

N-podstawione związki takryny, sposób wytwarzania  
oraz zastosowanie tych związków

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

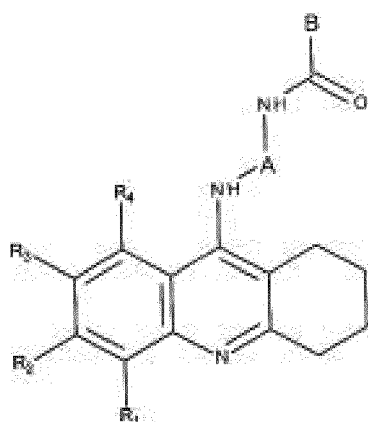
5 Takryna (9-aminoakrydyna) jest znana jako inhibitor acetylocholino-  
esterazy i jako taka znajduje zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera.  
Jednakże związek ten wykazuje wysoką hepatotoksyczność, co istotnie ogranicza  
jego stosowanie.

10 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.

15 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.

20 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,

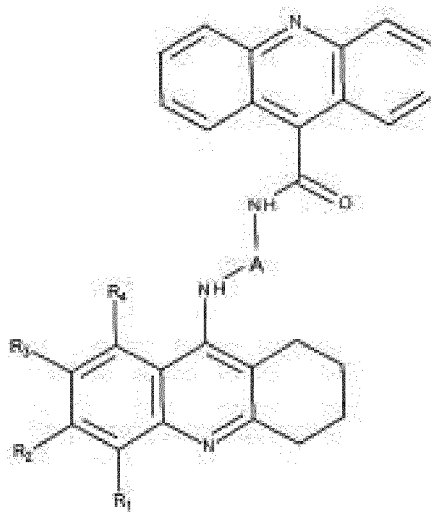


wzór 1

w którym R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> są niezależne 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 5 dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla, B oznacza akrydynę, przy 10 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.

Korzystnie, N-podstawiony związek takryny odpowiada wzorowi VI,



wzór VI

5 w którym R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> są niezależne 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 stanowi jego hydrat, solwat lub farmakologicznie dopuszczalną sól.

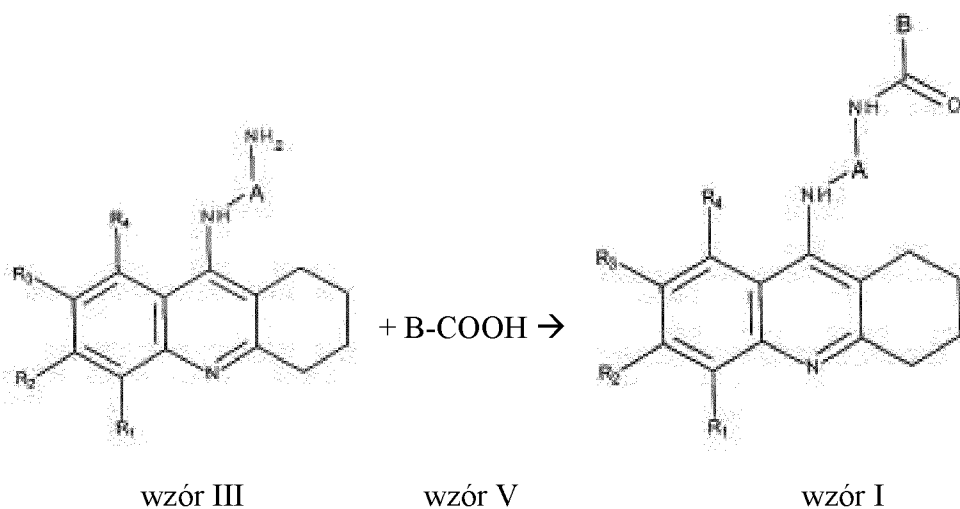
10 W szczególności, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> są niezależne wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę metylową, grupę metoksyłową, grupę trifluorometylową, A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dziesięciu atomów węgla, przy czym łańcuch główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla.

15 Związkiem 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,  
20 [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.

25 Sposób wytwarzania N-podstawionych związków takryny określonych powyżej, według wynalazku charakteryzuje się 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,  
30



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

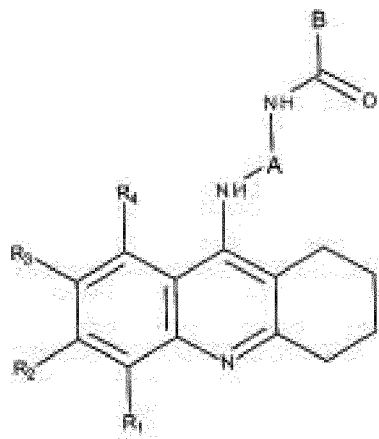
10        Związek określony powyżej stosuje się w terapii do leczenia choroby nowotworowej ze współistniejącą chorobą Alzheimera.

15        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

20        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

5 w którym

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> są niezależnie wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę aminową, grupę metylową, grupę metoksyłową, grupę hydroksylową, grupę trifluorometylową,

10 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,

15 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.

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



wzór III

wzór V

wzór I

5 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.

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

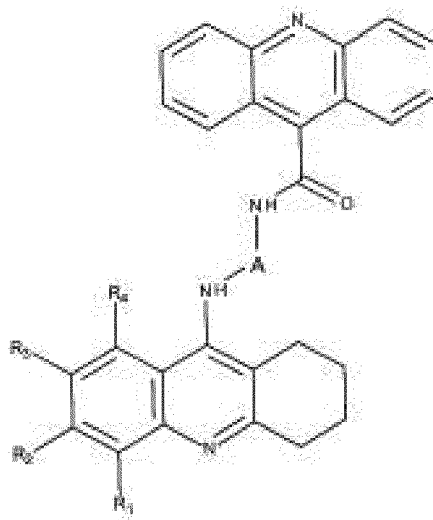
15 Korzystnie, rozpuszczalnikiem organicznym jest aprotonowy rozpuszczalnik organiczny lub mieszanina aprotonowych rozpuszczalników, bardziej korzystnie eterowy aprotonowy rozpuszczalnik organiczny lub mieszanina takich rozpuszczalników. Szczególnie korzystny rozpuszczalnik jest wybrany z grupy obejmującej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

20 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.

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



wzór VI

w którym

5  $R_1, R_2, R_3, R_4$  są niezależne wybrane z grupy obejmującej atom wodoru, atom fluorowca, grupę nitrową, grupę aminową, grupę metylową, grupę metoksyłową, grupę hydroksylową, grupę trifluorometyłową,

A oznacza dwuwartościowy fragment alkilenowy, ewentualnie rozgałęziony, mający od dwóch do dwunastu atomów węgla, przy czym łańcuch

10 główny fragmentu alkilenowego A zawiera co najmniej dwa atomy węgla,

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

15 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.

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

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

[3-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-ylamino)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,  
5 [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  
10 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  
15 takryny.

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

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

Przykłady

Przykład 1

25 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 rozprawdza się w wodnym  
30 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, zateża ekstrakt pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość poddaje się krystalizacji.

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

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-  
10 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  
15 US 5,155,226) otrzymując związek 1b (0,06 g, wydajność 88% względem teoretycznej), o t.t. 177-195°.

#### Przykład 2

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

Związek 2a otrzymuje się postępując według procedury określonej w  
20 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-karboksamidu

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-  
25 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-  
30

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°.

5                   Przykład 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.

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

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-tetrahydroakrydyn-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

25                   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-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)pentyl]akrydino-9-karboksamidu

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksyłowego (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-  
5 tetrahydroakrydyno)-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-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)pentyl]akrydyno-9-karboksamid (wydajność 67% względem teoretycznej) w postaci oleju. Uzyskany związek przeprowadza się w sól - chlorowodorek - znaną metodą (np. według  
10 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-tetrahydroakrydyno)-heksano-1,6-diamina

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

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

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksyłowego (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-  
20 tetrahydroakrydyno)-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-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)heksyl]akrydyno-9-  
25 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-  
5 etanodiaminy.

Związek 6b: chlorowodorek [7-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-  
yloamino)heptylo]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-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)heptylo]akrydino-9-karboksamid (wydajność 62% względem teoretycznej) w postaci oleju. Uzyskany  
10 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.  
15

Przykład 7

20 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.

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

Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksylowego (3,11 mmol, 0,75 g) w tetrahydrofuranie (8 ml) dodaje się N-metylomorfolinę (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  
30

godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. Otrzymuje się [8-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)oktylo]akrydyno-9-karboksamid (wydajność 66% względem teoretycznej) w postaci oleju. Uzyskany związek przeprowadza się w sól - chlorowodorek - znaną metodą (np. według 5 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-tetrahydroakrydyno)-nonano-1,9-diamina

10 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-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)nonylo]akrydyno-9-karboksamidu

15 Do roztworu hydratu kwasu 9-akrydynokarboksylowego (2,36 mmol, 0,75 g) w tetrahydrofuranie (8 ml) dodaje się N-metylomorfolinę (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-tetrahydroakrydyno)-nonano-1,9-diaminę (2,53 mmol, 0,86 g). Całość miesza się 21 godzin, oddziela się wytrącony osad drogą sączenia i poddaje krystalizacji. 20 Otrzymuje się [9-(1,2,3,4-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)nonylo]akrydyno-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.

25 Przykład 9. Badanie czynności inhibicyjnej związków według wynalazku.

30 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<sub>50</sub>, 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-tetrahydroakrydyna).

5

Tablica 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.

10

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

Przykład 10. Badanie czynności przeciwapregacyjnej  $\beta$ -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.

5           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  $\mu$ M). Wraz ze wzrostem użytego stężenia inhibitora rośnie procent hamowania agregacji  $\beta$ -amyloidu. Wyniki przedstawiono na wykresie zilustrowanym na fig. 2.

Przykład 11. Badanie cytotoksyczności

Do wykonania badania użyto linii komórek ATCC CCL-185 (nowotworowe komórki nabłonkowe płuc). Komórki hodowano na płycie 96-  
15   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-difenylo-  
20   tetrazoliowego) 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  $\mu$ M. Efekt toksyczny zaczyna się ujawniać po zastosowaniu stężenia 10  $\mu$ M i mieści się w granicach: 75% - 94% dla przeżywalności komórek. Przeżywalność  
25   drastycznie spada przy stężeniu 100  $\mu$ M 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.