jako organiczny rozpuszczalnik aprotowy stosuje się eterowy rozpuszczalnik aprotowy, zwłaszcza wybrany z grupy obejmującej tetrahydrofuran (THF), dimetoksyetan, dioksan.

Związek określony powyżej stosuje się w terapii do leczenia choroby nowotworowej ze współistniejącą chorobą Alzheimera.

Związki według wynalazku nie zostały dotychczas ujawnione w literaturze chemicznej. Nieoczekiwanie, związki według wynalazku wykazują właściwości hamujące acetylocholinoesterazę i butyrylocholinoesterazę, oraz agregację beta-amyloidu, przy czym powinowactwo do wymienionych enzymów jest istotnie większe niż w przypadku takryny. Zarazem związki według wynalazku wykazują cytotoksyczność, co wykazano w testach na izolowanych hodowlach komórkowych, wskutek czego stanowią potencjalne substancje czynne do stosowania w terapii przeciwnowotworowej ze współistniejącą chorobą Alzheimera.

Wynalazek jest ponadto zilustrowany z powołaniem, rysunku, którego fig. 1 przedstawia kinetykę inhibitowania AChE, a fig. 2 zależność inhibicji agregacji peptydu AB od stężenia.

Związkiem według wynalazku jest N-podstawiony związek takryny o wzorze I,



wzór I

w którym

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależnie wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę aminową, grupę metylową, grupę metoksyłową, grupę hydroksylową, grupę trifluorometylową,

A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,

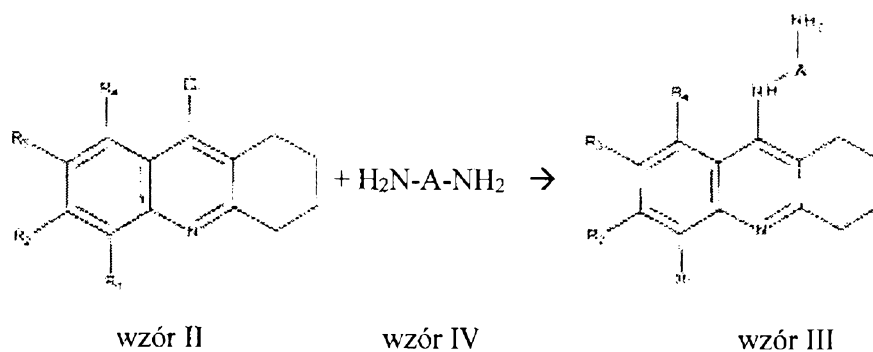
B oznacza akrydynę, przy czym linia poprowadzona pomiędzy atomem węgla ugrupowania karboksamidowego a podstawnikiem B oznacza wiązanie pojedyncze łączące atom węgla grupy karbonylowej z niewęzłowym atomem węgla w którymkolwiek z sześcioczłonowych pierścieni akrydyny,

albo jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalna sól.

W obrębie opisu wynalazku i zastrzeżeń patentowych, łańcuchem głównym w dwuwartościowym fragmencie alkilenowym A jest łańcuch węglowy, którego skrajnymi atomami węgla są atomy węgla połączone z atomami azotu.

Związek według wynalazku o wzorze 1 otrzymuje się w dwóch etapach ze związku 1,2,3,4-tetrahydroakrydynowego. W pierwszym etapie, zilustrowanym na schemacie I,

Schemat I



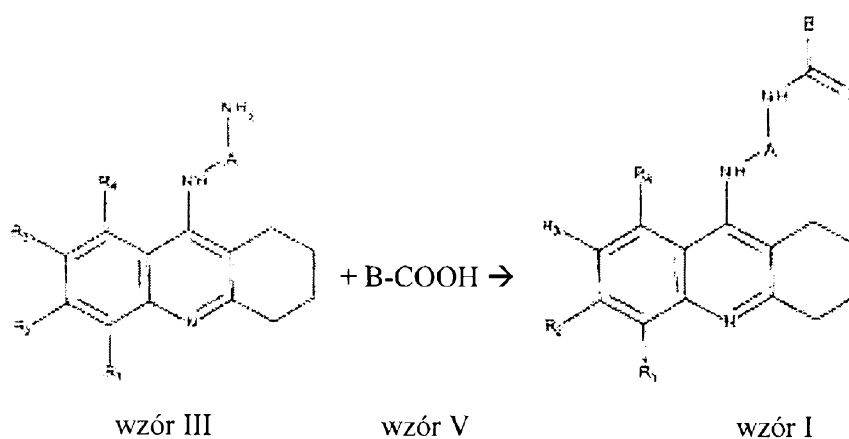
związek 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydynowy o wzorze II przeprowadza się w związek N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyno)-alkilodiaminowy o wzorze III w reakcji z diaminą o wzorze IV H₂N-A-NH₂ (w którym A oznacza fragment alkilenowy -(C_nH_{2n})-, gdzie n oznacza liczbę całkowitą od 2 do 12 włącznie), w obecności jodku sodu jako katalizatora, w środowisku fenolu jako rozcieńczalnika.

Reakcję prowadzi się w temperaturze 170°–180°C.

Korzystnie, stosuje się związek 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydynowy i diaminę w ilościach równomolowych. Fenol stosuje się w ilości odpowiadającej pięciokrotnej liczbie moli związku 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydynowego lub diaminy.

W kolejnym etapie, przedstawionym na schemacie II, związek N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyno)-alkilodiaminowy o wzorze III, w którym A ma wyżej podane znaczenie,

Schemat II



poddaje się kondensacji z kwasem akrydynokarboksylowym o wzorze B-COOH (wzór V), w którym to wzorze ugrupowanie B oznacza akrydynę a linia poprowadzona pomiędzy atomem węgla grupy karboksylowej a ugrupowaniem B oznacza wiązanie pojedyncze łączące niewęzłowy atom węgla akrydyny z atomem węgla grupy karboksylowej, do wytworzenia związku według wynalazku o wzorze I.

Kondensację prowadzi się w obecności N-metylomorfoliny i chlorodimetoksytriazyny, w środowisku rozpuszczalnika organicznego, w temperaturze łaźni lodowej, tj. $-5^{\circ} \div 0^{\circ}\text{C}$.

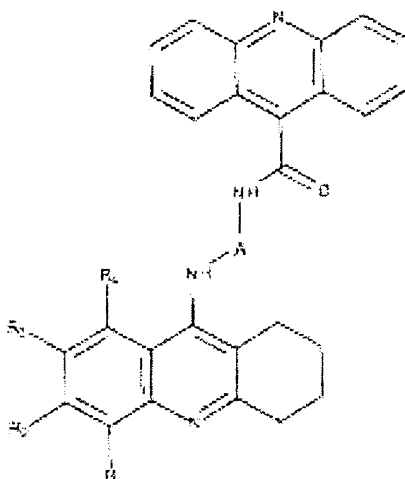
Korzystnie, rozpuszczalnikiem organicznym jest aprotanowy rozpuszczalnik organiczny lub mieszanina aprotanowych rozpuszczalników, bardziej korzystnie eterowy aprotanowy rozpuszczalnik organiczny lub mieszanina takich rozpuszczalników. Szczególnie korzystny rozpuszczalnik jest wybrany z grupy obejmującej tetrahydrofuran, dimetoksyetan, dioksan, oraz ich mieszaninę.

Stosuje się proporcję molową substratów/reagentów [związek N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-alkilodiaminowy o wzorze III / kwas akrydynokarboksylowy o wzorze V / N-metylomorfolina / chlorodimetoksytriazyna) odpowiadającą w przybliżeniu proporcji 1 : 1 : 1 : 1.

Korzystnie, jako kwas akrydynowy o wzorze V stosuje się kwas 9-akrydynokarboksylowy, na przykład hydrat kwasu 9-akrydynokarboksylowego.

Korzystnie, jako chlorodimetoksytriazynę stosuje się 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę.

Korzystnie, N-podstawionym związkiem takryny według wynalazku jest związek o wzorze VI,



wzór VI

w którym

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależnie wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę aminową, grupę metylową, grupę metoksyłową, grupę hydroksylową, grupę trifluorometylową,

A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,

albo jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalna sól.

Bardziej korzystnie, N-podstawionym związkiem takryny według wynalazku jest związek o wzorze VI, w którym R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależnie wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę metylową, grupę metoksyłową, grupę trifluorometylową,

A oznacza dwuwartościowy, fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dziesięciu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,

albo jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalna sól.

Szczególnie korzystnie, N-podstawionym związkiem takryny według wynalazku jest związek wybrany spośród następujących związków:

[2-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)etylo]akrydino-9-karboksamid,

[3-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)propylo]akrydino-9-karboksamid,

[4-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)butylo]akrydino-9-karboksamid,

[5-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)pentylo]akrydino-9-karboksamid,

[6-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)hexylo]akrydino-9-karboksamid,
[7-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)heptylo]akrydino-9-karboksamid,
[8-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)oktylo]akrydino-9-karboksamid,
[9-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)nonylo]akrydino-9-karboksamid.

albo jego hydrat, solwat lub sól chlorowodorkowa.

Związki według wynalazku stanowią nowy typ hybrydowych pochodnych zawierających fragment tetrahydroakrydynowy i fragment akrydynowy, i są związkami o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym. Związki według wynalazku są inhibitorami o właściwościach hamujących acetylocholinoesterazę i butyrylocholinoesterazę, oraz agregację beta-amyloidu. Badania powinowactwa do acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy wykazały, że poziom powinowactwa do wymienionych enzymów jest wyższy, niż w przypadku takryny.

Własności inhibitujące związków według wynalazku zostały wykazane w testach przeprowadzonych na izolowanych hodowlach komórkowych. Przeprowadzono także badanie czynności przeciwagregacyjnej β -amyloidu dla wybranego związku według wynalazku, który okazał się najskuteczniejszym inhibitorem AChE.

Tożsamość związków według wynalazku oraz struktury uzyskanych połączeń zostały potwierdzone metodami analiza spektralnych: MS, MS-HR, IR.

Przykłady

P r z y k ł a d 1

Związek 1a: N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-etano-1,2-diamina

Do 5 części molowych fenolu dodaje się 1 część molową 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydiny, 2 części molowe 1,2-etanodiaminy oraz jodek sodu w ilości katalitycznej, i miesza się na mieszadle magnetycznym w temperaturze 170–180°C przez 2 godziny. Mieszaninę poreakcyjną rozprowadza się w wodnym roztworze wodorotlenku potasu w obecności octanu etylu (proporcja objętościowa 1:1), ekstrahuje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-etano-1,2-diaminę do fazy organicznej, zatęża ekstrakt pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość poddaje się krystalizacji.

Związek 1b: chlorowodorek [2-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)etylo]akrydino-9-karboksamid

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksylowego (1,62 mmol, 0,39 g) w tetrahydrofuranie (10 ml) dodaje się N-metylomorfolinę (0,18 g, 1,78 mmol) oraz 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (0,31 g, 1,77 mmol) i miesza się na łaźni lodowej przez 3 godziny. Następnie dodaje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-etano-1,2-diaminę (1,74 mmol, 0,52 g). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [3-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)etylo]akrydino-9-karboksamid (wydajność 72% względem teoretycznej) o t.t. 198–215°C. Uzyskany związek przeprowadza się w sól – chlorowodorek – znaną metodą (np. według US 5,155,226) otrzymując związek 1b (0,06 g, wydajność 88% względem teoretycznej), o t.t. 177–195°.

P r z y k ł a d 2

Związek 2a: N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-propano-1,3-diamina

Związek 2a otrzymuje się postępując według procedury określonej w przykładzie 1 dla związku 1a, ale stosując 1,3-propanodiaminę zamiast 1,2-etanodiaminy.

Związek 2b: chlorowodorek [3-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)propylo]akrydino-9-karboksamid

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksylowego (1,45 mmol, 0,35 g) w tetrahydrofuranie (10 ml) dodaje się N-metylomorfolinę (0,16 g, 1,58 mmol) oraz 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (0,28 g, 1,59 mmol) i miesza się na łaźni lodowej przez 3 godziny. Następnie dodaje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-propano-1,3-diaminę (1,57 mmol). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [3-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)etylo]akrydino-9-karboksamid (wydajność 68% względem teoretycznej) o t.t. 210–255°C. Uzyskany związek przeprowadza się w sól – chlorowodorek – znaną metodą (np. według US 5,155,226) otrzymując związek 2b (0,04 g, wydajność 47% względem teoretycznej), o t.t. 191–228°.

P r z y k ł a d 3

Związek 3a: N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-butano-1,4-diamina

Związek 3a otrzymuje się postępując według procedury określonej w przykładzie 1 dla związku 1a, ale stosując 1,4-butanodiaminę zamiast 1,2-etanodiaminy.

Związek 3b: chlorowodorek [4-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)butylo]akrydino-9-karboksamid

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksylowego (1,12 mmol, 0,27 g) w tetrahydrofuranie (10 ml) dodaje się N-metylomorfolinę (0,12 g, 1,19 mmol) oraz 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (0,22 g, 1,25 mmol) i miesza się na łaźni lodowej przez 3 godziny. Następnie dodaje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-butano-1,4-diaminę (1,23 mmol, 0,33 g). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [4-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)butylo]akrydino-9-karboksamid (wydajność 70% względem teoretycznej) o t.t. 165–180°C. Uzyskany związek przeprowadza się w sól – chlorowodorek – znaną metodą (np. według US 5,155,226) otrzymując związek 3b (0,06 g, wydajność 68% względem teoretycznej), o t.t. 171–185°.

Przykład 4

Związek 4a: N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-pentano-1,5-diamina

Związek 4a otrzymuje się postępując według procedury określonej w przykładzie 1 dla związku 1a, ale stosując 1,5-pentanodiaminę zamiast 1,2-etanodiaminy.

Związek 4b: chlorowodorek [5-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)pentyl]akrydino-9-karboksamidu

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksylowego (1,58 mmol, 0,38 g) w tetrahydrofuranie (10 ml) dodaje się N-metylomorfolinę (0,17 g, 1,68 mmol) oraz 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (0,30 g, 1,71 mmol) i miesza się na łaźni lodowej przez 3 godziny. Następnie dodaje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-pentano-1,5-diaminę (1,69 mmol, 0,48 g). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [5-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)pentyl]akrydino-9-karboksamid (wydajność 67% względem teoretycznej) w postaci oleju. Uzyskany związek przeprowadza się w sól – chlorowodorek – znaną metodą (np. według US 5,155,226) otrzymując związek 4b (0,075 g, wydajność 24% względem teoretycznej), w postaci oleju.

Przykład 5

Związek 5a: N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-heksano-1,6-diamina

Związek 5a otrzymuje się postępując według procedury określonej w przykładzie 1 dla związku 1a, ale stosując 1,6-heksanodiaminę zamiast 1,2-etanodiaminy.

Związek 5b: chlorowodorek [6-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)heksyl]akrydino-9-karboksamidu

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksylowego (1,24 mmol, 0,30 g) w tetrahydrofuranie (10 ml) dodaje się N-metylomorfolinę (0,14 g, 1,38 mmol) oraz 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (0,24 g, 1,37 mmol) i miesza się na łaźni lodowej przez 3 godziny. Następnie dodaje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-heksano-1,6-diaminę (1,34 mmol, 0,40 g). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [6-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)heksyl]akrydino-9-karboksamid (wydajność 59% względem teoretycznej) w postaci oleju. Uzyskany związek przeprowadza się w sól – chlorowodorek – znaną metodą (np. według US 5,155,226) otrzymując związek 5b (0,038 g, wydajność 16% względem teoretycznej), w postaci oleju.

Przykład 6

Związek 6a: N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-heptano-1,7-diamina

Związek 6a otrzymuje się postępując według procedury określonej w przykładzie 1 dla związku 1a, ale stosując 1,7-heptanodiaminę zamiast 1,2-etanodiaminy.

Związek 6b: chlorowodorek [7-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)heptyl]akrydino-9-karboksamidu

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksylowego (1,12 mmol, 0,27 g) w tetrahydrofuranie (8 ml) dodaje się N-metylomorfolinę (0,12 g, 1,19 mmol) oraz 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (0,21 g, 1,20 mmol) i miesza się na łaźni lodowej przez 3 godziny. Następnie dodaje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-heptano-1,7-diaminę (1,21 mmol, 0,34 g). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [7-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)heptyl]akrydino-9-karboksamid (wydajność 62% względem teoretycznej) w postaci oleju. Uzyskany związek przeprowadza się w sól – chlorowodorek – znaną metodą (np. według US 5,155,226) otrzymując związek 6b (0,038 g, wydajność 26% względem teoretycznej), w postaci oleju.

Przykład 7

Związek 7a: N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-oktano-1,8-diamina

Związek 7a otrzymuje się postępując według procedury określonej w przykładzie 1 dla związku 1a, ale stosując 1,8-oktanodiaminę zamiast 1,2-etanodiaminy.

Związek 7b: chlorowodorek [8-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)oktyl]akrydino-9-karboksamidu

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksyłowego (3,11 mmol, 0,75 g) w tetrahydrofuranie (8 ml) dodaje się N-metylmorfolinę (0,34 g, 3,36 mmol) oraz 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (0,59 g, 3,36 mmol) i miesza się na łaźni lodowej przez 3 godziny. Następnie dodaje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-oktano-1,8-diaminę (3,37 mmol, 1,1 g). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [8-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)oktylo]akrydino-9-karboksamid (wydajność 66% względem teoretycznej) w postaci oleju. Uzyskany związek przeprowadza się w sól – chlorowodorek – znaną metodą (np. według US 5,155,226) otrzymując związek 7b (0,020 g, wydajność 47% względem teoretycznej), w postaci oleju.

Przykład 8

Związek 8a: N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-nonano-1,9-diamina

Związek 8a otrzymuje się postępując według procedury określonej w przykładzie 1 dla związku 1a, ale stosując 1,9-nonanodiaminę zamiast 1,2-etanodiaminy.

Związek 8b: chlorowodorek [9-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)nonylo]akrydino-9-karboksamidu

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksyłowego (2,36 mmol, 0,75 g) w tetrahydrofuranie (8 ml) dodaje się N-metylmorfolinę (0,26 g, 2,57 mmol) oraz 2-chloro-4,6-dimetoksy-1,3,5-triazynę (0,44 g, 2,51 mmol) i miesza się na łaźni lodowej przez 3 godziny. Następnie dodaje się N-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-nonano-1,9-diaminę (2,53 mmol, 0,86 g). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [9-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)nonylo]akrydino-9-karboksamid (wydajność 64% względem teoretycznej) w postaci oleju. Uzyskany związek przeprowadza się w sól – chlorowodorek – znaną metodą (np. według US 5,155,226) otrzymując związek 8b (0,035 g, wydajność 91% względem teoretycznej), w postaci oleju.

Przykład 9 Badanie czynności inhibicyjnej związków według wynalazku.

Aktywność inhibicyjną otrzymanych związków w stosunku do acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE) określono metodą spektrometryczną Ellmana. Badania inhibicji dla wszystkich związków według wynalazku zostały przeprowadzone w trzech seriach pomiarów. Następnie wyznaczono dla nich wartości IC_{50} , czyli takie stężenie substancji będącej potencjalnym inhibitorem, przy którym inhibicja osiąga wartość 50%. Wyniki zostały przedstawione w poniższej tabelicy 1. Uzyskane wartości IC_{50} inhibicji przedstawiono w porównaniu z referencyjnym inhibitorem, którym jest takryna: 9-amino-(1,2,3,4-tetrahydroakrydina).

Tabela 1

Związek według wynalazku	AChE IC_{50} [uM]	BuChE IC_{50} [uM]	Selektywność AChE/BuChE	Selektywność BuChE/AChE
1b	12,313 ± 2,718	0,179 ± 0,007	68,675	0,015
2b	0,408 ± 0,093	0,335 ± 0,048	1,221	0,819
3b	0,420 ± 0,099	1,033 ± 0,217	0,406	2,462
4b	0,082 ± 0,014	0,018 ± 0,002	4,444	0,225
5b	7,404 ± 0,567	25,691 ± 8,209	0,288	3,470
6b	0,920 ± 0,039	0,968 ± 0,163	0,950	1,053
7b	15,487 ± 1,972	0,886 ± 0,119	17,474	0,057
8b	0,378 ± 0,088	2,425 ± 0,252	0,156	6,408
Związek referencyjny				
Takryna	2,488 ± 0,088	0,199 ± 0,088	12,525	0,080

Wszystkie związki według wynalazku wykazują właściwości inhibicyjne w stosunku do AChE oraz BuChE. Najskuteczniejszym inhibitorem AChE spośród związków według wynalazku jest związek 4b – chlorowodorek [5-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)pentyl]akrydyno-9-karboksamid.

Kinetyka inhibitowania AChE przez związek 4b jest zilustrowana wykresem na fig. 1 (inhibicja mieszana: $K_m = 75,756 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 16,939 \text{ A/min}$).

P r z y k ł a d 10 Badanie czynności przeciwegregacyjnej β -amyloidu.

Badanie przeprowadzono dla związku według wynalazku, który okazał się najskuteczniejszym inhibitorem AChE, tj. dla związku 4b: chlorowodoru [5-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)pentyl]akrydyno-9-karboksamid.

Wśród wielu czynników, w patogenezie choroby Alzheimera wyróżnia się agregację peptydu AB. Do analizy wykorzystano tioflawinę T (thioflavine T, ThT). Wyniki, które przedstawiono na wykresie, pokazują właściwości antyagregacyjne badanego związku według wynalazku, w różnych stężeniach (10–100 μM). Wraz ze wzrostem użytego stężenia inhibitora rośnie procent hamowania agregacji β -amyloidu. Wyniki przedstawiono na wykresie zilustrowanym na fig. 2.

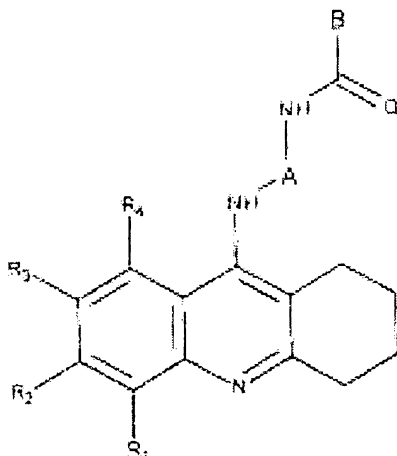
P r z y k ł a d 11 Badanie cytotoksyczności

Do wykonania badania użyto linii komórek ATCC CCL-185 (nowotworowe komórki nabłonkowe płuc). Komórki hodowano na płytce 96-dołkowej przez 24 godziny, a następnie inkubowano ze związkami według wynalazku przez kolejne 24 godziny. Wykonano również próby kontrolne, do których nie dodawano związków według wynalazku. Po inkubacji dodano roztwór MTT (test z użyciem bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego) i inkubowano przez kolejne 4 godziny w 37°C. Następnie zmierzono absorbancję przy długości fali 540 nm.

Wyniki badania cytotoksyczności: wyniki sugerują, że badane związki nie wykazują znaczącego działania cytotoksycznego w zakresie stężeń: 0,1–5 μM . Efekt toksyczny zaczyna się ujawniać po zastosowaniu stężenia 10 μM i mieści się w granicach: 75%–94% dla przeżywalności komórek. Przeżywalność drastycznie spada przy stężeniu 100 μM i wynosi odpowiednio dla związków według wynalazku w postaci soli chlorowodorkowych: dla związku 1b – 14%, 3b – 41%, 4b – 43%, 5b – 22%, 6b – 23%, 7b – 29%, 8b – 9%. W przeciwieństwie do pozostałych, związek 2b nie wykazuje istotnego działania cytotoksycznego w zakresie stosowanych stężeń. Stężenia związków według wynalazku, przy których aktywność enzymów (AChE oraz BuChE) zostaje zahamowana w 50% (wartości IC_{50}) są znacznie mniejsze.

Zastrzeżenia patentowe

1. N-podstawiony związek takryny o wzorze I,



wzór I

w którym

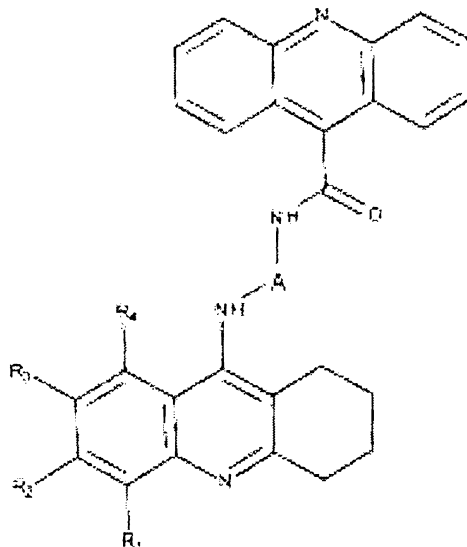
R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależnie wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę aminową, grupę metylową, grupę metoksyową, grupę hydroksyową, grupę trifluorometylową,

A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,

B oznacza akrydynę, przy czym linia poprowadzona pomiędzy atomem węgla ugrupowania karboksamidowego a podstawnikiem B oznacza wiązanie pojedyncze łączące niewęzłowy atom węgla akrydyny z atomem węgla grupy karbonylowej,

albo jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalna sól.

2. N-podstawiony związek takryny według zastrz. 1, **znamienny tym**, że odpowiada wzorowi VI,



wzór VI

w którym

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależnie wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę aminową, grupę metylową, grupę metoksyową, grupę hydroksyową, grupę trifluorometylową,

A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,

albo jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalna sól.

3. N-podstawiony związek takryny według zastrz. 2, **znamienny tym**, że R_1 , R_2 , R_3 , R_4 są niezależnie wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę metylową, grupę metoksyową, grupę trifluorometylową,

A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dziesięciu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,

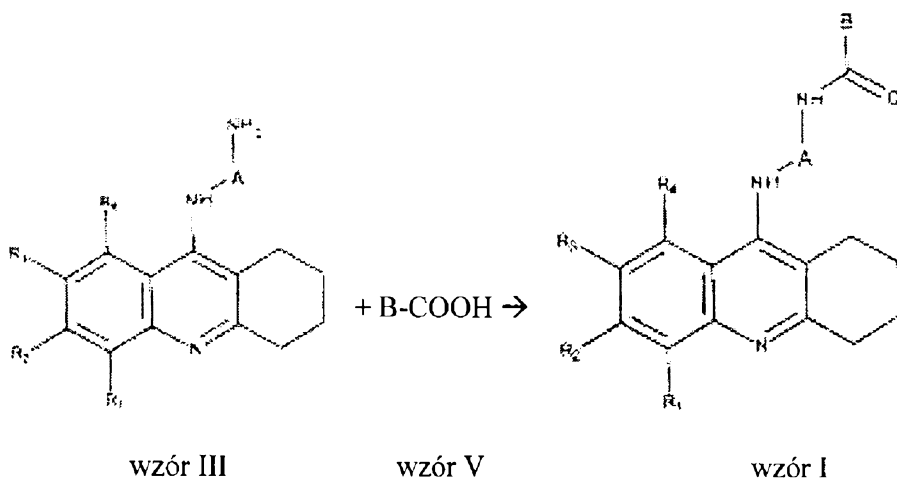
albo jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalna sól.

4. N-podstawiony związek takryny według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stanowi związek:

2-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)etylo]akrydino-9-karboksamid,
 [3-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)propylo]akrydino-9-karboksamid,
 [4-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)butylo]akrydino-9-karboksamid,
 [5-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)pentylo]akrydino-9-karboksamid,
 [6-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)hexylo]akrydino-9-karboksamid,
 [7-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)heptylo]akrydino-9-karboksamid,
 [8-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)oktylo]akrydino-9-karboksamid,

[9-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-yloamino)nonylo]akrydino-9-karboksamid.
albo jego hydrat, solwat lub sól chlorowodorkową.

5. Sposób wytwarzania N-podstawionych związków takryny określonych w zastrz. 1–4, **znamienny tym**, że N'-(9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydino)-diaminoalkan o wzorze III, w którym A oznacza alkilen, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,



poddaje się reakcji z kwasem akrydynokarboksylowym o wzorze V, jego hydratem lub solwatem, w obecności N-metylmorfoliny i chlorodimetoksytriazyny, w temperaturze -5°C do 0°C , w środowisku co najmniej jednego organicznego rozpuszczalnika aprotowego, a wyizolowany produkt ewentualnie przekształca się w sól.

6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że jako organiczny rozpuszczalnik aprotowy stosuje się eterowy rozpuszczalnik aprotowy.
7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że stosuje się eterowy rozpuszczalnik aprotowy wybrany z grupy obejmującej tetrahydrofuran (THF), dimetoksyetan, dioksan.
8. Związek określony w zastrz. 1–4, do stosowania w terapii do leczenia choroby nowotworowej ze współistniejącą chorobą Alzheimera.

Rysunki

Kinetyka AChE

Chlorowodorek [5-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyno-9-yloamino)pentyl]akrydyno-9-karboksamidu

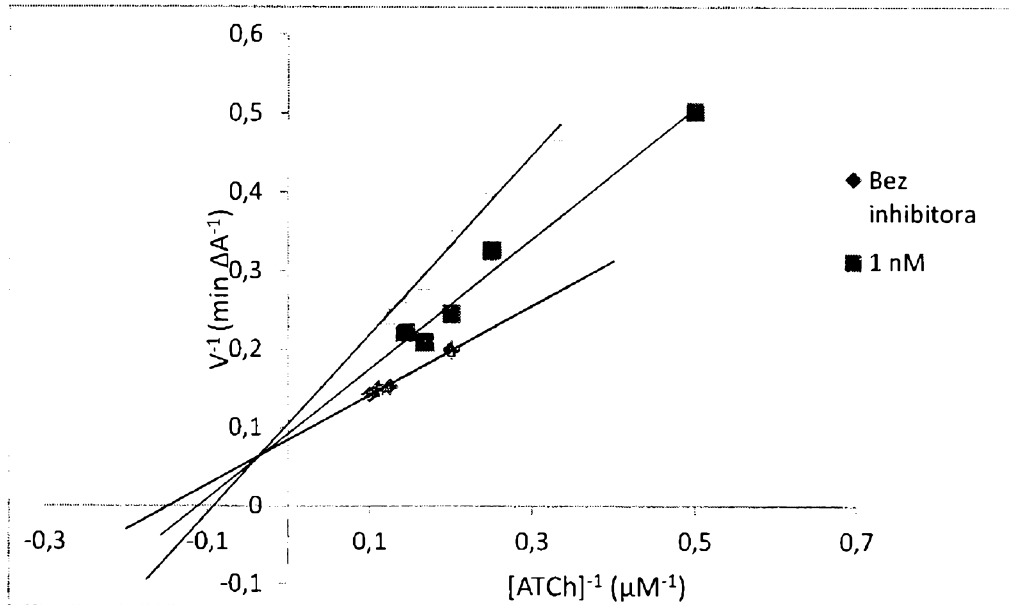


Fig. 1

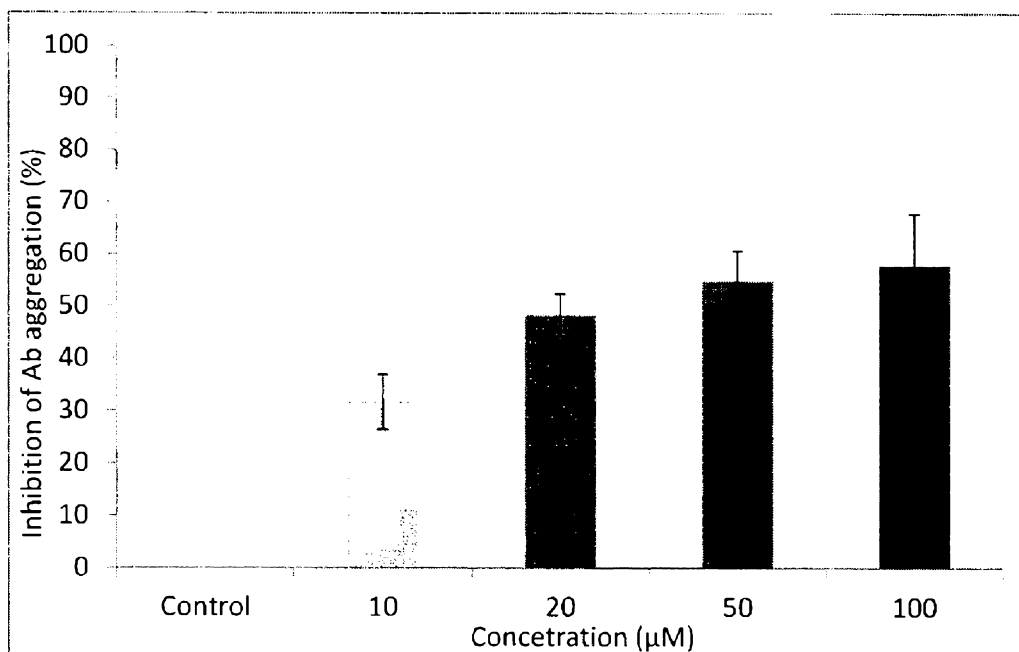


Fig. 2