

(11) Patent numeris: **4302**

(51) Int. Cl.⁶: **C07C 229/34**
A61K 31/195

(21) Paraiškos numeris: **97-098**

(22) Paraiškos padavimo data: **1997 05 29**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 12 29**

(45) Patent paskelbimo data: **1998 03 25**

(72) Išradėjas:

Juozapas Straukas, LT
Vitalija Šimkevičienė, LT
Rimas Jankauskas, LT

(73) Patent savininkas:

Biochemijos institutas, Mokslininkų g. 12, 2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

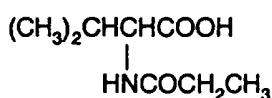
N-propionil-4-hidroksi-3-nitro-L-fenilalanino ir N-propionil-4-metoksi-3-nitro-DL-fenilalanino kalio druskos, pasižyminčios antinavikiniu aktyvumu

(57) Referatas:

Šis išradimas pateikia biologiškai aktyvius junginius, tokius kaip vandenyje tirpios N-propionil-4-hidroksi-3-nitro-L-fenilalanino ir N-propionil-4-metoksi-3-nitro-DL-fenilalanino kalio druskos. Sintezuoti aminorūgščių dariniai, būdami mažai toksiški, eksperimente su pelėmis pasižymi aukštu kancerolitinio aktyvumu. Jie slopina sarkomos 180 augimą 94,5 % ir 89 % atitinkamai, ir prailgina išgyvenimo laiką iki 50 % .

Išradimas yra iš nebaltyminių aminorūgščių chemijos ir yra skirtas N-propionil-4-hidroksi-3-nitro-L-fenilalanino ir N-propionil-4-metoksi-3-nitro-DL-fenilalanino kalio druskoms su ištirtu antinavikiniu veikimu.

Žinoma, kad kai kurios N-acilintos baltyminės aminorūgštys, turinčios savo sudėtyje alkankarboninių rūgščių liekanas, pasižymi antinavikiniu aktyvumu. Iš tokio tipo junginių kancerolitinio aktyvumu pasižymi N-propionil-L-valinas, N-lauroil-L-leucinas ir N-miristoil-L-izoleucinas [USA Pats. 3845097, 1974 ir 3919291, 1975], iš kurių aktyviausias buvo N-propionil-L-valinas (**A-195**) [K. Fukushima, S. Toyoshima. Cancer Chemother. Rep. Part 1, Vol. 59, No. 2, pp. 309-318 (1975)]:



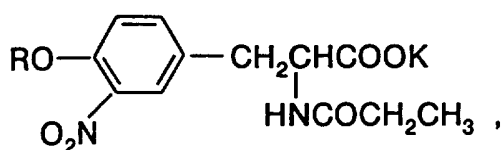
A-195

Junginys **A-195** buvo tiriamas klinikose [Л.Б. Горбачева и др. Химиотерапия злокачественных новообразований. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Онкология. 1982, т. 12, с. 201]. **A-195** kaip artimiausias struktūrinis analogas pasirinktas prototipu mūsų patentuojamiems junginiams.

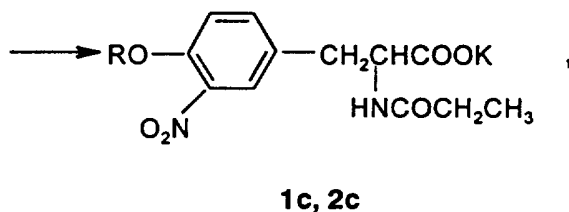
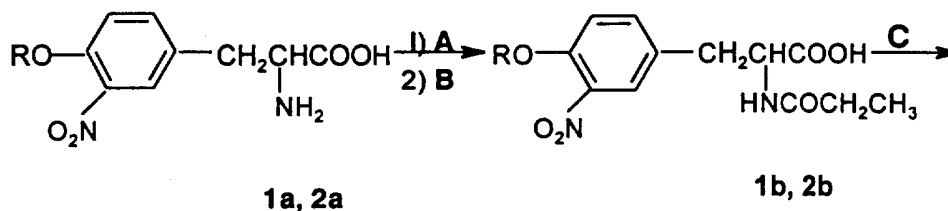
Šiuo metu klinikose tiriamas N-acetil-L-cisteinas, kuris eksperimente slopina kancerogenezę, t.y. pasižymi vėžio chemoprevencinėmis savybėmis [S. De Flora et al. In: C. Ioannides and D.F.V. Lewis (eds), Drugs, Diet and Disease, Vol. 1: Mechanistic Approaches to Cancer, Ellis Horwood, Hemel Hempstead, UK, 1995, pp. 151-203].

Tokiu būdu aukščiau nurodyti literatūriniai šaltiniai parodo, kad junginiai, gauti modifikuojant aminorūgštis alkankarboninėmis rūgštimis, sudaro prielaidas juos taikyti klinikoje vėžinių susirgimų gydymui.

Šio išradimo esmė – nauji, mažai toksiški, vandenyje tirpūs antinavikiniai junginiai, gauti įvedant į neproteinogeninių aromatinių aminorūgščių molekules propiono rūgšties liekaną bei modifikuojant gautą darinių karboksilinę grupę, sintezuojant kalio druskas (**1c** ir **2c**):

**1c, 2c**kur **1c** : L, R = H;**2c** : DL, R = CH₃

Junginių **1c** ir **2c** sintezė vykdyta pagal žemiau pateiktą schemą:

kur **1a-1c** : L, R = H;**2a-2c** : DL, R = CH₃.**A**: NaOH/H₂O, CH₃CH₂COCl/Et₂O;**B**: HCl/H₂O; **C**: KOH/EtOH.

Kondensuojant propionilo chloridą atitinkamai su 4-hidroksi-3-nitro-*L*-fenilalaninu **1a** (A būdas) bei 4-metoksi-3-nitro-*DL*-fenilalanino hidrochloridu **2a** (B būdas) [Ю. Дерг-тис, И. Страукас. Журн. общ. химии, т.32, No 4, с. 1255-1259 (1962)] vandeniniame natrio šarmų tirpale buvo sintezuoti N-propionil-4-hidroksi-3-nitro-*L*-fenilalaninas **1b** ir N-propionil-4-metoksi-3-nitro-*DL*-fenilalaninas **2b** (A + B stadijos). N-Propio-nilintus aminorūgščių darinius **1b** ir

2b, paveikus spiritiniu kalio šarmų tirpalu buvo gautos vandenyje tirpios N-propionil-4-hidroksi-3-nitro-*L*-fenilalanino ir N-propionil-4-metoksi-3-nitro-*DL*-fenilalanino kalio druskos **1c** ir **2c** (C stadija). Sintezuotų aminorūgščių darinių **1b**, **2b**, **1c** ir **2c** bruto formulės, lydymosi temperatūros, išeigos ir elementinė analizė pateikta 1 lentelėje. Šių junginių IR spektrai užrašyti prietaisu Specord 71 (Vokietija) tabletėse su KBr. IR spektrų duomenys pateikti 2 lentelėje. ¹H BMR spektrai užrašyti spektrometru Hitachi R-22 (Japonija) su darbinio 90 MHz dažniu, vidinis etalonas – heksametilidisiloksanas, temperatūra 35°C. ¹H BMR spektrų duomenys pateikti 3 lentelėje.

Sekantys pavyzdžiai iliustruoja šį išradimą.

1 Pavyzdys. N-Propionil-4-hidroksi-3-nitro-*L*-fenilalaninas **1b**

2,26 g (10 mM) 4-hidroksi-3-nitro-*L*-fenilalanino ištirpinama 16-je ml (32 mM) 2N natrio šarmų vandeniniame tirpale, pridedama 15-20 g ledo, 10 ml etilo eterio ir intensyviai maišant prilašinama 1ml (12 mM) propionilo chlorido. Po to dar maišoma 1,5 val. prie temperatūros ne aukštesnės 2 °C, sekant, kad reakcijos turinys visą laiką būtų silpnai šarminis. Eterinis sluoksnis atskiriamas, o vandeninis sluoksnis šaldant lediniu vandeniu parūgštinamas praskiesta druskos rūgštimi iki pH3. Išsiskyręs produktas perkristalinamas iš spirito ir etilacetato mišinio. Gauta medžiaga **1b** yra gelsvų kristalų pavidalo.

2 Pavyzdys. N-Propionil-4-metoksi-3-nitro-*DL*-fenilalaninas **2b**.

Analogiškomis sąlygomis kaip ir 1 pavyzdyje iš 2,77 g (10 mM) 4-metoksi-3-nitro-*DL*-fenilalanino hidrochlorido, 16 ml (32 mM) 2N vandeninio natrio šarmo ir 1ml (12 mM) propionilo chlorido sintezuotas junginys **2b**. Medžiaga **2b**, perkristalinta iš spirito ir vandens mišinio, yra baltų kristalų pavidalo.

3 Pavyzdys. N-Propionil-4-hidroksi-3-nitro-*L*-fenilalanino kalio druska **1c**.

2,82 g (10 mM) **1b** ištirpinama 20-je ml absoliutaus etanolio ir pridedama 5ml (10mM) 2N kalio šarmų spiritinio tirpalo. Po to į reakcijos tirpalą pridedama

75 ml eterio. Išsiskirusios nuosėdos perkristalinamos iš etanolio ir eterio mišinio. Gauta medžiaga **1c** yra raudonų kristalų pavidalo, tirpstanti vandenyje, karštame spirite. $R_f = 0,62$ (Silufol UV254, eliuentas: n-butanolis prisotintas vandeniu).

4 Pavyzdys. N-Propionil-4-metoksi-3-nitro-DL-fenilalanino kalio druska 2c.

Analogiškomis sąlygomis kaip ir **3** pavyzdyje iš 2,96 g (10 mM) **2b** ir 5 ml (10 mM) 2N spiritinio kalio šarmo gautas junginys **2c**. Medžiaga **2c**, perkristalinta iš spirito ir eterio mišinio, yra baltų kristalų pavidalo, tirpstanti vandenyje, karštame etanolyje. $R_f = 0,44$ (Silufol UV254, eliuentas: n-butanolis prisotintas vandeniu).

5 Pavyzdys. Junginių 1c ir 2c biologinis įvertinimas.

Junginių **1c** ir **2c** ūmus toksiškumas buvo nustatytas nelinijinėms bal-
toms pelėms, tiriamus preparatus įšvirkščiant į pilvaplėvės ertmę ir stebint ban-
domus gyvuliukus 30 parų.

Antinavikinis aktyvumas buvo tiriamas naudojant tris įskiepytų navikų modelius, būtent, sarkomą 180 (S-180), Erlichio ascitinę karcinomą (EAC) ir limfoleukozę L 1210 (L-1210). Navikai pelėms buvo įskiepyti įprastiniais būdais. Bandymai buvo atliekami su nelinijinėmis ir hibridinėmis BDF₁ pelėmis, sveriančiomis 18-22 g.

Palyginimui buvo panaudotas struktūrinis analogas N-propionil-L-valinas (**A-195**).

Tiriami junginiai buvo ištirpinti fiziologiniame tirpale, preparatus pelėms kasdien įšvirkščiant į pilvaplėvės ertmę 2-5 dienas. Junginių antinavikinis aktyvumas buvo įvertintas nustatant S-180 naviko ir EAC bei L-1210 ascitinio skysčio vystymosi slopinimą procentais, lyginant su kontrole. Gydymas buvo pradedamas praėjus parai po EAC bei L-1210 ir trims paroms po S-180 įskiepijimo. Naviko S-180 augimo slopinimo įvertinimui gyvuliukai buvo dekapituojami praėjus 5 paroms po preparato paskutinio įšvirkštimo. Ascitinio skysčio kiekis buvo nustatytas 10-ją parą po EAC ir 8-ą parą po L-1210 įskiepijimo.

Biologinio tyrimo duomenys buvo apdoroti Litchfield'o ir Wilcoxon'o variacinės statistikos metodu [J.T. Litchfield, F. Wilcoxon. J. Pharmacol. Exp. Therap., vol. 96, pp. 99-113 (1949)].

Ištirtų junginių biologinių tyrimų duomenys pateikti 4 lentelėje.

Kaip matyti iš 4 lentelės junginiai **1c** ir **2c** yra mažai toksiški – jų ūmus toksiškumas yra 2,5 karto mažesnis už **A-195** ūmų toksiškumą. Junginiai **1c** ir **2c** sarkomos 180 augimą slopina 94,5 % ir 89,1 % atitinkamai, tuo tarpu kai prototipas **A-195** šį navikų modelį slopina 74,9 %. **1c** ir **2c** stipriai arba pilnai slopina ascitinio skysčio vystymąsi. Be to, **2c** 4 lentelėje nurodyta doze 57,3 % prailgino pelių, įskiepytų EAC, išgyvenimą. Junginiai **1c** ir **2c** pelių, su įskiepytais navikais, kūno svorį pakeitė nežymiai – tikrai **1c** jį sumažino 13,1 % pelėms su EAC, o **2c** jį padidino 16,1 % pelėms su sarkoma 180.

Biologinių tyrimų rezultatų sugretinimas parodo, kad **1c** ir **2c** pagal eilę parametrų žymiai pralenkia struktūrinį analogą **A-195**.

Plačiai vartojamas vaistas ftorafuras sarkomos 180 naviko augimą slopina 66 % [Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР) и А. Голдина, А. Кляйна (США). М. Медицина, 1980, с. 250], o jo LD₅₀ = 640 mg/kg (pelių patelėms) ir LD₅₀ = 750 mg/kg (pelių patinėliams), įšvirkščiant preparatą į pilvo ertmę [И.М. Кравченко и др. В кн.: Экспериментальная и клиническая фармакопедия. Рига, Зинатне, 1977, вып. 7, с. 100-115].

Tokiu būdu, vandenyje tirpios N-propionil-4-hidroksi-3-nitro-L-fenilalanino ir N-propionil-4-metoksi-3-nitro-DL-fenilalanino kalio druskos (**1c** ir **2c**) būdamos mažai toksiškos ir pasižyminčios žymiu antinavikiniu aktyvumu gali būti perspektyviais junginiais eksperimentinėje biologijoje ir medicinoje.

1 Lentelė. Junginių 1b, 2b, 1c ir 2c bruto formulė, lydymosi temperatūra, išeiga ir elementinė analizė.

Jung.	Bruto formulė	Lyd.t. (°C)	Išeiga (%)	C	H	N	K
1b^{x)}	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₆	159-161	78	<u>51,24^{a)}</u> <u>51,07^{b)}</u>	<u>5,20</u> <u>5,00</u>	<u>9,94</u> <u>9,93</u>	
2b	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆	151-152	92	<u>52,89</u> <u>52,70</u>	<u>5,33</u> <u>5,44</u>	<u>9,35</u> <u>9,45</u>	
1c^{x)}	C ₁₂ H ₁₃ KN ₂ O ₆	258-263 (sk.)	90	<u>44,70</u> <u>44,99</u>	<u>3,98</u> <u>4,09</u>	<u>8,58</u> <u>8,74</u>	<u>12,91</u> <u>12,21</u>
2c	C ₁₃ H ₁₅ KN ₂ O ₆	138-142	84	<u>46,82</u> <u>46,70</u>	<u>4,50</u> <u>4,52</u>	<u>8,44</u> <u>8,38</u>	<u>11,90</u> <u>11,67</u>

x) **1b**: $[\alpha]^{22}_D = +23,8^\circ$ (c=1,3 %, acetonas); **1c**: $[\alpha]^{22}_D = +32,0^\circ$ (c=1,4 %, vanduo);

a) viršutinė reikšmė: rasta; b) apatinė reikšmė: apskaičiuota

2 Lentelė. Junginių 1b, 2b, 1c ir 2c IR spektrai (ν cm⁻¹)

Jung.	C=O karboksile	C=O amide	NO ₂	NH
1b	1717	1613	1533, 1323	3390
2b	1700	1640	1527, 1353	3310
1c	1623	1595	1520, 1333	3300
2c	1630	1587	1520, 1345	3320

3 Lentelė. Junginių 1b, 2b, 1c ir 2c ¹H BMR spektrai (δ skalė, cheminiai poslinkiai m.d., multipletiškumas)

Jung.	Tirpiklis	CH ₃ O	β -Fenil			CH ₂	CHCOO	CH ₃	CH ₂ CO
			2-H	5-H	6-H				
1b	(CD ₃) ₂ CO	---	7,92d	7,04d	7,53dd	3,05m	4,69m	0,94t	2,03k
2b	(CD ₃) ₂ CO	3,85s	7,65d	7,16d	7,48dd	3,04m	4,69m	0,94t	2,11k
1c	DMSO-d ₆	---	7,46d	6,77d	7,07dd	2,86m	4,03m	0,95t	2,05k
2c	DMSO-d ₆	3,82s	7,50d	7,13d	7,35dd	2,93m	3,85m	0,88t	2,00k

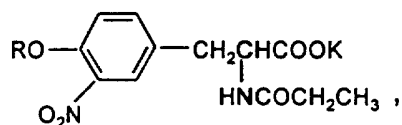
4 Lentelė. Junginių 1c, 2c ir A-195 toksiškumas, antinavikinis veikimas bei jų poveikis į pelių su įskiepytais navikais kūno ir blužnies svorius

Junginiai	Ūmaus toksiškumo dozė pelėms (mg/kg, ip) LD ₁₀₀ LD ₅₀ MPD	Daugkartinės terapinės dozės pelėms (mg/kg, ip)	Navikų modelis	Naviko ir ascitinio augimo slopinimas (%) (p)	Svorio pokytis (%) (p) Kūno Blužnies
1c	3800 3750 3500	500x2 50x3 100x5	S-180 EAC L-1210	94,5(p=0,001) 100(p<0,05) 87,2(p<0,001)	-9,9 -13,1(p<0,05) -7,8
2c	4000 3550 3000	50x4 200x3 ^{a)} 200x5	S-180 EAC L-1210	89,1(p<0,01) 100(p<0,05) 68,7(p<0,01)	-21,1 16,8 -40,6(p<0,02)
A-195	1500 ^{b)}	300x3 150x3 100x5	S-180 EAC L-1210	74,9(p<0,01) ^{a)} 100(p<0,05) 25,0(p = 0,05)	... -4,4 11,7(p<0,02)

Santrumpos: ip – intraperitoninis (junginiai pelėms įšvirkščiami į pilvaplėvės ertmę); p – patikimumo koeficientas, apskaičiuotas variacinės statistikos metodu [J.T. Litchfield, F. Wilcoxon, J. Pharmacol. Exp. Therap., Vol. 96, pp. 99-113 (1949)]; kai p nenurodytas, tai reiškia, kad $p > 0,05$, t.y. duomenys nėra patikimi; LD₁₀₀ – letalinė dozė, kai žūsta visos bandomos pelės; LD₅₀ – dozė, kai žūsta pusė bandomų pelių; MPD – maksimaliai pakeliama dozė; S-180 – sarkoma 180; EAC – Ericho ascitinė karcinoma; L-1210 – limfoleukozė L-1210. a) Junginio 2c ši dozė 57,3 % (p<0,05) prailgino pelių, įskiepytų EAC, išgyvenimą; b) literatūriniai duomenys [K. Fukushima et al. Keio J. Med., Vol. 23, pp. 191-204 (1974)]; c) literatūriniai duomenys [K. Fukushima, S. Toyoshima. Cancer Chemother. Rep. Part 1, Vol. 59, No 2, pp. 309-318 (1975)].

APIBRĖŽTIS

1. Junginiai N-propionil-4-hidroksi-3-nitro-*L*-fenilalanino ir N-propionil-4-metoksi-3-nitro-*DL*-fenilalanino kalio druskos bendros struktūrinės formulės:



kurioje R reiškia H, kai liekana yra *L*-fenilalaninas ir R reiškia CH₃, kai liekana yra *DL*-fenilalaninas.

2. Junginiai pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie pasižymi antinavikiniu aktyvumu, slopindami sarkomos 180 augimą 94,5 % ir 89,1 % atitinkamai.

3. Junginys N-propionil-4-metoksi-3-nitro-*DL*-fenilalanino kalio druska pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis 57,3 % prailgino pelių, įskiepytų EAC, išgyvenimą.