



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

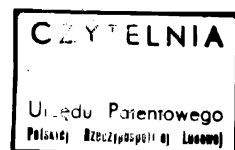
Int. Cl.³ C07D 219/10

Zgłoszono: 28.12.78 (P. 212478)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 01.07.80

Opis patentowy opublikowano: 30.11.1983



Twórcy wynalazku: Barbara Wysocka-Skrzela, Andrzej Ledóchowski, Grażyna Weltrowska,
Czesław Radzikowski
Uprawniony z patentu: Politechnika Gdańska,
Gdańsk (Polska)

Sposób otrzymywania aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli o wzorze ogólnym 1, w którym R oznacza atom wodoru; niepodstawiony alkil o długości łańcucha od C₁-C₄ lub podstawiony grupami: fenyłową, hydroksylową, aminową, tioeterową, karboksylową lub pochodnymi grupy karboksylowej, jak estry, amidy, sole; heterocykl z jednym lub dwoma atomami azotu, a R¹ oznacza atom wodoru, alkil o długości łańcucha od C₁-C₄, atom sodu lub potasu, grupę N-metylomorfolinową, trójetyloaminową, zaś n jest równe 0 lub 1.

Dotychczas znane są z opisu patentowego Wielkiej Brytanii nr 1093847 1-nitro-9-dwualkiloaminoalkiloaminokrydyny o wzorze ogólnym 2, w którym R¹ jest równy R² i oznacza grupę metylową lub etylową, zaś n = 2, 3. Związki te charakteryzują się identycznymi podstawnikami przy N. Sposób otrzymywania tych związków polega na kondensacji 1-nitro-9-chloroakrydyny o temperaturze topnienia 150-151°C z dwualkiloaminoalkanoaminą w środowisku rozpuszczalnika organicznego, np. fenolu lub krezolu, w temperaturze 20-100°C, a następnie wydzielaniu uzyskanego produktu ze środowiska reakcji znanymi sposobami, np. przez ekstrakcję.

Znane są 1-nitro-9-alkiloaminoalkiloaminoakrydyny o wzorze ogólnym 3, w którym R oznacza metyl, etyl, propyl, izopropyl, butyl, izobutyl, izopentyl, benzyl lub cykloheksyl, zaś n jest równe 2 lub 3.

Sposób otrzymywania tych związków polega na kondensacji chlorku (1-nitroakrydylo-9)-pirydyniowego lub 1-nitro-9-chloroakrydyny lub 1-nitro-9-fenoksyakrydyny z alkiloaminoalkiloaminą, w temperaturze 50-120°C, w środowisku fenolu. Następnie mieszaninę poreakcyjną wylewa się do niepolarnego rozpuszczalnika organicznego, nie mieszającego się z wodą, zaś wytrącony osad monochlorowodoru 1-nitro-9-alkiloaminoalkiloaminoakrydyny wydziela się ze środowiska reakcji znanymi sposobami, np. przez krystalizację.

Znane są 1-nitro-9-dwualkiloaminoizalkiloaminoakrydyny o wzorze ogólnym 4, w którym R oznacza niższy alkil jak metyl, etyl, R¹ oznacza atom wodoru lub metyl, R² oznacza to samo co R¹, przy czym R¹ nie jest równe R², zaś n = 0 lub 2. Sposób otrzymywania tych związków polega na kondensacji chlorku (1-nitroakrydylo-9)-pirydyniowego lub 1-nitro-9-fenoksyakrydyny z dwualkiloaminoizalkiloaminą w środowisku fenolu, w temperaturze 50°C-120°C.

Mieszaninę poreakcyjną wylewa się do niepolarnego rozpuszczalnika organicznego, nie mieszającego się z wodą, a wytrącony osad 1-nitro-9-dwualkiloaminoizoalkiloaminoakrydyny wydziela się ze środowiska reakcji znanymi sposobami, np. przez krystalizację.

Niedogodnością opisanych związków jest ich wysoka toksyczność, nietrwałość, szczególnie w środowisku wodnym, kwaśne oddziaływanie ich wodnych roztworów ($\text{pH} \sim 4$), co powoduje ujemne działanie uboczne preparatów, jak efekt drażniący w miejscu wprowadzenia oraz nudności i wymioty.

Sposób otrzymywania aminokwasów pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli, o wzorze ogólnym I, w którym R oznacza atom wodoru; niepodstawiony alkil o długości łańcucha od $\text{C}_2\text{--C}_4$ lub — podstawiony grupami: fenyłową, hydroksylową, aminową, tioeterową, karboksylową lub pochodnymi grupy karboksylowej, jak estry, amidy, sole; heterocykl z jednym lub dwoma atomami azotu, a R_1 oznacza atom wodoru, alkil o długości łańcucha od $\text{C}_1\text{--C}_4$, atom sodu lub potasu, grupę N-metylomorfolinową, trójetyloaminową, zaś n jest równe 0 lub 1, według wynalazku, polega na tym, że 1-nitro-9-fenoksyakrydynę rozpuszcza się w fenolu, dodaje aminokwasu lub pochodnej aminokwasu i całość ogrzewa do temperatury 10–100°C a następnie, po oziębieniu do temperatury pokojowej, mieszaninę poreakcyjną wylewa się do nadmiaru suchego niepolarnego rozpuszczalnika organicznego, ewentualnie zakwaszonego chlorowodorkiem, zaś wytrącony osad monochlorowodorku aminokwasowej pochodnej 1-nitroakrydyny sączy się i krystalizuje z bezwodnego polarnego rozpuszczalnika organicznego lub ich mieszaniny.

Drugi sposób otrzymywania aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli, o wzorze ogólnym I w którym R, R' i n mają podane wyżej znaczenie, według wynalazku polega na tym, że chlorek (1-nitroakrydylo-9)-pirydyniowy miesza się z fenolem, ogrzewa do temperatury od 60 do 80°C, ochładza i dodaje aminokwasu, lub pochodnej aminokwasu, całość, po wymieszaniu ponownie ogrzewa do temperatury 60–100°C, a następnie mieszaninę poreakcyjną oziębia i wylewa do nadmiaru suchego niepolarnego rozpuszczalnika organicznego, zaś wytrącony osad monochlorowodorku aminokwasowej pochodnej 1-nitroakrydyny sączy się i krystalizuje z bezwodnego polarnego rozpuszczalnika organicznego lub ich mieszaniny.

Przedmiotowe związki różnią się od znanych pochodnych akrydyny, wykazanych wyżej, podstawnikiem w pozycji 9. Zawierają one zamiast łańcucha dwuaminowego w tej pozycji, odpowiedni aminokwas lub pochodną aminokwasu.

Właściwości przeciwnowotworowe przedmiotowej grupy aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli badano wielokrotnie niżej opisanymi testami *in vitro* oraz *in vivo* i uzyskano wysoką aktywność przeciwnowotworową przy niskiej toksyczności.

I. Metody *in vitro*. Hamowanie kiełkowania nasion rzeżuchy (test wzrostowy).

Na płytce Petriego o średnicy 80 mm, umieszcza się możliwie równomiernie 20–25 nasion rzeżuchy na dwóch warstwach bibuły. Następnie, na płytce nalewa się 30 ml roztworu badanego związku, o stężeniu 1 mg/ml, a na płytkę kontrolną — wodę destylowaną. Płytki inkubuje się w ciągu doby w temperaturze 20–30°C, po czym mierzy się długość kiełków. Efekt hamowania wyraża się w procentach zmniejszenia średniej długości kiełków badanych, w stosunku do kontrolnych. Procent hamowania kiełkowania nasion rzeżuchy dla przedmiotowej grupy związków wynosił odpowiednio od 58–84%.

II. Metody *in vivo*. Hamowanie wzrostu mysiego mięsaka Croekera (Sa-180).

Do doświadczeń stosowano myszy w wieku około 3 miesięcy i wadze około 25 g. Szczepiono je skrawkiem nowotworu (Sa-180) i dzielono na grupy: jedną kontrolną — 10 sztuk i dwie do czterech grup „leczonych“, po 7 sztuk każda. Badane związki w odpowiednich dawkach podawano dootrzewnowo, po uprzednim oznaczeniu maksymalnej dawki tolerowanej (MTD).

Jako kryterium oceny działania przeciwnowotworowego badanych związków przyjmuje się procentową różnicą między średnimi ciężarami guzów myszy kontrolnych i otrzymujących preparaty, uwzględniając przy tym efekty toksyczne badanego preparatu. Ocena toksyczności obejmuje: ubytek wagi zwierząt leczonych w porównaniu z kontrolną, liczbą zwierząt padłych, w porównaniu z kontrolą oraz mikroskopowe badania histopatologiczne.

Za aktywne przyjmuje się te związki, które co najmniej dwukrotnie hamowały wzrost guzów nowotworowych powyżej 40%, nie wywołując przy tym: padania zwierząt (> 2 sztuki) ani średnich strat ciężaru (> 4 g).

Badania *in vivo* poszczególnych związków przedmiotowych przeprowadzano wielokrotnie. I np. dla preparatu o symbolu kodowym C-878, tj. chlorowodoru N(1-nitroakrydylo-9)-DL-fenylalaniny stwierdzono hamowanie wzrostu mięsaka Crockera (Sa-180), w zależności od dawki, następujące: przy dawkach 50–100 mg/kg — % hamowania wynosił odpowiednio 50–64. Podobne wyniki uzyskano dla innych związków z tej grupy, jak pochodnych: metioniny, β -alaniny, tryptofanu i innych — procent hamowania wynosił odpowiednio od 52–88.

Zaletą sposobu, według wynalazku, jest możliwość uzyskania nowych związków, charakteryzujących się wysoką aktywnością przeciwnowotworową, przy niskiej toksyczności, w odróżnieniu od innych wykazanych w stanie techniki pochodnych akrydyny, potwierdzoną przez przeprowadzone testy *in vitro* i *in vivo*.

Sposób otrzymywania aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli ilustrują podane niżej przykłady.

Przykład I. 1,6 g 1-nitro-9-fenoksakrydyny rozpuszczono w 10 g świeżo przedestylowanego fenolu i dodano 0,7 g histydyny. Mieszaninę ogrzewano w ciągu 0,5 godziny w 80°C. Po oziębieniu do temperatury pokojowej, mieszaninę poreakcyjną wylano do nadmiaru suchego eteru, zakwaszonego chlorowodorem. Wydzielony osad chlorowodoru N(1-nitroakrydylo-9)-DL-histydyny przemyto kilkakrotnie suchym eterem i krystalizowania z absolutnego propanolu. Temperatura topnienia 174°C, Rf 0,35 na żelu krzemionkowym w układzie butanol : kwas octowy : woda (4:1:2). W podobny sposób kondensowane inne aminokwasy z pochodnymi 1-nitroakrydyny.

Przykład II. 1,6 g 1-nitro-9-fenoksyakrydyny rozpuszcza się w 10 ml fenolu, dodaje się 1,3 g chlorowodoru estru etylowego-DL-tryptofanu i ogrzewa się w ciągu 20 minut w 50°C. Po zakończeniu ogrzewania mieszaninę poreakcyjną rozcieńcza się eterem i wylewa do nadmiaru suchego eteru. Wytrącony osad, po odsączeniu i kilkakrotnym przemyciu eterem, krystalizuje się z bezbarwnego etanolu.

Otrzymuje się 2,25 g chlorowodoru N(1-nitroakrydylo-9)-estru etylowego DL-tryptofanu o temperaturze topnienia 190°C z rozkładem. Wydajność 92%.

Analiza chromatograficzna na bezwodnym tlenku glinu w układzie: benzen : octan etylu : amoniak (15:59:1), $R_f = 0,7$. Analiza elementarna dla wzoru $C_{26}H_{23}N_4O_4Cl$

obliczono: 63,6% C, 4,7% H, 11,4% N;

znaleziono: 63,2% C, 4,7% H, 11,3% N.

Przykład III. 1,6 g 1-nitro-9-fenoksyakrydyny rozpuszcza się w 10 g świeżo destylowanego fenolu, dodaje się 1,2 g chlorowodoru estru etylowego-DL-etioniny i całość ogrzewa się w ciągu 30 minut w temperaturze 50°C. Następnie, po uprzednim oziębieniu, mieszaninę poreakcyjną rozcieńcza się suchym eterem a następnie wylewa się powoli do nadmiaru suchego eteru. Wytrącony żółty osad odsącza się i krystalizuje się z suchego metanolu. Otrzymuje się w ten sposób chlorowodorek N(1-nitroakrydylo-9)DL-estru etylowego etioniny o temperaturze topnienia 189°C z rozkładem. Analiza chromatograficzna (TLC) na żelu krzemionkowym w układzie butanol : kwas octowy : woda (4:1:1) — $R_f = 0$.

Analiza elementarna dla wzoru: $C_{21}H_{26}N_3O_4SCl \times H_2O$

obliczono: 54,01% C, 5,61% H, 9,00% N

znaleziono: 54,2% C, 5,3% H, 8,98% N.

Przykład IV. 1,7 g chlorku (1-nitroakrydylo-9)pirydyniowego i 10 g fenolu ogrzewa się w ciągu 10 minut w temperaturze 80°C. Następnie, całość oziębia się, dodaje 0,5 g DL-seryny i ponownie ogrzewa 1,5 godziny w 60°C. Mieszaninę poreakcyjną oziębia się i wylewa do oziębionego, suchego eteru. Wytrącony osad sący się, przemyci kilkakrotnie suchym eterem i krystalizuje z mieszaniny suchego metanolu i eteru. Otrzymuje się w ten sposób 1,5 g chlorowodoru N(1-nitroakrydylo-9)-DL-seryny o temperaturze topnienia 230°C z rozkładem.

Analiza chromatograficzna (TLC) na żelu krzemionkowym w układzie butanol : kwas octowy : woda (4:1:1) — $R_f =$

Analiza elementarna dla wzoru: $C_{16}H_{14}N_3O_5Cl$

obliczono: 52,79% C, 3,89% H, 11,55% N

znaleziono: 52,9% C, 4,0% H, 11,7% N.

Przykład V. 3,4g chlorku (1-nitroakrydylo-9)pirydyniowego i 15 g fenolu ogrzewa się w ciągu 15 minut w temperaturze 80°C. Po oziębieniu, dodaje się 2,2g estru etylowego-DL-fenylalaniny i całość miesza się w ciągu 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, wylewa się mieszaninę poreakcyjną do nadmiaru eteru, a wytrącony osad krystalizuje z bezwodnego metanolu. Otrzymuje się w ten sposób chlorowoderek N(1-nitroakrydylo-9)-DL-estru etylowego fenylalaniny o temperaturze topnienia 195°C. Analiza chromatograficzna na bezwodnym tlenku glinu w układzie: benzen : octan etylu : amoniak (15:59:1) — $R_f = 0,25$.

Analiza elementarna dla wzoru: $C_{24}H_{22}N_3O_4Cl$

obliczono: 63,7% C, 4,9% H, 9,3% N

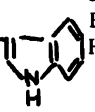
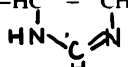
znaleziono: 63,4% C, 4,8% H, 9,4% N.

Dalsze przykłady ujęte są w poniższej tabeli, w której R_f oznaczono w układzie — butanol : kwas octowy : woda = 4:1:1, na płytach z żelazem krzemionkowym.

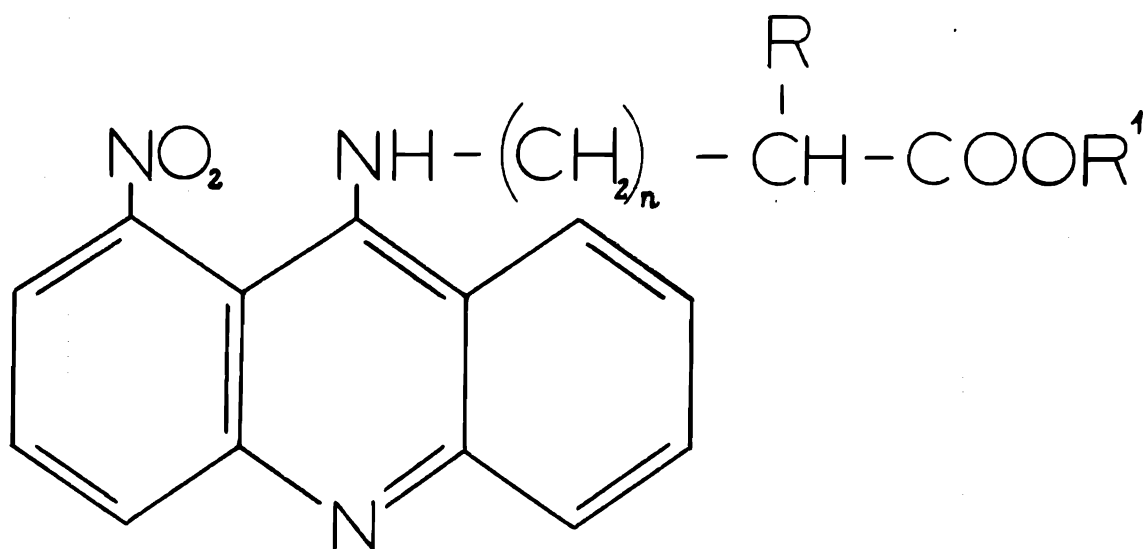
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli, o wzorze ogólnym I, w którym R oznacza atom wodoru; niepodstawiony alkil o długości łańcucha od C_1 – C_4 lub — podstawiany grupami: fenyłową, hydroksylową, aminową, tioeterową, karboksylową lub pochodnymi grupy karboksylowej jak estry, amidy, sole; heterocykl z jednym lub dwoma atomami azotu, a R' oznacza atom wodoru, alkil o długości łańcucha od C_1 – C_4 , atom sodu lub potasu, grupę N-metylomorfolinową, trójetyloaminową, zaś n jest równe 0 lub 1, w reakcji kondensacji, **znamienny tym**, że 1-nitro-9-fenoksyakrydynę rozpuszcza się w fenolu, dodaje aminokwasu lub pochodnej aminokwasu i całość ogrzewa do temperatury 10–100°C, a następnie po oziębieniu do temperatury pokojowej mieszaninę poreakcyjną wylewa się do nadmiaru suchego niepolarnego rozpuszczalnika organicznego, ewentualnie zakwaszonego chlorowodorem, zaś wytrącony osad monoachlorowodoru aminokwasowej pochodnej 1-nitroakrydyny sący się i krystalizuje z bezwodnego polarnego rozpuszczalnika organicznego lub ich mieszaniny.

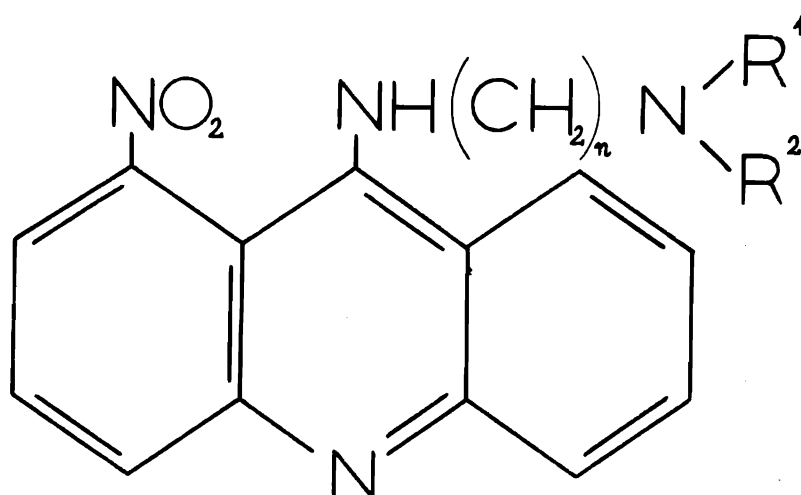
2. Sposób otrzymywania aminokwasowych pochodnych 1-nitroakrydyny lub ich soli, o wzorze ogólnym I, w którym R oznacza atom wodoru; niepodstawiony alkil o długości łańcucha od

Nr przykładu	R	R_1	n	Wzór cząsteczkowy	Czas reakcji min	Temp. reakcji °C	Temp. topnienia °C	R_f	Wy-daj-ność	Analiza						Me to da
										obli-czone	otrzy-mane	obli-czone	otrzy-mane	obli-czone	otrzy-mane	
										%C	%H	%N				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
V	CH ₃	C ₂ H ₅	0	C ₁₈ H ₁₈ N ₃ O ₄ Cl	15	30	230	0,7	93	57,5	57,9	4,8	4,6	11,2	11,3	A
VI	CH ₂ C ₆ H ₅	H	0	C ₂₂ H ₁₈ N ₃ O ₄ Cl	60	80	178	0,4	88	62,3	62,5	4,3	4,3	9,9	9,8	B
VII	CH ₂ CH ₂ S-CH ₃	C ₂ H ₅	0	C ₂₀ H ₂₂ N ₃ O ₄ SCl	20	80	188	0,6	90	55,0	55,1	5,1	5,0	9,6	9,7	A
VIII	CH ₂ C ₆ H ₄ OH	C ₂ H ₅	0	C ₂₄ H ₂₆ N ₃ O ₇ Cl	30	60	186	0,7	94	57,1	57,2	5,2	5,1	8,3	8,4	A
IX	CH ₂ CH ₂ S-CH ₃	H	0	C ₁₈ H ₁₈ N ₃ O ₄ SCl	30	100	185	0,55	78	52,3	52,1	4,5	4,4	10,3	10,1	B
X	H	H	1	C ₁₆ H ₁₄ N ₃ Cl H ₂ O	45	80	145	0,3	82	52,6	52,9	4,4	4,4	11,4	11,3	A
XI	CH ₃	H	0	C ₁₆ H ₁₄ N ₃ O ₄ Cl	20	20	240	0,35	80	55,2	55,3	4,2	4,1	12,13	12,0	A
XII	CH ₂ 	H	0	C ₂₄ H ₁₉ N ₄ O ₄ Cl	60	100	180	0,45	73	60,5	60,7	4,4	4,7	11,6	11,6	B
XIII	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₃	0	C ₂₀ H ₂₂ O ₄ N ₃ Cl	15	40	204	0,8	75	59,6	59,9	5,5	5,6	10,4	10,1	A
XIV	CH ₂ CONH ₂	H	0	C ₁₇ H ₁₃ N ₄ O ₅ Cl	60	80	180	0,3	68	57,7	57,5	4,8	4,9	15,8	15,6	B
XV	CH ₂ -HC=CH 	H	0	C ₁₉ H ₁₆ N ₃ O ₄ Cl	45	60	174	0,35	58	55,1	55,3	3,9	4,0	16,9	16,7	B
XVI	H	CH ₃	0	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₄ Cl	20	10	94	0,45	64	55,7	55,7	3,8	3,9	12,1	12,2	A
XVII	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	H	0	C ₁₈ H ₁₇ N ₄ O ₅ Cl	60	80	135	0,2	52	53,2	53,0	4,2	4,1	13,8	13,9	B
XVIII	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H	0	C ₁₉ H ₂₀ N ₃ O ₄ Cl	40	80	235	0,1	59	58,7	58,9	5,2	5,1	10,8	11,0	B

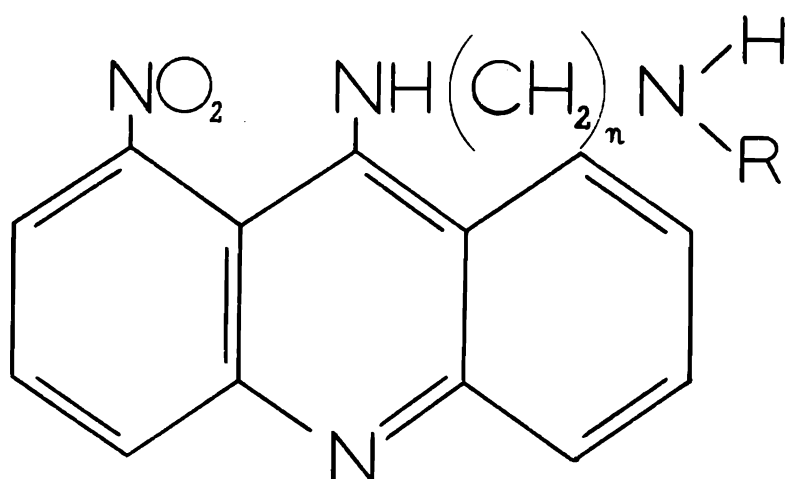
C₁-C₄ lub — podstawiony grupami: fenylową, hydroksylową, aminową, tioeterową, karboksylową lub pochodnymi grupy karboksylowej jak estry, amidy, sole; heterocykl z jednym lub dwoma atomami azotu, a R¹ oznacza atom wodoru, alkil o długości łańcucha od C₁-C₄, atom sodu lub potasu, grupę N-metylomorfolinową, trójetyloaminową, zaś n jest równe 0 lub 2, w reakcji kondensacji, **znamienny tym**, że chlorek (1-nitroakrydylo-9)-pirydyniowy miesza się z fenolem, ogrzewa do temperatury 60-80°C, ochładza i dodaje aminokwasu lub pochodnej aminokwasu, całość po wymieszanu ponownie ogrzewa do temperatury 60-100°C, a następnie mieszaninę poreakcyjną oziębia i wylewa do nadmiaru suchego niepolarnego rozpuszczalnika organicznego, zaś wytrącony osad monochlorowodoru aminokwasowej pochodnej 1-nitroakrydyny sączy się i krystalizuje z bezwodnego polarnego rozpuszczalnika organicznego lub ich mieszaniny.



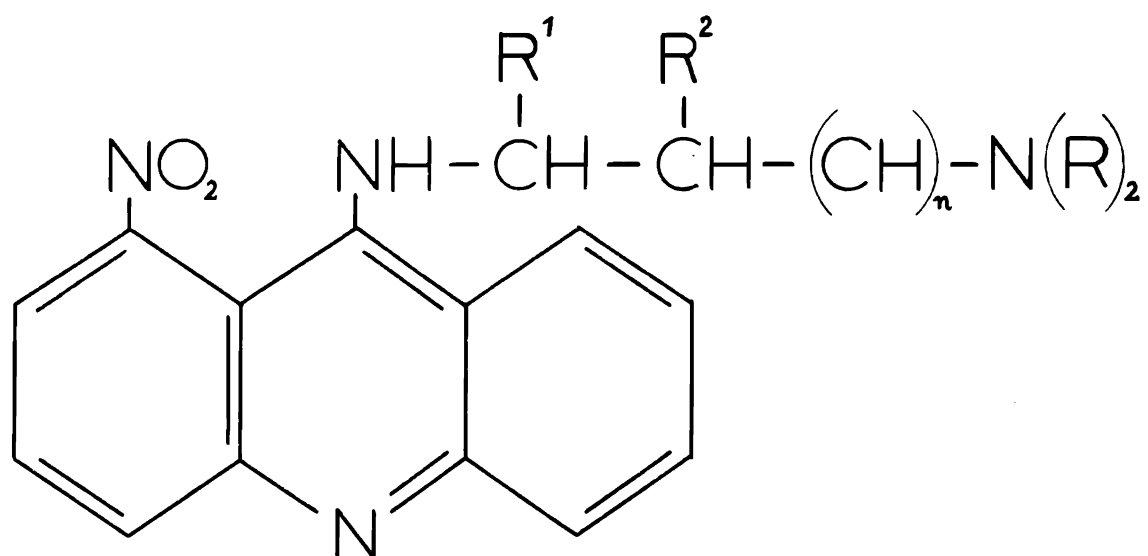
wzór 1



wzór 2



wzór 3



wzór 4