

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233289**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **418626**

(51) Int.Cl.

C07D 265/38 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **09.09.2016**

(54) **Mono-acylowane pochodne kwestiomycyny A i sposób ich wytwarzania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
27.02.2017 BUP 05/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.09.2019 WUP 09/19

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
MIROSŁAW GIURG, Suszkowice, PL
EWA SUSKA, Siedliska, PL
EWELINA TOMCZAK-WĘGLARZ, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 233289 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są mono-acylowane pochodne kwestiomycyny A znajdujące zastosowanie w syntezie medycznej jako składniki aktywne leków przeciwnowotworowych. Mono-acylowane pochodne kwestiomycyny A są wykorzystywane jako inhibitory enzymów, w oznaczaniu kwasów dezoksyrybonukleinowych (DNA), identyfikacji martwych komórek, wykrywaniu enzymów bakteryjnych, jako barwniki syntetyczne, oraz jako nowej generacji środki ochrony roślin.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób wytwarzania mono-acylowanych pochodnych Kwestiomycyny A.

Mono-acylowane na terminalnej grupie aminowej 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-ony stanowią fragment aktywny szeregu biologicznie aktywnych związków naturalnych. Przykładem są Chandrananimycyny i Eksfoliazon znane z serii publikacji Maskey et al. *The Journal of Antibiotics*, **2003**, 56, 622–629, Imai et al. *The Journal of Antibiotics*, **1990**, 43(12), 1606–1607 i Ren et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23, 301–304, wykazujące aktywność przeciwnowotworową. Innym przykładem acylowanych pochodnych hamujących namnażanie komórek nowotworowych są Bezzeramycyny B i C znane z publikacji Gomes et al. *European Journal of Organic Chemistry*, **2010**, 231–235, oraz Chandrananimycyna D znana z publikacji Gomes et al. *The Journal of Natural Products*, **2010**, 73, 1461–1464, fenoksazono funkcjonalizowane w pozycji C-8 pierścienia benzenowego.

Przykładem acetylowanego fenoksazonu funkcjonalizowanego w pozycji C-7 pierścienia benzenowego jest 2-acetyloamino-7-metoksy-3*H*-fenoksaz-3-on znany z publikacji Macias et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 538–548 i Macias et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 991–1000. Z pracy przeglądowej Beiz *Pest Management Science*, **2007**, 63, 308–326 i z publikacji Venturelli et al. *The Plant Cell*, **2015**, 27, 3175–3189, znane są właściwości fitotoksyczne acetylowanej Kwestiomycyny A i jej pochodnej metoksyloowanej w pozycji C-7. Związki te są wytwarzane w glebie, w wyniku korzeniowego wydzielania cyklicznych kwasów hydroksamowych DIBOA (4-dihydroksy-2*H*-1,4-benzoksazyn-3(4*H*)-on) lub DIMBOA (2,4-dihydroksy-7-metoksy-2*H*-1,4-benzoksazyn-3(4*H*)-on) i wykazują korzystną, w porównaniu do związków nieacetylowanych, zdolność zapobiegania kiełkowania nasion chwastów i innych roślin niepożądanych w uprawach rolnych. Związki przedstawione powyżej posiadają ugrupowanie amidowe w pozycji C-2 szkieletu fenoksazonowego.

Przykładem amidowych związków pokrewnych są Aktynomycyny, antybiotyki polipeptydowe znane z pracy przeglądowej Hollstein *Chemical Reviews*, **1964**, 625–652. Aktynomycyna D jest stosowana w leczeniu chorób nowotworowych. Z publikacji Veselkov et al. *European Journal of Biochemistry*, **2003**, 270, 4200–4207, znane są analogi Aktynomycyny D spowalniające namnażanie się komórek nowotworowych. Patent WO 2010/062536 A2 ujawnia ich przydatność w identyfikacji martwych komórek. Pokrewne kwasy plektosphaeroilowe znane z publikacji Carr et al. *Organic Letters*, **2009**, 11(14), 2996–2999, oraz kwas cynnabarynowy znany z publikacji Pasceri et al. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, 56, 3310–3317, fenoksazonowe związki naturalne z wolną grupą karboksylową hamują aktywność 2,3-dioksygenazy indoloaminowej.

Acylowanie amoniaku oraz nukleofilowych amin pierwszo- i drugorzędowych klasycznie prowadzi się w neutralnym rozpuszczalniku organicznym i wymagane są aktywne formy kwasów karboksylowych, przykładowo bezwodniki kwasowe lub bardziej reaktywne halogenki acylowe. Acetylowanie amin wolnym kwasem karboksylowym polega na ogrzewaniu wytworzonej soli, jednak ograniczeniem metody są substraty wrażliwe na wysokie temperatury. W przypadku wrażliwych związków w tym pochodzenia naturalnego stosuje się dodatki aktywujące. Dodatkowym problemem jest ich toksyczność, a ich pozostawienie są trudne do usunięcia, co wymaga dużego nakładu czasu.

Sposób wytwarzania acylowanych na grupie aminowej estrów karboksylowych 2-amino-1,9-dikarboksyfenoksaz-3-onów jest znany z opisu w publikacjach Jabri i Overman *The Journal of Organic Chemistry*, **2013**, 78, 8766–8788, Jabri i Overman *Journal of the American Chemical Society*, **2013**, 135, 4231–4234 i polega na acylowaniu dwuwęglanem di-*tert*-butylu [(Boc)₂O] oraz z opisu w publikacji Marsh i Goodman, *The Journal of Organic Chemistry*, **1966**, 31, 3694–3698 i polega na acetylowaniu chlorkiem acetylu. Istnieją jednak liczne ograniczenia tych metod. Odczynnik acylujący jest stosowany w nadmiarze i wymaga użycia zasady, odpowiednio 4-*N,N*-dimetyloaminopirydyny (DMAP) lub pirydyny, w wyniku otrzymuje się produkty mono i diacylowania, ewentualnie związki dibocowane lub diacetylowane są wyłącznymi produktami reakcji. Wyżej zaprezentowane metody acylowania fenoksazonów posiadają ograniczenia takie jak niska efektywność wytwarzania mono-acylowanych aminofenoksazonów

podatnych na dalsze acylowanie, duży nakład pracy oraz toksyczność odpadów ciekłych zawierających odpadowe pirydyny.

Inny sposób wytwarzania mono-acetylowanego 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-onu znany jest z publikacji Cavil et al. *Tetrahedron*, **1961**, 12, 139–145 i Osman et al. *Canadian Journal of Chemistry*, **1976**, 54, 37–43, i polega na acetylowaniu 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-onów bezwodnikiem octowym w warunkach reduktywnych w obecności pyłu cynkowego, z wytworzeniem tetra-acetylowanego produktu pośredniego. Niedogodnością tego sposobu wytwarzania jest tworzenie się pośrednich produktów uwodornienia fenoksazonu, które ulegają nieselektywnemu acetylowaniu z utworzeniem związków wielopodstawionych i duży nakład pracy. Dodatkową niedogodnością wyżej zaprezentowanej metody jest ograniczenie zakresu reakcji o związki z dezaktywującymi grupami karboksylowymi w szkielecie fenoksazonowym.

Wprawdzie klasyczne mono-acylowanie Kwestiomycyny A jest znane z publikacji przykładowo Osman i Bassiouni *Journal of the American Chemical Society*, **1960**, 82, 1607–1609, jednak autorzy nie ujawnili szczegółów eksperymentalnych. Jeszcze inny sposób bezpośredniego mono-acetylowania 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-onów jest znany z publikacji Macias et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 538–548 i Macias et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 991–1000, i polega na bezpośrednim acetylowaniu bezwodnikiem octowym w kwasie octowym. Ograniczeniem powyższej metody jest konieczność wprowadzenia silnie aktywującego ugrupowania metoksyowego w pozycję C-7 substratu fenoksazonowego oraz długi czas reakcji.

W naszych badaniach w reakcji prowadzonej w warunkach klasycznych nieoczekiwanie Kwestiomycyna A i jej pochodne, C-8 *tert*-butylowa i C-7 lub C-8 chlorowe, nie ulegały reakcji acetylowania bezwodnikiem octowym w chloroformie i w kwasie octowym, w wyniku uzyskano wysokiej czystości nieprzereagowane substraty.

Istotą rozwiązania według wynalazku są mono-acylowane pochodne Kwestiomycyny A o wzorze ogólnym 1, w którym X oznacza grupę metylenową lub fragment (Z)-1,2-etenowy, n stanowi liczbę 1, 2 lub 3, R¹ oznacza *t*-Bu, a R² oznacza H lub imidowa pochodna Kwestiomycyny A w postaci 2-(3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu o wzorze 2 lub mono-acetylowane pochodne Kwestiomycyny A o wzorze ogólnym 3, w którym R¹ i R² są różne i R¹ oznacza H lub Cl, a R² oznacza H lub Cl.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest również sposób wytwarzania mono-acylowanych pochodnych Kwestiomycyny A o wzorze ogólnym 1, w którym X oznacza grupę metylenową lub fragment (Z)-1,2-etenowy, n stanowi liczbę 1, 2 lub 3, R¹ oznacza *t*-Bu, a R² oznacza H lub imidowej pochodnej Kwestiomycyny A w postaci 2-(3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu o wzorze 2 lub mono-acetylowanych pochodnych Kwestiomycyny A o wzorze ogólnym 3, w którym R¹ i R² są różne i R¹ oznacza H, *t*-Bu lub Cl, a R² oznacza H lub Cl polegający na tym, że jedną część molową 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-onu o wzorze ogólnym 5, w którym R¹ i R² są różne i R¹ oznacza H, *t*-Bu, Cl, a R² oznacza H, Cl traktuje się co najmniej dwiema częściami molowymi bezwodnika octowego, bezwodnika ftalowego lub cyklicznego bezwodnika kwasów alkano lub alkeno dikarboksylowych o wzorze ogólnym 4, w którym X oznacza grupę metylenową lub fragment (Z)-1,2-etenowy, n stanowi liczbę 1, 2 lub 3, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze 373–391 K w kwasie octowym, a następnie z mieszaniny poreakcyjnej wydziela się produkty reakcji.

Korzystnie bezwodnik octowy, ftalowy lub cykliczny kwasów alkano lub alkeno dikarboksylowych o wzorze ogólnym stosuje się w ilości 2,0–3,0 równoważników.

Korzystnie w reakcji z cyklicznym bezwodnikiem o wzorze ogólnym 4 reakcję prowadzi się z niepełną konwersją substratu fenoksazonowego przedstawionego wzorem ogólnym 5.

Korzystnie w reakcji chlorowanych 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-onów przedstawionych wzorem ogólnym 5 stosuje się bezwodnik octowy w ilości 10 równoważników.

Zasadniczą korzyścią wynikającą ze stosowania metody będącej przedmiotem wynalazku jest wysoka efektywność wytwarzania mono-acylowanych 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-onów stosując łagodne odczynniki acylujące, bezwodnik kwasu octowego i bezwodniki cyklicznych kwasów alkano, alkeno i areno dikarboksylowych. Wydajność mono-acylowania aminofenoksazonów o wzorze ogólnym 5 mieści się w przedziale od 48% do 97% w przeliczeniu na przereagowany substrat fenoksazonowy 5. Dodatkową zaletą jest sposób wytwarzania mono-podstawionych na terminalnej grupie aminowej fenoksazonów i brak w produktach zanieczyszczeń w postaci związków wielopodstawionych, przy braku stosowania aktywatorów.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest w przykładach realizacji oraz na schematach reakcji.

Przykład 1

2-Amino-8-chloro-3*H*-fenoksaz-3-on (49 mg, 0,20 mmola) otrzymany metodą znaną z publikacji Granda et al. *Synthesis* **2015**, 47, 3321–3332, str. 3329, rozpuszcza się w kwasie octowym (10 ml) ogrzanym do około 373 K następnie dodaje się bezwodnik octowy (0,19 ml, 0,20 g, 2,0 mmola). Używaną mieszaninę ogrzewa się w temperaturze wrzącego rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną w około 391 K w czasie ośmiu godzin, po czym lotne składniki usuwa się pod ciśnieniem 20 hPa na łaźni wodnej o temperaturze około 328–338 K, suszy na powietrzu, w wyniku uzyskuje się niemal ilościowo surowy produkt w postaci 2-acetyloamino-8-chloro-3*H*-fenoksaz-3-onu. Surowy produkt rozpuszcza się we wrzącym kwasie octowym (około 2 ml), a następnie pozwala się na ochłodzenie do temperatury pokojowej do około 298 K i pozostawia na noc w lodówce w temperaturze około 290 K. Po 20 godzinach odsącza się wytworzone ciało stałe, suszy na powietrzu, w wyniku uzyskuje się czysty lśniący brązowy produkt w postaci 2-acetyloamino-8-chloro-3*H*-fenoksaz-3-onu krystalizujący z jedną drugą cząsteczki kwasu octowego z wydajnością 75% topiący się z rozkładem w temperaturze 589,5 K. Potwierdzeniem struktury związku są widma:

^1H NMR(DMSO- d_6) δ : 1,91 (s, 3/2H, CH_3COOH), 2,24 (s, 3H, COCH_3), 6,50 (s, 1H, H-4), 7,60 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-9), 7,66 (dd, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,5$ Hz, 1H, H-7), 7,94 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, H-6), 8,26 (s, 1H, H-1), 9,78 (s, 1H, NH), 11,95 (s, 1/2H, CH_3COOH).

HRMS (EI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ obliczono dla $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{NaO}_3$: 311.0194; oznaczono: 311.0201.

Przykład 2

Postępuje się jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że substrat bezwodnik octowy stosuje się w ilości 40 mg (0,40 mmola) i reakcję prowadzi się w chloroformie w temperaturze 323 K w czasie sześciu godzin, w wyniku uzyskuje się nieprzereagowany substrat w postaci 2-amino-8-chloro-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 97% identyczny z wyjściowym substratem.

Przykład 3

Postępuje się jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że substrat bezwodnik octowy stosuje się w ilości 61 mg (0,60 mmola) i reakcję prowadzi się w kwasie octowym w temperaturze 391 K w czasie sześciu godzin, w wyniku uzyskuje się nieprzereagowany substrat w postaci 2-amino-8-chloro-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 96% identyczny z wyjściowym substratem.

Przykład 4

Postępuje się jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że jako substrat w reakcji acylowania stosuje się 2-amino-7-chloro-3*H*-fenoksaz-3-on (0,12 g, 0,50 mmola) otrzymany metodą znaną z publikacji Granda et al. *Synthesis* **2015**, 47, 3321–3332, str. 3329, kwas octowy (5,0 ml) i bezwodnik octowy (0,47 ml, 0,51 g, 5,0 mmola) w czasie 30 minut. Reakcji pozwala się na ochłodzenie do temperatury pokojowej i pozostawia na 6 godzin w temperaturze około 290 K następnie wytworzone ciało stałe przesącza się, suszy na powietrzu, w wyniku uzyskuje się czysty lśniący brązowy produkt w postaci 2-acetyloamino-7-chloro-3*H*-fenoksaz-3-onu krystalizujący z jedną cząsteczką kwasu octowego z wydajnością 81% topiący się w temperaturze >603 K. Potwierdzeniem struktury związku są widma:

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 1,91 (s, 3H, CH_3COOH), 2,23 (s, 3H, COCH_3), 6,49 (s, 1H, H-4), 7,52 (dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-8), 7,76 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-6), 7,86 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-9), 8,27 (s, 1H, H-1), 9,76 (s, 1H, NH), 11,95 (s, 1H, CH_3COOH);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 179,49 (C=O), 170,72 (C=O), 148,98 (C), 148,41 (C), 143,28 (C), 137,85 (C), 135,25 (C), 132,44 (C), 130,50 (CH), 125,83 (CH), 116,21 (CH), 113,17 (CH), 104,07 (CH), 24,30 (CH_3COOH);

HRMS (EI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ obliczono dla $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{NaO}_3$ 311.0194; oznaczono: 311.0204.

Przykład 5

Postępuje się jak w przykładzie 4 z tą różnicą, że jako substrat reakcji stosuje się bezwodnik octowy w ilości 0,10 g (1,0 mmola) i reakcję prowadzi się w chloroformie w temperaturze 323 K w czasie sześciu godzin, w wyniku uzyskuje się nieprzereagowany substrat w postaci 2-amino-7-chloro-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 98% identyczny z wyjściowym substratem.

Przykład 6

2-Amino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-on (0,13 g, 0,50 mmola), uzyskany według procedury podanej poniżej, rozpuszcza się w gorącym kwasie octowym (5 ml) i dodaje się bezwodnik bursztynowy (0,10 g, 1,0 mmola), po czym miesza się w temperaturze ok. 373 K przez dziewięćdziesiąt minut. Mieszaninę poreakcyjną pozostawia się do ostygnięcia i usuwa się rozpuszczalnik pod ciśnieniem 20 hPa w temperaturze 318–338 K, a następnie suszy się na powietrzu i w wyniku otrzymuje się mieszaninę, z której wydziela się produkty chromatograficznie na żelu krzemionkowym o ziarnie 70–230 mesh

(100 g) stosując roztwór chloroformu, octanu etylu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 40 : 8 : 1. Uzyskuje się nieprzereagowany substrat w postaci 2-amino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 62% identyczny z wyjściowym substratem.

W wyniku dalszego eluowania uzyskuje się czysty pomarańczowy produkt w postaci kwasu 4-[(8-*tert*-butylo-3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)amino]-4-okso-butanowego z wydajnością 37% w przeliczeniu na substrat fenoksazonowy topiący się z rozkładem w temperaturze 490–491 K. Wydajność produktu ze względu na przereagowany substrat fenoksazonowy wynosi 97%. Potwierdzeniem struktury produktu są widma:

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 12,17 (s, 1H, COOH), 9,73 (s, 1H, NH), 8,24 (s, 1H, H-1), 7,80 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-9), 7,69 (dd, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-7), 7,48 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, H-6), 6,46 (s, 1H, H-4), 2,79 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, CH_2COOH), 2,52 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, CH_2CONH), 1,35 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 179,17 (C=O), 173,63 (C=O), 172,40 (C=O), 148,87 (C), 148,49 (C), 148,36 (C), 140,75 (C), 137,54 (C), 132,99 (CH), 129,40 (CH), 125,55 (CH), 115,53 (CH), 113,16 (CH), 103,54 (CH), 34,34 (C), 31,37 (CH $_2$), 30,93 ($3 \times \text{CH}_3$), 28,52 (CH $_2$);

HRMS (EI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ obliczono dla $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_5$: 391,1264; oznaczono: 391,1452.

2-Amino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-on, substrat reakcji acylowania uzyskuje się według procedury krzyżowej kondensacji 2-aminofenoli znanej z publikacji Pasceri et al. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**, 56(8), 3310–3317. W kolbie umieszcza się odpowiednio 2-amino-4-*tert*-butylofenol (42 mg, 0,25 mmola), 2-aminofenol (42 mg, 0,38 mmol) oraz aceton (3 ml). Do utworzonego roztworu mieszając dodaje się w temperaturze pokojowej (około 303 K) roztwór jodanu sodu (NaIO_3) (74 mg, 0,37 mmol) w wodzie (3 ml), a następnie mieszanie kontynuuje się przez 24 godziny w tej samej temperaturze, po czym aceton odparowuje się pod ciśnieniem około 20 hPa w temperaturze około 303 K, a pozostałość ekstrahuje się chloroformem (10×25 ml). Połączone ekstrakty chloroformowe przemywa się solanką i suszy się nad bezwodnym siarczanem sodu, po przesączeniu rozpuszczalnik odparowuje się do sucha pod ciśnieniem około 20 hPa w temperaturze 303–307 K, w wyniku otrzymuje się surowy produkt, który sący się przez żel krzemionkowy o ziarnie 70–230 mesh (100 g) stosując jako eluent roztwór chloroformu, octanu etylu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 50 : 10 : 1. W wyniku uzyskuje się czerwony proszek produktu w postaci 2-amino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 66% w przeliczeniu na wyjściowy 2-amino-4-*tert*-butylofenol topiącego się w temperaturze 455–457 K. Potwierdzeniem struktury związku są widma:

^1H NMR (DMSO- d_6) δ = 7,65 (s, 1H, Ar-H), 7,51 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,41 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, Ar-H), 6,77 (s, 2H, N-H), 6,36 (s, 1H, Ar-H), 6,33 (s, 1H, Ar-H), 1,33 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ = 180,0 (C=O), 148,9 (C), 148,0 (C), 147,8 (C), 147,2 (C), 139,8 (C), 133,2 (C), 126,3 (CH), 124,1 (CH), 115,3 (CH), 103,2 (CH), 98,3 (CH), 34,2 (C), 31,0 ($3 \times \text{CH}_3$);

HRMS (EI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ obliczono dla $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$: 269,1284; znaleziono: 269,1303.

Przykład 7

Postępuje się jak w przykładzie 6 z tą różnicą, że substrat reakcji, bezwodnik bursztynowy stosuje się w ilości 0,20 g (2,0 mmola) i reakcję prowadzi się do pełnego przereagowania substratu fenoksazonowego w czasie trzech godzin. Uzyskuje się produkty mono-acylowania z wydajnością 95% w stosunku molowym 42 : 58. W wyniku rozdzielu chromatograficznego uzyskuje się czerwono pomarańczowy produkt w postaci 2-acetyloamino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 40% topiący się w temperaturze 505,5–506,5 K. Potwierdzeniem struktury produktu są widma;

^1H NMR (CDCl_3) δ = 9,71 (s, 1H, N-H), 8,28 (s, 1H, H-1), 7,82 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,71 (dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,50 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, Ar-H), 6,47 (s, 1H, H-4), 2,23 (s, 3H, CH $_3$), 1,36 (s, 9H, CH $_3$);

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ = 179,3 (C=O), 170,6 (C=O), 148,9 (C), 148,6 (C), 148,4 (C), 140,8 (C), 137,6 (C), 133,0 (C), 129,4 (CH), 125,6 (CH), 115,6 (CH), 113,2 (CH), 103,6 (CH), 34,4 (C), 30,9 ($3 \times \text{CH}_3$), 24,3 (CH $_3$);

HRMS (EI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ obliczono dla $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3$: 311,1390; oznaczono: 311,1389.

W wyniku dalszego eluowania uzyskuje się produkt w postaci kwasu 4-[(8-*tert*-butylo-3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)amino]-4-okso-butanowego z wydajnością 55% identycznego z uzyskanym w przykładzie 6.

Przykład 8

Postępuje się jak w przykładzie 6 z tą różnicą, że jako substrat reakcji stosuje się bezwodnik maleinowy w ilości 0,10 g (1,1 mmola) w 7,5 ml kwasu octowego i reakcję prowadzi się w czasie siedemdziesięciu minut. Uzyskuje się produkty mono-acylowania z wydajnością 26% w stosunku molowym

54 : 46 z 54% wykorzystaniem substratu fenoksazonowego. Wydajność produktów mono-acylowania ze względu na przereagowany substrat fenoksazonowy wynosi 48%. Uzyskuje się jasno pomarańczowy produkt w postaci 2-acetyloamino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu, identyczny z uzyskanym w przykładzie 7, z wydajnością 14% w przeliczeniu na wyjściowy substrat fenoksazonowy, oraz z wydajnością 26% w przeliczeniu na przereagowany substrat fenoksazonowy.

W wyniku dalszego eluowania uzyskuje się nieprzereagowany substrat w postaci 2-amino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 46% identyczny z wyjściowym substratem.

W wyniku eluowania roztworem chloroformu, octanu etylu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 10 : 2 : 1 uzyskuje się czysty pomarańczowy proszek produktu w postaci kwasu (Z)-4-[(8-*tert*-butylo-3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)amino]-4-okso-but-2-enowego z wydajnością 12% ze względu na wyjściowy substrat fenoksazonowy topiący się z rozkładem w temperaturze 471–472 K. Wydajność produktu w postaci kwasu (Z)-4-[(8-*tert*-butylo-3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)amino]-4-okso-but-2-enowego ze względu na przereagowany substrat wynosi 22%. Potwierdzeniem struktury produktu są widma;

^1H NMR (CDCl_3) δ = 12,95 (s, 1H, OH), 10,18 (s, 1H, N-H), 8,33 (s, 1H, H-1), 7,82 (d, J = 2,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,73 (dd, J = 8,7 Hz, J = 2,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,52 (d, J = 8,7 Hz, 1H, Ar-H), 6,73 (d, J = 12,0 Hz, 1H, CHCON), 6,50 (s, 1H, H-4), 6,44 (d, J = 12,0 Hz, 1H, CHCOOH), 1,36 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$);

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ = 179,2 (C=O), 167,6 (C=O), 164,5 (C=O), 149,0 (C), 148,5 (C), 148,4 (C), 140,8 (C), 137,8 (C), 133,4 (CH), 133,0 (C), 129,6 (CH), 129,0 (CH), 125,6 (CH), 115,6 (CH), 114,2 (CH), 103,7 (CH), 34,4 (C), 30,9 ($3 \times \text{CH}_3$);

HRMS (EI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ obliczono dla $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5$: 367.1288; znaleziono: 367.1296.

Przykład 9

Postępuje się jak w przykładzie 6 z tą różnicą, że jako substrat reakcji stosuje się bezwodnik glutarowy w ilości 172 mg (1,5 mmola) w 10 ml kwasu octowego i reakcję prowadzi się w czasie jednej godziny. Uzyskuje się produkty mono-acylowania z wydajnością 58% w stosunku molowym 38 : 62 z 68% wykorzystaniem substratu fenoksazonowego. Wydajność produktów mono-acylowania ze względu na przereagowany substrat fenoksazonowy wynosi 85%.

W wyniku eluowania roztworem chloroformu, octanu etylu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 20 : 4 : 1 uzyskuje się czysty produkt w postaci 2-acetyloamino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu identyczny z uzyskanym w przykładzie 7 z wydajnością 22% w przeliczeniu na wyjściowy substrat fenoksazonowy, oraz z wydajnością 32% w przeliczeniu na przereagowany substrat fenoksazonowy.

W wyniku dalszego eluowania uzyskuje się nieprzereagowany substrat w postaci 2-amino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 32% identyczny z wyjściowym substratem.

W wyniku dalszego eluowania uzyskuje się czysty pomarańczowy proszek produktu w postaci kwasu 5-[(8-*tert*-butylo-3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)amino]-5-okso-pentanowego z wydajnością 36% topiący się w temperaturze 491–492 K. Wydajność kwasu 5-[(8-*tert*-butylo-3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)amino]-5-okso-pentanowego ze względu na przereagowany substrat fenoksazonowy wynosi 53%. Potwierdzeniem struktury produktu są widma;

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ = 12,09 (s, 1H, OH), 9,62 (s, 1H, N-H), 8,27 (s, 1H, Ar-H), 7,81 (d, J = 2,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,69 (dd, J = 8,7 Hz, J = 2,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,48 (d, J = 8,7 Hz, 1H, Ar-H), 6,45 (s, 1H, Ar-H), 2,59 (t, J = 7,4 Hz, 2H, CH_2CON), 2,27 (t, J = 7,4 Hz, 2H, CH_2COOH), 1,80 (q, J = 7,4 Hz, 2H, CH_2), 1,35 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$);

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ = 179,2 (C=O), 174,0 (C=O), 172,9 (C=O), 148,8 (C), 148,5 (C), 148,4 (C), 140,7 (C), 137,5 (C), 133,0 (C), 129,4 (CH), 125,5 (CH), 115,5 (CH), 113,2 (CH), 103,5 (CH), 35,5 (CH_2), 34,3 (C), 32,8 (CH_2), 30,9 ($3 \times \text{CH}_3$), 20,0 (CH_2);

HRMS (EI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ obliczono dla $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$: 383.1602; oznaczono: 383.1617.

Przykład 10

Postępuje się jak w przykładzie 1 z tą różnicą, że jako substraty reakcji stosuje się 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-on (Kwestiomocynę A) w ilości 0,21 g (1,00 mmola) oraz bezwodnik ftalowy w ilości 0,30 g (2,0 mmola) i reakcję prowadzi się w czasie sześćdziesięciu godzin. Następnie reakcji pozwala się na ostygnięcie do temperatury pokojowej (298 K) i pozostawia w temperaturze około 290 K. Wytworzone ciało stałe odsącza się, suszy się na powietrzu, w wyniku uzyskuje się produkty funkcjonalizowane na grupie aminowej w postaci 2-(3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu i 2-acetyloamino-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 72% w przeliczeniu na wyjściową Kwestiomocynę A w stosunku molowym 3 : 1. Produkty wydziela się chromatograficznie na żelu krzemionkowym o ziarnie 70–230 mesh (100 g) stosując roztwór chloroformu, octanu etylu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 40 : 8 : 1. W wyniku otrzymuje się czysty pomarańczowoczerwony produkt w postaci 2-(3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)-

-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu z wydajnością 54% ze względu na wyjściową Kwestiomycynę A topiący się z rozkładem w temperaturze 611–613 K. Potwierdzeniem struktury produktu są widma;

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 6,53 (s, 1H, H-4), 7,52 (ddd, *J* = 7,9 Hz, *J* = 7,3 Hz, *J* = Hz, 1H, H-8), 7,59 (dd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 1,2 Hz, 1H, H-6), 7,74 (ddd, *J* = 8,4 Hz, *J* = 7,3 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H, H-7), 7,91 (s, 1H, H-1), 7,94 (dd, *J* = 7,9 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H, H-9), 7,97 (dd, *J* = 5,3 Hz, *J* = 3,1 Hz, 2H, indol-H), 8,03 (dd, *J* = 5,3 Hz, *J* = 3,1 Hz, 2H, indole-H);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 179,08 (C=O), 165,97 (2 × C=O), 150,05 (C), 147,57 (C), 143,62 (C), 135,12 (2 × CH), 134,53 (C), 134,35 (CH), 133,87 (CH), 133,26 (C), 131,42 (C), 130,29 (CH), 125,80 (2 × CH), 123,79 (CH), 116,30 (CH), 105,26 (CH);

HRMS (EI): *m/z* [M+Na]⁺ obliczona dla C₂₀H₁₁N₂O₄: 343,0713; oznaczono: 343,0728.

W wyniku dalszego eluowania uzyskuje się pomarańczowy produkt mono-acetylowania w postaci 2-acetyloamino-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 18% ze względu na wyjściową Kwestiomycynę A topiący się z rozkładem w temperaturze 570,5–571,5 K. Potwierdzeniem struktury produktu są widma;

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2,23 (s, 3H, CH₃), 6,49 (s, 1H, H-4), 7,48 (ddd, *J* = 7,9 Hz, *J* = 7,1 Hz, *J* = 1,2 Hz, 1H, H-8), 7,56 (dd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 1,2 Hz, 1H, H-6), 7,64 (ddd, *J* = 8,3 Hz, *J* = 7,1 Hz, *J* = 1,4 Hz, 1H, H-7), 7,86 (dd, *J* = 7,9 Hz, *J* = 1,4 Hz, 1H, H-9), 8,28 (s, 1H, H-1), 9,70 (s, 1H, NH);

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ: 24,29 (CH₃), 103,75 (CH), 113,20 (CH), 116,09 (CH), 125,61 (CH), 129,36 (CH), 131,83 (CH), 133,40 (C), 137,73 (C), 142,82 (C), 148,74 (C), 148,83 (C), 170,65 (C=O), 179,39 (C=O);

HRMS (EI): *m/z* [M+Na]⁺ obliczono dla C₁₄H₁₁N₂O₃: 255,0764; oznaczono: 255,0760.

Przykład 11

Postępuje się jak w przykładzie 6 z tą różnicą, że substrat w postaci 2-amino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu stosuje się w ilości 32 mg (0,12 mmola), a jako odczynnik acetylujący stosuje się bezwodnik octowy w ilości 37 mg (0,36 mmola) i reakcję prowadzi się w czasie dwóch godzin. Stosując jako eluent roztwór chloroformu, octanu etylu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 100 : 20 : 1 uzyskuje się produkt w postaci 2-acetyloamino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 89% w przeliczeniu na substrat fenoksazonowy identyczny z uzyskanym w przykładzie 7.

Przykład 12

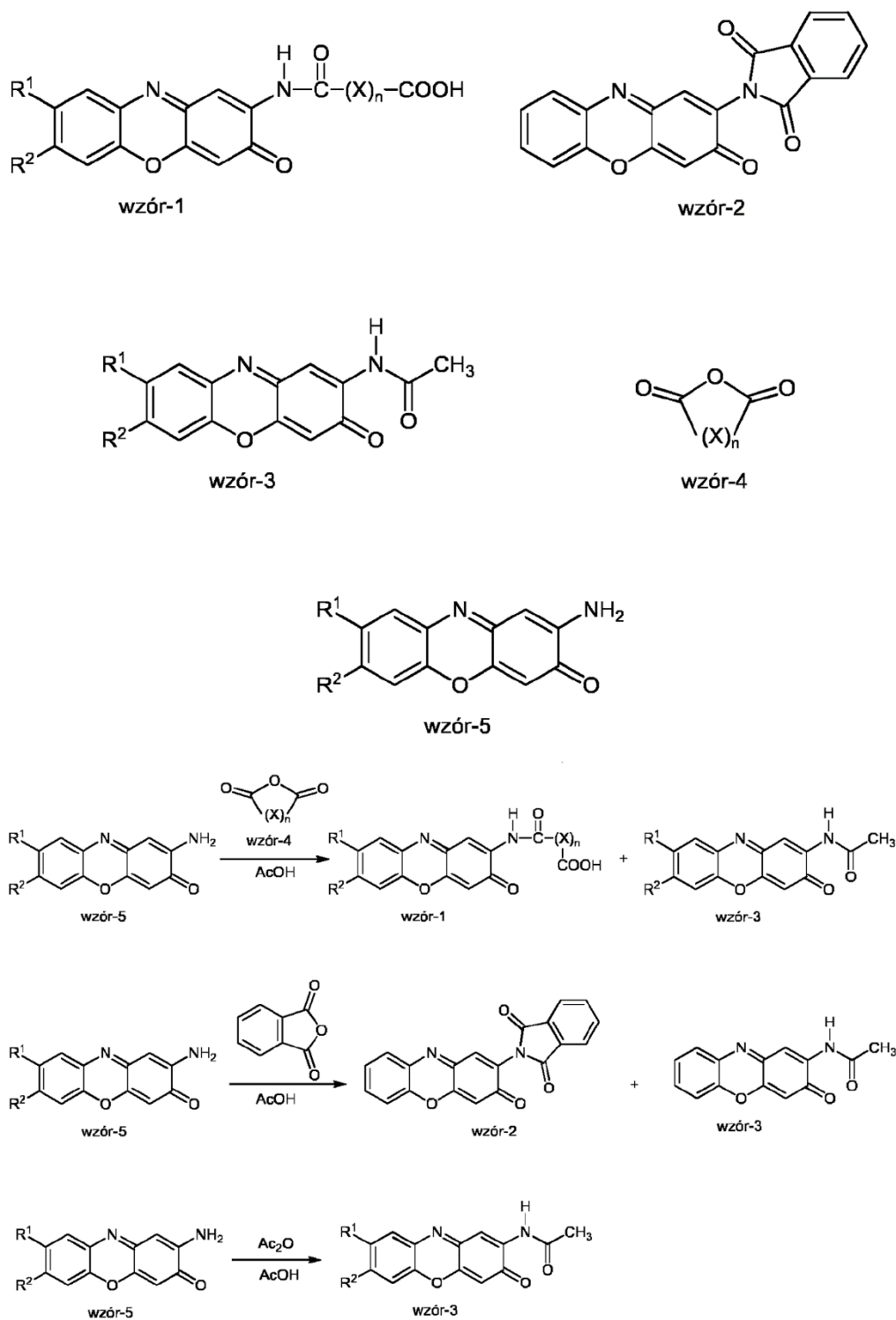
Postępuje się jak w przykładzie 11 z tą różnicą, że bezwodnik octowy stosuje się w ilości 13 mg (0,13 mmola), a jako rozpuszczalnik stosuje się chloroform (10 ml) i reakcję prowadzi się w czasie trzech godzin w temperaturze 338 K. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowuje się pod ciśnieniem 20 hPa w temperaturze około 303 K–307 K i suszy się nad NaOH w temperaturze około 298 K, w wyniku otrzymuje się nieprzereagowany substrat w postaci 2-amino-8-*tert*-butylo-3*H*-fenoksaz-3-onu z wydajnością 99% identyczny z wyjściowym substratem.

Zastrzeżenia patentowe

1. Mono-acylowane pochodne kwestiomycyny A o wzorze ogólnym 1, w którym X oznacza grupę metylenową lub fragment (Z)-1,2-etenowy, n stanowi liczbę 1, 2 lub 3, R¹ oznacza *t*-Bu, a R² oznacza H lub imidowa pochodna Kwestiomycyny A w postaci 2-(3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu o wzorze 2 lub mono-acetylowane pochodne Kwestiomycyny A o wzorze ogólnym 3, w którym R¹ i R² są różne i R¹ oznacza H lub Cl, a R² oznacza H lub Cl.
2. Sposób wytwarzania mono-acylowanych pochodnych kwestiomycyny A o wzorze ogólnym 1, w którym X oznacza grupę metylenową lub fragment (Z)-1,2-etenowy, n stanowi liczbę 1, 2 lub 3, R¹ oznacza *t*-Bu, a R² oznacza H lub imidowej pochodnej Kwestiomycyny A w postaci 2-(3-okso-3*H*-fenoksaz-2-yl)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu o wzorze 2 lub mono-acetylowanych pochodnych Kwestiomycyny A o wzorze ogólnym 3, w którym R¹ i R² są różne i R¹ oznacza H, *t*-Bu lub Cl, a R² oznacza H lub Cl, **znamienny tym**, że jedną część molową 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-onu o wzorze ogólnym 5, w którym R¹ i R² są różne i R¹ oznacza H, *t*-Bu, Cl, a R² oznacza H, Cl traktuje się co najmniej dwiema częściami molowymi bezwodnika octowego, bezwodnika ftalowego lub cyklicznego bezwodnika kwasów alkanu lub alkeno dikarboksylowych o wzorze ogólnym 4, w którym X oznacza grupę metylenową lub fragment (Z)-1,2-etenowy i n stanowi liczbę 1, 2 lub 3, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze 373–391 K w kwasie octowym, a następnie z mieszaniny poreakcyjnej wydziela się produkty reakcji.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że bezwodnik octowy, ftalowy lub cykliczny kwasów alkano lub alkeno dikarboksylowych o wzorze ogólnym stosuje się w ilości 2,0–3,0 równoważników.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w reakcji z cyklicznym bezwodnikiem o wzorze ogólnym 4 reakcję prowadzi się z niepełną konwersją substratu fenoksazonowego przedstawionego wzorem ogólnym 5.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w reakcji chlorowanych 2-amino-3*H*-fenoksaz-3-onów przedstawionych wzorem ogólnym 5 stosuje się bezwodnik octowy w ilości 10 równoważników.

Rysunki



Schematy reakcji

