

TEZA DE DOCTORAT

SINTEZA SI STUDIUL UNOR NOI DERIVATI DE

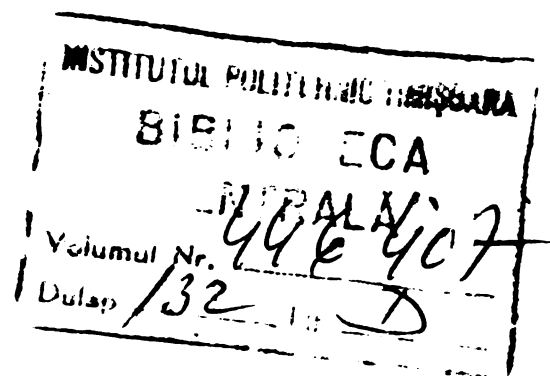
2-CLORETIL NIROZCUREE POTENTIAL ANTILEUCEMICI

Ing. Baracu Elena Georgeta
Institutul Oncologic Bucuresti

Conducător științific

Prof. Dr. - Doc. George Ostrogovici

BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
TIMIȘOARA



Tov.Prof.Dr.Doc.Ing. GEORGE OSTROGOVICI

omagiul recunoștinței și respectului -

Colegilor mei

chim.EutaŃa Tărnăuceanu

chim.Georgeta Botez

dr.biol.Vasile Dobre

- mulțumiri pentru ajutor și colaborare -

Dr.ing. ION NICULESCU DUVAZ

căruia îi datorez actuala mea orientare profesională

- asigurarea prieteniei și recunoștinței mele -

Părinților mee

C U P R I N S

PARTEA INTII. STUDIU CRITIC DE LITERATURA	pag.
I. Introducere	1
II. Locul N-nitrozoderivaților de uree în chimioterapia cancerului	
II.1. Delimitarea domeniului	5
II.2. Scurt istoric al dezvoltării N-nitrozoderivaților de uree	8
III. Principalele tipuri de N-NU evaluate pentru proprietățile lor anticancerose	10
IV. Relații calitative structură chimică - activitate biologică în clasa N-nitrozoureelelor	14
V. Mecanismul de descompunere al 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureelelor	
V.1. Descompunerea derivaților de N-nitrozouree în soluții apoase	18
V.2. Descompunerea derivaților de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree în soluții apoase	19
V.2.1. Natura produșilor rezultați în urma descompunerii în medii apoase (tamponate sau netamponate) a 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureelelor	19
V.2.2. Mecanismul descompunerii derivaților de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree	19
VI. Metabolizarea 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureelelor	22
VII. Mecanismul de acțiune la nivel molecular al 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureelelor	26
VIII. Relații cantitative structură chimică - activitate biologică (QSAR) în clasa 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureelelor.	

	pag.
VIII.1. Parametrii fizico-chimici și biologici utilizați în clasa N-NU pentru corelări QSAR.....	31
VIII.2. Corelarea activității biologice cu parametrii fizico-chimici	32
VIII.2.1. Importanța liposolubilității pentru proiectarea de noi compuși	33
VIII.2.2. Corelarea activității antitumorale cu timpul de înjumătățire, activitatea alchilantă și cea carbamoilantă	35
VIII.2.3. Corelarea toxicității cu parametrii fizico-chimici	35
VIII.3. Concluzii	37
Sinteza mono și 1,3-di(2-haloetil)ureelor	37
Sinteza derivaților de 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureeelor.....	43
Metode fizico-chimice de determinare a structurii derivaților de uree și nitrozouree	52
XI.1. Elemente structurale caracteristice derivaților de uree evidențiate spectrofotometric (uv,ir,rmn)....	52
XI.1.1. Date spectrale în uv caracteristice derivaților de uree	53
XI.1.2. Date spectrale în ir caracteristice derivaților de uree	53
XI.1.3. Analiza spectrelor rmn ale derivaților de uree	55
XI.2. Elemente structurale caracteristice derivaților de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree, evidențiate spectrofotometric	56
XI.2.1. Elemente spectrale în ir caracteristice nitrozoureeelor	56

XI.2.2. Elemente spectrale de rnm caracteris-	
tice derivaților de nitrozouree	57
XI.3. Determinarea cu ajutorul metodelor fizico-chimice	
de analiză a purității izomerice a N-nitrozo-	
ureelor	58
XI.3.1. Metoda descompunerii derivaților de N-	
nitrozouree în mediu apos cu amine.....	58
XI.3.2. Atribuirea structurii și purității izo-	
merice a derivaților de N-nitrozouree	
prin spectrometrie rnm	60
PARTEA A DOUA. CERCEȚARI PERSONALE.	
XII. Ipoteza de lucru	61
XIII. Sinteza unor noi derivați de N-nitrozouree	65
XIII.1. Sinteza 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureeelor	
aromatice	66
XIII.2. Derivați homo și heterocicloalifatici de 1-(2-	
cloretil)-1-nitrozouree .	
XIII.2.1. Analogi de CCNU și MeCCNU substituiți	
la inelul ciclohexanic	70
XIII.2.2: 2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidinil uree	
și nitrozouree	75
XIII.2.3. 1-(2-Cloretil)-1-nitrozouree poli-	
ciclice	79
XIII.3. Derivați alifatici de bis/1-(2-cloretil)-1(3)-	
nitrozouree/ și bis/1-ciclohexil-3-nitrozouree/	
XIII.3.1. Derivați alifatici de bis/1-(2-clor-	
etil) sau ciclohexil-3-nitrozouree/..	79
XIII.3.2. Derivați alifatici mono și bis/1-(2-	
cloretil)-1-nitrozouree/	86
XIII.4. Derivați de 1-(2-hidroxietil)-1(3)-nitrozouree	89

IV

	pag.
XIII.5. Derivați de N-(2-cloretil)-N-nitrozouretani....	91
XIII.6. Procedeu de obținere a 2-cloretil izocianatului	92
XIII.7. Procedeu tehnologic de preparare a 1-(2-clor- etil)-3-ciclohexil-1-nitrozoureei (CCNU, NI- PALKIN)	96
IV. Metode fizico-chimice de determinare a structurii noilor compuși.	
XIV.1. Caracterizarea în ir a noilor derivați de uree și nitrozouree	98
XIV.2. Caracterizarea în rmn a noilor derivați de uree și nitrozouree	102
XIV.2.1. Studiul izomeric 1-3 a N-nitrozo - ureelor	102
XIV.2.2. Structura resturilor ^A legate de funcțiunea N-nitrozouree	108
XIV.3. Elemente caracteristice ale spectrelor de masă ale nitrozoureeilor	112
XIV.4. Caracterizarea res a derivaților de uree și nitrozouree nitroxidici	115
V. Proprietăți fizico-chimice ale derivaților de nitrozouree 117	
XV.1. Liposolubilitatea	117
XV.2. Viteza de descompunere	122
XV.3. Activitatea alchilantă	123
VI. Proprietăți farmacologice ale noilor derivați de N- nitrozouree 124	
VII. Relații cantitative structură chimică - activitate bio- logică determinate pentru o serie de noi N-nitrozouree. 130	

	pag.
XVIII. Partea experimentală	139
XVIII.1. Derivați de 1-(2-cloretil)uree și nitrozouree	141
XVIII.2. Derivați homo și hetero-cicloalifatici de 1-(2-cloretil)uree și nitrozouree	144
XVIII.2.1. Analogi de CCNU și MeCCNU substi- tuiți la nucleul ciclohexanic	144
XVIII.2.2. Derivați de 4-(2,2,6,6-tetrametil- piperidinil)-uree și nitrozouree ...	148
XVIII.2.3. Derivați de 1-(2-cloretil)-1-nitrozo- uree policiclici	151
XVIII.3. Derivați alifatici de bis 1-(2-cloretil)-1- (3)-nitrozouree și bis 1-ciclohexil-3-ni- trozouree	153
XVIII.3.1. Derivați alifatici de bis/1-(2-clor- etil) sau ciclohexil-3-uree și ni- trozouree /.....	153
XVIII.3.2. Derivați alifatici mono și bis/1- (2-cloretil)-1-nitrozouree /.....	157
XVIII.4. Derivați de 1-(2-hidroxietil)-1(3)-nitrozouree	161
XVIII.5. N-(2-cloretil)-uretani și nitrozouretani.....	162
XVIII.6. Procedeu de obținere a 2-cloretil izociana- tului	165
XVIII.7. Procedeu tehnologic de obținere a 1-(2-clor- etil)-3-ciclohexil-1-nitrozoureei	165
CONCLUZII	166
ANEXA I .Lista abrevieri	172
ANEXA II. Lista compusilor noi sintetizați	174
BIBLIOGRAFIE	179

PARTEA INTII

STUDIU CRITIC DE LITERATURA

I. INTRODUCERE

Cancerul poate fi definit ca un grup de boli (neoplazii maligne) cronice, degenerative care afectează diferite țesuturi, organe sau sisteme ale organismului uman și animal. Etiologia sa deși încă neelucidată poate fi atribuită cu destulă certitudine unor mutații celulare de un anumit tip, generate de cauze multiple (ex. radiații, agenți chimici, virusuri, etc.). O statistică recentă consideră că peste 90% din totalul neoplaziilor umane se datoresc direct sau indirect agenților chimici din mediul înconjurător. /1/

Se pot defini astăzi cinci modalități, principial diferite, de tratament al cancerului și anume: chirurgia, radioterapia, chimioterapia, hormonoterapia și imunoterapia. Acestea pot fi utilizate singure sau mai eficient, în combinație, în funcție de tipul și stadiul neoplaziei respective precum și de anumite caracteristici ale pacientului.

Printre acestea chimioterapia deține o poziție deosebită în primul rând datorită dezvoltării ei rapide. O enumerare succintă a principalelor etape ce marchează drumul său ascendent rezultă din tabelul 1.

Tabel 1

Istoria chimioterapiei curative după /2/

1941	Inceputul sintezei de produse anticanceroase
1956-1957	Vindecări în unele forme de cancer metastazat prin chimioterapie
1963	Vindecări ale metastazelor prin polichimioterapie
1967	Vindecări prin folosirea chimioterapiei ca metodă adjuvantă
1970	Vindecări cu ajutorul medicamentelor care prezintă toxicitate selectivă

În al doilea rând această poziție se datorește rezultatelor remarcabile obținute prin utilizarea ei singură sau în asociere cu alte metode. Din datele prezentate în tabelul 2 rezultă posibilitatea obținerii, în procente semnificative, a unor vindecări sau remisiuni totale (peste 5-10 ani) chiar în cazul stadiilor avansate a unor forme de neoplazii.

Tabel 2

Vindecări și/sau remisiuni totale ale unor forme de cancer metastazate /2/

Tipul tumorii	<u>% de vindecări și/sau remisiuni obținute prin :</u>	
	Chimioterapie	Chimioterapie în combinație cu alte forme de tratament
Coriocarcinom	75	-
Rabdomiosarcom	50	60
Boala Hodgkin	58	-
Tumora Burkitt	45-55	-
Tumora Wilms	58	90
Tumora Ewing	31	65-80
Cancer testicular embrionar	32-70	78
Tumori sîn	-	9-22
Osteosarcom	-	60-80

În sfârșit și acesta este poate lucrul cel mai important, chimioterapia oferă pentru viitor speranțe de găsire a unor substanțe specifice și eficiente.

Cauzele succeselor obținute de chimioterapia anticanceroasă modernă rezidă atât în sinteza unui mare număr de compuși și în studii

migăloase privind mecanismul lor de acțiune cât și, mai ales în cercetările intensive efectuate asupra biochimiei și biologiei bolii canceroase.

Majoritatea dificultăților survenite în dezvoltarea acestei metode provin din faptul că celula malignă reține într-o proporție variabilă funcțiunile biochimice ale celulei normale din care provine. Deși între tumorile solide cât și între neoplaziile inițial diseminate (leucemiile, etc.) există deosebiri profunde, totuși ele prezintă o serie de caracteristici comune, care le diferențiază de țesuturile normale și anume :

a) diviziune celulară necontrolabilă, spre deosebire de proliferarea normală, ce se menține în limitele prestabilite genetic. De multe ori, dar nu întotdeauna, viteza de creștere a celulelor maligne este superioară celei a celulelor normale de origină;

b) invadarea țesuturilor și organelor învecinate și modificarea sau distrugerea lor prin mecanisme neelucidate ;

c) tendința de metastazare (formare a unor tumori secundare localizate la distanță față de tumora inițială).

Dat fiind că pînă recent dezvoltarea chimioterapiei s-a confundat cu încercările de a găsi substanțe active față de celulele cu ritm rapid de creștere, este evident că acestea odată găsite și utilizate în clinică vor afecta și țesuturile normale cu proprietăți asemănătoare (măduvă osoasă, epiteliul intestinal, etc.). Această carență, alături de caracterul potențial cancerigen al unora dintre aceste substanțe, constituie deficiențele majore ale chimioterapicelor actuale.

În ultimul deceniu, ca urmare a progreselor înregistrate în domeniul biochimiei, s-au profilat noi căi de realizare a unor substanțe cu toxicitate selectivă față de celulele maligne (ex. descoperirea de molecule cu tropism accentuat pentru celulele canceroase; sintetizarea

unor inhibitori specifici ai enzimelor virale cum ar fi transcriptaza inversă, ARN-polimeraza virală, etc., utilizarea proprietăților receptorilor hormonalți în vederea realizării unor substanțe specifice pentru neoplaziile normono-asociate, ș.a.m.d.).

De asemenea s-a impus elaborarea unor principii raționale de proiectare a compușilor potențial anticanceroși, drept cale de dezvoltare a acestui domeniu. Dintre acestea utilizarea corelațiilor cantitative, structură-activitate biologică (QSAR) merită o mențiune specială. Deși exploatată cu entuziasm, ea nu a condus încă la rezultatele așteptate, poate și pentru faptul că în numeroase cazuri aplicarea ei s-a făcut fără suficient discernământ, neglijând uneori aspecte importante, cum ar fi de pildă metabolizarea chiar și parțială a compușilor investigați. Considerăm totuși că adâncirea și rafinarea unor astfel de metode va duce finalmente la rezultate valoroase cu atât mai mult cu cât pe măsura elucidării mecanismului de acțiune al unei anumite categorii de produse anticanceroase se vor selecționa pentru corelări numai acei parametri fizico-chimici de care depinde în mod nemijlocit răspunsul biologic. De altfel, abaterile ce apar de la relațiile de tip QSAR stabilite pentru o clasă de substanțe reprezintă puncte nodale în dezvoltarea acesteia. În sfârșit trebuie menționat avantajul, deloc neglijabil, ce rezultă prin stabilirea pe această cale a structurilor optime, evitându-se astfel sinteza și testarea unui număr foarte mare de compuși neinteresanți, care grevează consistent bugetul unei astfel de cercetări.

Conform considerentelor expuse în această introducere, lucrarea de față a căutat să abordeze - din unghiuri de vedere variate și pe cât posibil originale - domeniul extrem de interesant al N-nitrozoureeilor cu proprietăți anticanceroase.

II. Locul N-nitrozoderivaților de uree în chimio- terapia cancerului

II.1. Delimitarea domeniului. Ritmul impetuos de sinteză al medicamentelor anticanceroase a impus o sistematizare a acestora, nu numai din motive formale, dar și ca o necesitate pentru dezvoltarea ulterioară a domeniului considerat. O clasificare riguroasă bazată pe un criteriu unic, funcțional de sistematizare, care să reflecte o proprietate intrinsecă a acestor substanțe (ex. mecanism de acțiune, etc.) nu a fost încă elaborată. Deși nu îndeplinește acest deziderat, cea mai uzitată împarte agenții anticanceroși în 4 grupe și anume :

- a) agenți alchilanți (sulfiperite, azotiperite, etilenimine, metansulfonați, N-nitrozouree, triazene, derivați de N-metilhidrazină, derivați dicarbonilici, etc.);
- b) antimetaboliți;
- c) produsi naturali (hormoni, antibiotice, alcaloizi, etc.);
- d) diverse

Atât în clasificarea de mai sus cât și în aceea mai riguroasă, dar încă insuficient elaborată, propusă de J.A.Montgomery /3/ N-nitrozoderivați de uree (N-NU) sînt considerați drept agenți alchilanți.

O serie de observații de ordin chimic și biologic sprijină acest punct de vedere și anume: 1) N-NU alchilează 4-nitrobenzil piridina (NBP), capacitatea lor de alchilare măsurată pe această cale putînd fi corelată, satisfăcător, cu activitatea lor biologică /4;5/; 2) N-NU dau rezistență încrucișată cu alți agenți alchilanți (de ex. ciclofosamidă) în cazul plasmocitomului de hamster sau în cazul unor microorganisme /6-8/; 3) N-NU produc efecte biochimice asemănătoare celor induse de agenții alchilanți clasici (ex. azotiperite) cum ar fi: interferența cu metabolismul unității de un carbon și cu utilizarea histidinei /9/,

creșterea activității NAD-azei și descreșterea concentrației NAD^+ în celulele tumorale /10/, descreșterea activității nucleotidil-transferazei /11/, etc.

Totuși N-NU datorită unor caracteristici deosebite, ocupă un loc aparte printre agenții alchilanți. Astfel mecanismul chimic de descompunere al N-NU este diferit de cel al agenților alchilanți obișnuiți /12/ ei generând două tipuri diferite de intermediari reactivi: carbocationi monofuncționali și izocianați. Nu apar ioni ciclici (ca cel de etilenimoniu) /12/. În al doilea rând 1,3-bis-(2-cloretil)-1-nitrozoureea BCNU^x nu induce rezistența încrucișată cu alți agenți alchilanți în boala Hodgkin /13/. În al treilea rând N-NU spre deosebire de majoritatea agenților de acest tip sînt activi de-a lungul întregului ciclu celular, manifestînd o eficacitate mai mare față de celulele care nu se divid /14-17/.

La aceste proprietăți trebuie adăugată și aceea, foarte importantă a unora dintre N-NU (ex. BCNU, CCNU), de a traversa bariera sînge-creier putînd ucide celulele leucemice din sistemul nervos central (SNC) /18,19/. Din acest motiv se consideră că N-NU au deschis drumul chimioterapiei în tratamentul tumorilor cerebrale.

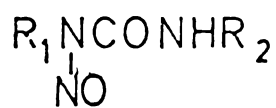
În sfîrșit merita de menționat faptul că deși evidențierea proprietăților lor antileucemice a fost un rezultat al sistemului random de testare /20/, sinteza de noi N-NU reprezintă o valorificare a studiilor privind relațiile structură-activitate biologică și al utilizării lor drept criteriu rațional de proiectare a unor compuși cu eficiență îmbunătățită. Așa se explică faptul că, deși descoperiți abia acum 20 ani, 8-9 derivați din această clasă au intrat sau se află deja în faze înaintate de testare clinică (tabel 3).

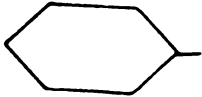
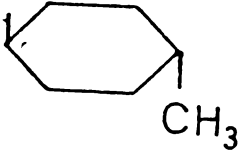
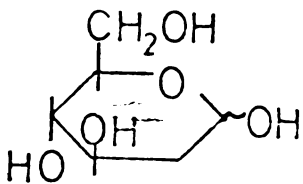
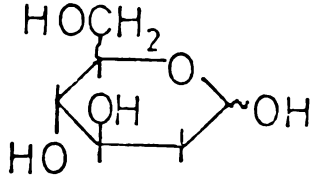
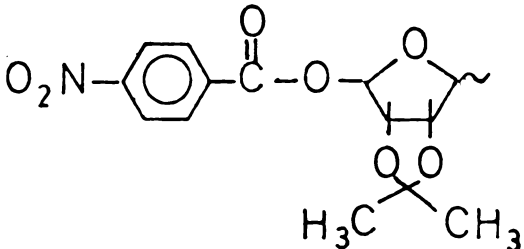
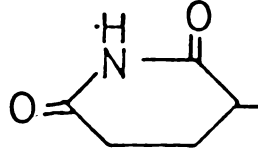
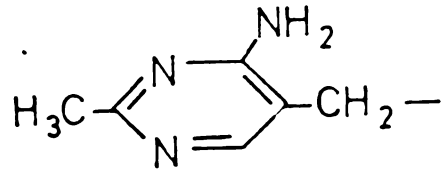
x

vezi lista abrevieri

Tabel 3

N-nitrozouree aflate în investigație clinică /21/

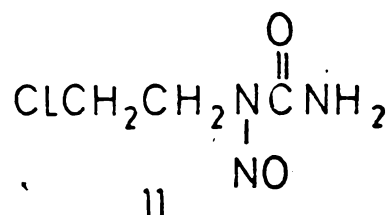
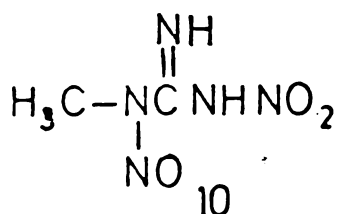


Nr.	Produs	R ₁	R ₂	Tara
1.	BCNU	ClCH ₂ CH ₂	ClCH ₂ CH ₂	SUA
2.	CCNU	ClCH ₂ CH ₂		SUA
3.	MeCCNU	ClCH ₂ CH ₂		SUA
4.	Streptozotocina	CH ₃		SUA
5.	Clorozotocina	ClCH ₂ CH ₂		SUA
6.	MNU	CH ₃	H	URSS
7.	RFCNU	ClCH ₂ CH ₂		Franța
8.	ClCH ₂ CH ₂		SUA	
9.	ACNU	ClCH ₂ CH ₂		Japonia

II.2. Scurt istoric al dezvoltării N-NU

Un istoric oricât de sumar al dezvoltării N-NU este obligat să menționeze următoarele etape :

1959 - evidențierea ca urmare a screening-ului random, a proprietăților antileucemice slabe, dar reproductibile, ale 1-metil-3-nitro-1-nitrozoguanidinei (10, MNNG, sintetizată în 1947) /21,22/



1959-1961 sinteza și testarea de noi congeneri ai MNNG evidențiază superioritatea celor în care gruparea metil este înlocuită cu gruparea 2-haloetil /23/. Testarea 1-metil-1-nitrozoureei (6, MNU, sintetizată încă din 1883) evidențiază proprietățile inhibitoare ale acesteia față de leucemia L 1210 implantată intracerebral (ic) /24,25/ iar dintre analogii săi structurali 1-(2-cloroetil)-1-nitrozoureea (11) se dovedește a fi cel mai activ /23/.

1963 - sinteza 1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitrozoureei (BCNU, 1), primul compus de acest tip care se dovedește a avea aplicații clinice /26/ și este considerat capul de serie al acestei clase.

1966 - sinteza 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrozoureei (2, CCNU) /27/ superior în unele privințe față de BCNU.

1971 - sinteza 1-(2-cloroetil)-3-(4-trans-metil-ciclohexil)-1-nitrozoureei (3, MeCCNU) /28/, care se dovedește foarte activă pe tumori experimentale cu ritm lent de creștere (tumori pulmonare Lewis), în general rezistente la chimioterapie /29/.

1972 - evidențierea proprietăților anticanceroase ale streptozotocinei (4), o N-NU extrasă din Streptomyces Achromogenus /30,31/. Produsul prezintă însă efecte secundare diabetogene /32,33/.

1972-1975 pe baza modelului furnizat de streptozotocină se sintetizează noi N-NU avînd ca molecule vectoare resturi de zahar /34,35/.

În 1975, se obține clorozotocina, 5, care reprezintă primul compus cu aplicații clinice din această serie și totodată prima N-NU cu o toxicitate scăzută față de măduva osoasă /36/.

1977 - sinteza 3-(2-cloroetil)-1-(ribofuranozil-2-3-izopropiliden-5-paranitrobenzoat)-3-nitrozoureei (7, RCFNU) /37,38/.

Studiile clinice efectuate asupra BCNU, CCNU și MeCCNU (monochi-mioterapie) la National Cancer Institute (Bethesda) pe mai mult de 3000 pacienți, au condus la definirea unui spectru al activității lor anti-canceroase (tabel 4) /39/.

Tabel 4

Activitatea BCNU, CCNU și MeCCNU pe diverse forme de
tumori umane /39/

Localizările tumoraie	Nr. răs-punsuri obiective/nr. pacienți evaluați (%)		
	BCNU	CCNU	MeCCNU
Creier	47	41	27
Boala Hodgkin	44	48	28
Limfoame ne-Hodgkin- iene	28	25	18
Melanoame	18	13	12
Plămîni	11	16	10
Sîn	21	12	4
Colorectal	13	9	11
Cap și gît	16	8	11

N-NU dau rezultate remarcabile într-o serie de forme neoplazice, în care datorită lor atît procentele de vindecări cît și timpul de supraviețuire au crescut semnificativ (boala Hodgkin, limfoame ne-Hodgkiniene,

etc.). In al doilea rând ele au făcut accesibile chimioterăpiei localizările cerebrale care practic nu beneficiau de această formă de tratament. În sfârșit N-NU și-au dovedit pe deplin utilitatea în schemele de polichimioterapie ale unor forme extrem de deficitare, cum ar fi tumorile de plămân, colorectale, etc: /40-43/.

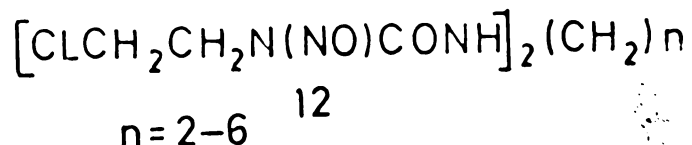
Nu trebuie trecute cu vederea nici importante neajunsuri ce limitează de multe ori utilizarea acestui grup de substanțe. Acestea se referă atât la efectele toxice, uneori severe, ale N-NU ce se manifestă la nivelul tractului gastrointestinal (greturi, vomismente) și al măduvei osoase (trombocitopenii și leucopenii tardive) /44/ cât și la faptul că N-NU sînt mutagene și probabil cancerigene /45,46/ față de animalele de experiență. Înlăturarea măcar parțială a acestor neajunsuri constituie un obiectiv important al cercetării în acest domeniu.

III. Principalele tipuri de N-NU evaluate pentru proprietățile lor anticanceroase

Majoritatea derivaților de N-nitrozouree au fost sintetizați pe baza a două concepții, complet diferite, dar relativ frecvent utilizate în proiectarea agenților anticanceroși.

O parte dintre ei au fost preparați în vederea obținerii unor N-NU active ca atare față de tumorile maligne. Au urmat apoi încercări laborioase de îmbunătățire a capilor de serie astfel obținuți (BCNU, CCNU, etc.). Din această primă categorie fac parte următoarele tipuri de N-NU :

1) Nitrozouree alifatică - BCNU (1) constituie capul de serie al acestei subgrupe de derivați. Din seria di-N-nitrozoureeilor alifatică (12), compusul cu n=6 manifestă o activitate antileucemică interesantă /45/.

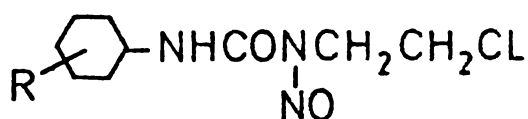


Deasemenea merită menționați și unii derivați hidrosolubili din această categorie /47/.

2) Nitrozoureele cicloalifaticе. In general derivații de ciclohexan, reprezintă grupa ce conține pe câțiva dintre cei mai interesanți compuși, cunoscuți în această clasă (CCNU, MeCCNU, HOOC-CCNU, etc.) Se remarcă în special activitatea unora dintre acești compuși față de tumorile cu ritm lent de creștere, cum este carcinomul pulmonar Lewis, rezistent la chimioterapie. Studiile întreprinse pînă în prezent nu au putut lămuri diferențele de activitate, uneori importante, ce se constată între diverșii conformeri (tabel 5) /28/.

Tabel 5

Activitatea față de carcinomul pulmonar Lewis a
unor derivați de CCNU /28/



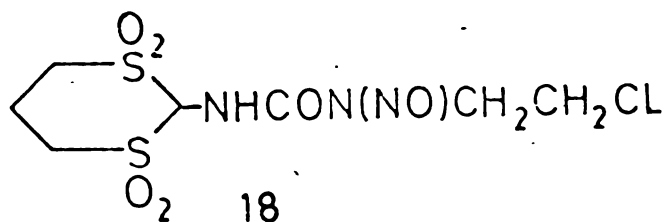
Nr	R	Creșterea timpului de formă timpurie	supraviețuire % formă avansată
2	H	15-31	-
6	trans-4-Me	46	44
13	cis-2-Cl	62	-
14	trans-2-Cl	18	38
15	cis-4-COOH	79	115
16	trans-4-OCH ₃	86	inactiv
17	cis-4-OCH ₃	100	-

Un interes teoretic deosebit îl prezintă mono și polihidroxi-ciclohexil-N-nitroso-derivații. In general foarte activi, unii dintre ei apar și ca intermediari în cursul metabolizării enzimaticе a CCNU sau MeCCNU /48/. In sfârșit trebuiesc menționați și derivații de ciclohexan complet sau parțial fluorurați, sintetizați în ideea elucidării modului

de metabolizare al acestui tip de compuși /49/.

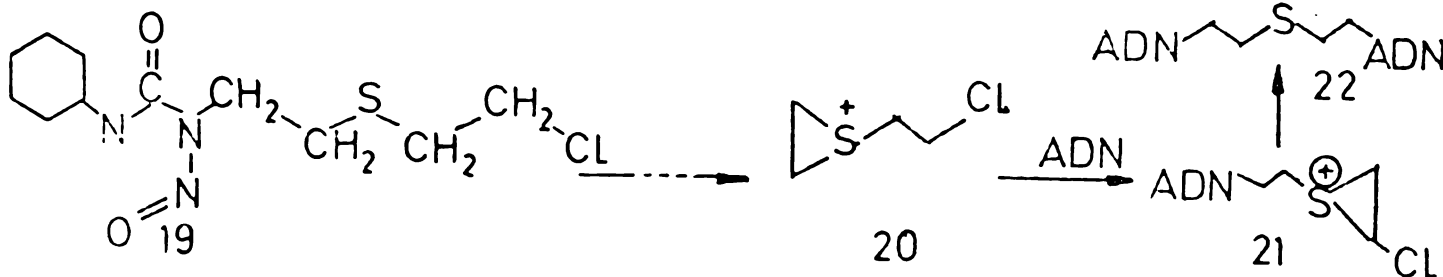
3) Nitrozoureele aromatice, sintetizate în vederea obținerii unor compuși mai liposolubili decât BCNU și în consecință mai eficienți în străbaterea barierii hemato-encefalice. Din păcate, N-NU aromatice s-au dovedit toxice și inactive (chiar și atunci când R este un amino acid aromatic /46/).

4) Nitrozoureele heterociclice. Deși numărul de compuși sintetizați este destul de redus, această subclasă a furnizat un reprezentant, intrat în testare clinică, și anume PCNU (8) /50/. Legarea funcțiunii NU la diverși heterociclii, a permis evidențierea unor efecte electronice interesante. Astfel, activitatea antileucemică neașteptat de scăzută a compusului 18 ar putea fi atribuită unor efecte de activare,



datorate celor două grupări SO₂ adiacente grupării metilen, de care este legată funcțiunea ureidică, efectul steric neputînd fi incriminat /27/.

Din a doua categorie fac parte unii compuși recent sintetizați în vederea exploatării mecanismului de alchilare în două trepte a ADN de către N-NU. În acest scop s-au sintetizat compuși de tipul 19, care prin descompunere ar putea pune în libertate grupări alchilante ca, 20 (vezi cap.V.).

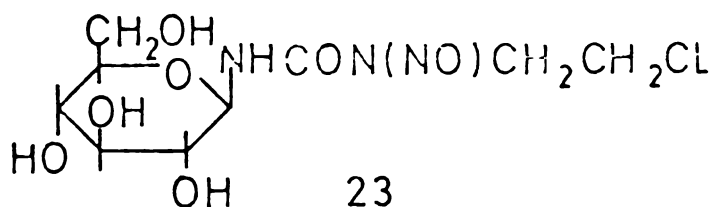


Activitatea acestor compuși este în curs de evaluare /51/.

Concepția actuală a evoluat către grefarea grupării N-nitrozoureidice pe molecule transportoare ce manifestă tropism față de anumite tipuri de celule tumorale. Din această categorie fac parte :

1) Glicozil nitrozoureele. Această subclasă bogată cuprinde :

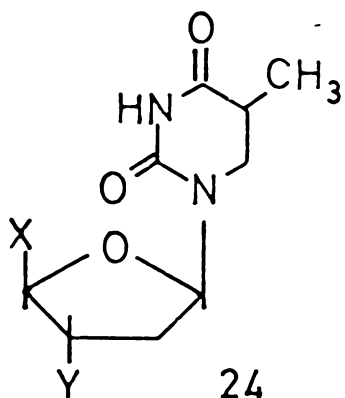
- derivați de D-glucopiranoză (Clorozotocina, 5, GANU, 23) /30,35,52,53/;



- derivați de D-galacto, β D-mano- și β D-xilo-piranozil amine /54/;
- derivați de D-riboză cu structuri piranozice și furanozice, avînd grupările HO libere sau blocate (din această serie face parte RFCNU, 7, în curs de testare clinică)/37/;
- derivați dizanaridici (β maltoză, β lactoză, β celobioză) /55/.

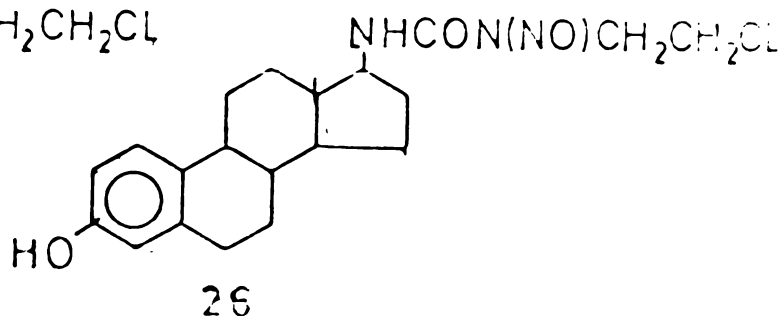
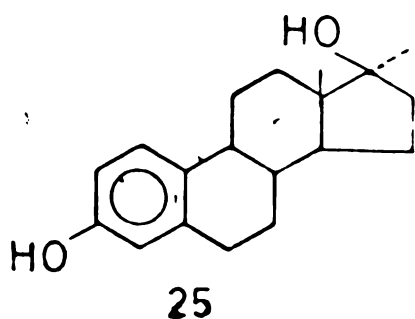
Este important faptul că toxicitatea hematopoietică a glicozil nitrozoureelelor este mai redusă decît a altor subclase de nitrozouree /35/.

Studii preliminare indică că restul nucleozidic este un bun transportor al grupării N-NU. Este interesant de subliniat că activitatea antitumorală a unor derivați de timidină este dependentă de poziția funcțiunii NU, compușii 3'-NU fiind mai activi decît analogii 5', 24 /56/.

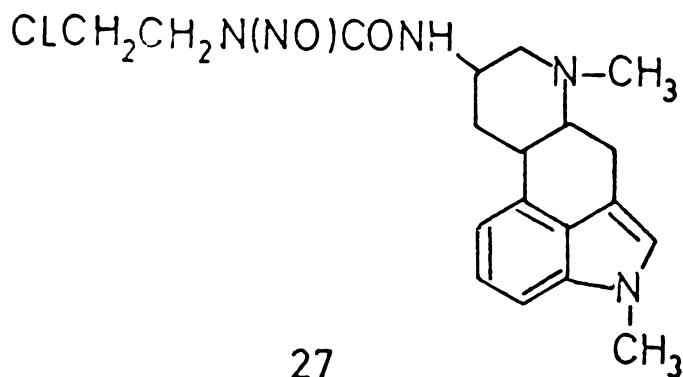


X	Y
$\text{CH}_2\text{NHCON}(\text{NO})\text{CH}_3$	OH
$\text{CH}_2\text{NHCON}(\text{NO})(\text{CH}_2)\text{Cl}$	OH
OH	$\text{NHCON}(\text{NO})\text{CH}_3$
OH	$\text{NHCON}(\text{NO})(\text{CH}_2)\text{Cl}$

2) Nitrozouree steroidice au fost sintetizate relativ recent în scopul obținerii unor compuși activi în cancerule hormonodependente, ale glandei mamare, 25,26, și capabile de interacțiune cu receptorii estrogenici /57/.



3) Derivați de ergolină de asemenea foarte recent apăruti s-au realizat în dorința de a îmbina proprietățile alchilante ale N-NU cu cele de inhibitori ai prolactinei ale transportorului. Compușii rezultați, 27, manifestă o activitate antileucemică (L 1210, P 338) remarcabilă dar sînt slabi inhibitori ai prolactinei /58/.



IV. Relații calitative structură chimică - activitate biologică în clasa N-nitrozoureeilor

Relațiile structură-activitate reprezintă una dintre puținele metode utilizabile astăzi în încercările de abordare rațională a proiectării de noi compuși biologic activi. Acest procedeu și-a dovedit utilitatea în găsirea unor N-NU cu proprietăți farmacologice superioare și se bazează pe o evaluare pe cât posibil standardizată atât a proprietăților biologice cât și a unor parametrii fizico-chimici selecționați, ai compușilor investigați.

Derivații de N-NU manifestă o activitate cu totul ieșită din comun față de leucemiile experimentale (ex. L 1210, P 338, etc.). Evaluarea lor (la National Screening Center-NSC-SUA), într-o etapă inițială (1959-1962) față de leucemia L 1210 (10^5 celule implantate intraperitoneal - vezi tabel 6) a reliefat două elemente importante și anume: 1) superioritatea activității biologice a N-NU față de ceilalți derivați înrudiți; 2) creșterea remarcabilă a activității antitumorale produsă de atașarea unui rest 2-haloetil la atomul de azot purtător de grupare nitrozo. Trebuie menționat că N-(2-haloetil)-N-nitrozoureele

sînt superioare N-metil derivaților corespunzători și din punct de vedere al unor efecte secundare (ex.streptozotocina, 4, este diabetogenă, pe cînd clorozotocina 5 nu prezintă acest inconvenient /59/).

Tabel 6

Activitatea N-nitrozo derivaților față de leucemia L 1210 /59/

$$R_1 - \underset{\substack{| \\ NO}}{N} - R_2$$

Clase de N-nitrozo derivați	Reprezentanți		CTS% ⁽¹⁾	Ref.
	R ₁	R ₂		
N-nitrozo guanidine	CH ₃	C(NH)NHNO ₂	30	23,60
	CH ₂ CH ₂ Cl	C(NH)NHNO ₂	189	
N-nitrozouree	CH ₃	CONH ₂	109	25,26, 27
	CH ₃	CONHCH ₃	61	
	CH ₂ CH ₂ Cl	CONHR'	vindecări	
		R'-alchil, cicloalchil, heterociclii, etc.		
N-nitrozo amide	CH ₃	COR'	inactiv	23
	CH ₂ CH ₂ Cl	COR'	inactiv	
N-nitrozo uretani	CH ₂ CH ₂ Cl	COOR'	inactiv	61
N-nitrozotiouree și tioamide	CH ₃	CSNHCH ₃	inactiv	62
	CH ₃	SOOR'	inactiv	
	CH ₂ CH ₂ Cl	SO ₂ C ₆ H ₄ CH ₃	inactiv	

1) CTS% - creșterea timpului de supraviețuire

$CTS\% = \left(\frac{T}{C} - 1\right)100$ T = durata supraviețuire animale purtătoare de tumori

C = idem martori

Aceste constatări au stimulat sinteza unui număr mare de N-NU, 1-(2-haloetil)-3-substituite, ceea ce a permis (pe un lot mare de congeneri) precizarea condițiilor structurale necesare unei activități anti-leucemice optime, și anume: a) natură halogenului grupării 2-haloetil;

- b) natura izomerului N-nitrozo obținut în cursul reacției de nitrozare;
 c) natura radicalului legat la atomul de azot nenitrozat (N_3).

a) natura halogenului grupării 2-haloetil. Sînt activi derivații în care halogenul este F sau Cl, cei bromurați sau iodurați fiind inactivi. Activitatea remarcabilă a 2-fluoroetil nitrozoureeilor ridică probleme teoretice extrem de interesante și neașteptate dată fiind stabilitatea legăturii C-F și faptul că azotiperitele fluorurate sînt inactiv /59/ (tabel 7)

Tabel 7

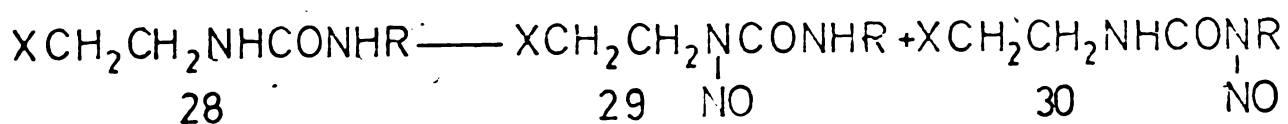
Activitatea unor derivați de 1-(2-haloetil)-1-nitrozouree față de leucemia L 1210 /59/

		$XCH_2CH_2NCONHR$ NO	
X	R	L 1210 % ⁽¹⁾	
		I_p (10^5 celule) ⁽²⁾	I_c (10^4 celule) ⁽³⁾
F	CH_2CH_2F	(50-60) ⁽⁴⁾	(60)
Cl	CH_2CH_2Cl (BCNU)	0 - 100	0 - 100
Br	CH_2CH_2Br	(100)	0
I	CH_2CH_2I	inactiv	inactiv
F	ciclohexil	10-90	60-100
Cl	ciclohexil (CCNU)	80-100	20-100
Br	ciclohexil	(30)	0
F	2-norbornil	(90-100)	80-90
Cl	2-norbornil	(100)	80-90

1) rezultatele sînt exprimate în % vindecări; 2) I_p = administrare intraperitoneală; 3) I_c = administrare intracerebrală; 4) parantezele indică o singură determinare.

Modificări de orice natură ale restului 2-cloroetil conduc la compusi considerabil mai puțin activi /61/.

b) natura izomerului N-NO obținut prin sinteză. Din reacția de nitrozare ce constituie, de obicei, etapa finală a sintezei acestor derivați, pot rezulta ambii izomeri (atât 1N-NO, 29, cât și 3N-NO, 30).



Datele biologice atestă în toate cazurile cunoscute, superioritatea netă a izomerilor 1N-NO față de cei 3N-NO în ceea ce privește activitatea antitumorală. Asupra importanței biologice relative a celor doi izomeri, vom reveni (vezi cap. XVI.)

c) natura radicalului legat de atomul de azot nenitrozat (N₂), pare să condiționeze atât spectrul activității antitumorale al compusului respectiv cât și toxicitatea sa sistemică. Condițiile structurale impuse radicalului R, necesare manifestării unei activități antileucemice sînt:

- 1) cei mai activi sînt compușii pentru care R este un ciclu ciclohexanic mai ales cei 4-trans substituiți. Activitatea biologică a acestor compuși depinde atât de stereochemia restului ciclohexil cât și de natura substituentului (ex. 4-trans-MeCCNU este mult mai activ decît izomerul cis, și timp ce în cazul 4-HOOC-CCNU, ambii izomeri sînt la fel de activi) /26/;
- 2) înlocuirea unuia sau mai multor atomi de carbon din inelul ciclohexanic prin heteroatomi (N,S,O) nu modifică semnificativ activitatea antileucemică, dar introducerea unei nesaturări, în restul ciclohexanic, conduce la compusi inactivi /26,59/. În aceeași categorie de fapte trebuie menționat că, prezența unui rest R zahar asigură nu numai o activitate biologică interesantă dar și o diminuare a toxicității sistemice; 3) compușii pentru care R este un ciclu de 5-6 atomi sînt mult mai activi decît analogii cu catenă lineară; 4) pentru R aromatic se obțin în general compusi mai puțin activi decît cei aliciclici. Sînt descriși, totuși, unii derivați aromatici heterociclici cu o activitate remarcabilă (de ex. PCNU, 82 /50/

44640/132-

V. Descompunerea 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureeleor

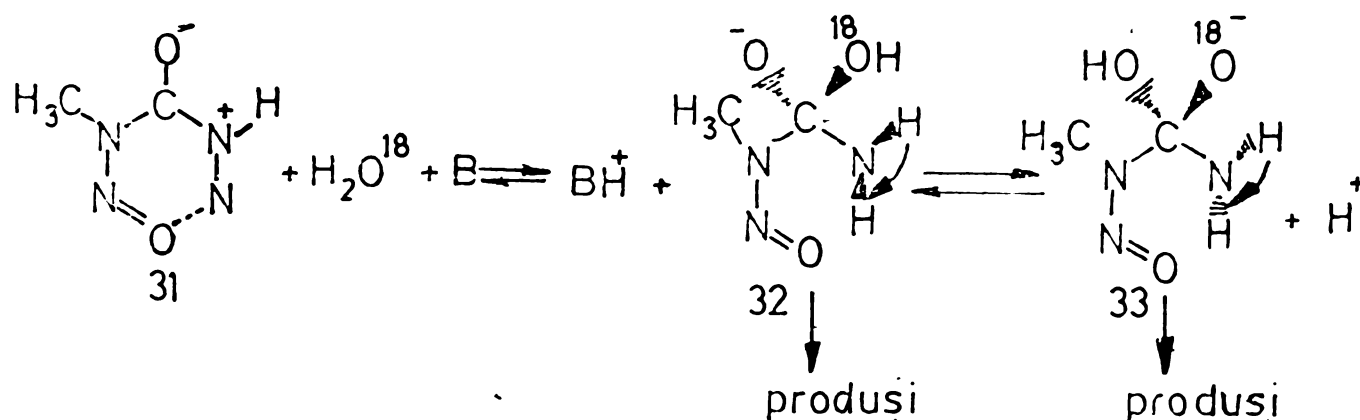
Se admite că 2-cloretil nitrozoureele sînt forme de transport eficiente ale unor intermediari activi, alchilanți și/sau carbamoi - lanți, responsabili de efectele lor biologice /12,61,62/. Din acest motiv cunoașterea mecanismului lor de descompunere în soluții apoase și identificarea intermediarilor și produșilor ce apar în cursul acestui proces prezintă un interes deosebit.

V.1. Descompunerea derivaților de N-nitrozoureee în soluții apoase.

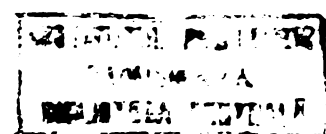
Studiul descompunerii derivaților mono, 1,3-di și trisubstituiți de N-nitrozoureee în soluții apoase a condus la următoarele concluzii:

a) în mediu acid, descompunerea se produce atât prin denitrozare cît și prin hidroliză. Etapa cheie a reacției de denitrozare constă într-un transfer lent de proton. În cazul N-metil-N-nitrozoureei produșii de hidroliză sînt metilamina, N_2 și CO_2 iar cei de denitrozare metiluree și acid azotos /63,64/;

b) reacția de descompunere catalizată de baze decurge, aparent, printr-un intermediar tetraedric (postulat pe baza schimbului izotopic dintre H_2O^{18} și oxigenul funcțiunii carbonil). Hidroliza N-metil-N-nitrozoureee duce la: metanol și derivați ai acidului carbamic, uree, cianați, carbamați și carbonați /65/;



c) reacții necatalitice. Există un domeniu de pH în care viteza de descompunere a ureelor substituie nu depinde de concentrația de



acid sau bază prezentă. Studiul acestei reacții în medii neapoase /12,66/ sau apoase a dus la presupunerea că în acest ultim caz etapa determinantă de viteză este reacția unei molecule de apă cu centrul carbonilic al N-nitrozoureei, cu formarea unui intermediar ciclic ce se descompune apoi cu eliberarea produsilor de reacție /65/.

V.2. Descompunerea derivaților de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree în soluții apoase, decurge rapid, viteza de reacție (exprimată ca $T_{0,5}$) fiind foarte dependentă de pH și de natura agentului nucleofil existent în mediul de reacție /12/.

V.2.1. Natura produsilor rezultați în urma descompunerii în medii apoase (tamponate sau netamponate) a 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureeilor.

În acord cu datele cunoscute privind descompunerea derivaților de N-nitrozouree, era de așteptat ca descompunerea 2-cloretil nitrozoureeilor în medii apoase să conducă la 2-cloroetanol, uree 1,3 disubstituită simetrică, azot și bioxid de carbon. Identificarea în mod surprinzător, în cazul BCNU, CCNU, etc. și în funcție de condițiile de lucru a acetaldehide printre produșii de descompunere, a făcut ca modul lor de degradare să fie considerat drept "anormal" /12,61/. Astfel descompunerea în soluții apoase pH 7,0 a BCNU- C^{14} marcat la resturile etilenice (studiată prin GLC-SM), a furnizat ca produși volatili: clorură de vinil, dicloretan, acetaldehidă și 2-cloroetanolul, reprezentând circa 0,5 moli/mol BCNU descompus /67/.

Studiul GLC-SM al produsilor volatili obținuți prin descompunerea CCNU în tampon fosfat (pH 7,3; 3 ore), evidențiază formarea preferențială a 2-cloroetanolului (20-25%) /68/.

V.2.2. Mecanismul descompunerii derivaților de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree. Diversitatea produsilor rezultați în urma descompunerii N-NU, cât și faptul că nu întotdeauna bilanțul acestora este cantitativ, face ca interpretarea datelor obținute, sub forma unui mecanism concret de reacție, să fie dificilă. Prezența grupării 2-cloretil complică și mai

mult mecanismul acestei reacții. Fără a se considera rezolvată problema în mod definitiv au fost propuse trei căi, plauzibile, privind descompunerea acestor compuși, și anume :

- calea A - cu eliberare de carbocationi vinilici /12,67-69/
- calea B - cu eliberare de carbocationi 2-cloretilici /12,61,68/
- calea C - cu formarea unei 1,2,3-oxadiazolidine intermediare/69/.

Calea A. Descompunerea via carbocation vinilic, constă în extragerea protonului de la atomul de azot nenitrozat, urmată de atacul anionului astfel format, la atomul de carbon (electropozitivizat prin vecinătatea atomului de clor) /12/. Se formează astfel, prin eliminarea ionului de Cl, o oxazolidină, 36, instabilă, care se descompune spontan în etilendiazohidroxid, 40, și izocianat, 38. Primul, prin eliminare de azot, conduce la carbocationul vinilic, 46, din care poate rezulta acetaldehida, 42 (schema 2) /61,62,68/.

- schema 2 -

În favoarea acestui mecanism de descompunere (cronologic primul propus) s-au adus cel puțin trei argumente :

1) identificarea constantă a acetaldehidei printre produșii de descompunere ai 2-cloretil nitrozoureeilor, rezultate prin transpoziția enolului, 49 /68/;

2) cinetica de descompunere corespunzătoare acestei scheme, coincide cu cea obținută prin titrarea ionului clor /12,61/ ;

3) identificarea, prin GC-SM a brometenei, 50, atunci când descompunerea are loc în mediu saturat cu bromură de sodiu. Aceasta, 50, provine, evident, din carbocationul vinilic, 46 /68,69/.

Calea B. Descompunerea via carbocationul 2-cloretil, are loc consecutiv extragerii unui proton de la atomul de azot nenitrozat (de către o bază), cu formarea directă a 2-cloretil diazohidroxidului, 37 și izocianatului 38. Primul prin pierderea unei molecule de azot, conduce

spontan la carbocationul 2-cloroetil, 45. Acesta reacționează mai departe fie ca atare, fie sub forma unui ion neclasic de cloroni, 47, astfel putându-se explica proveniența tuturor produșilor de descompunere evidențiați (schema 2) /68,70/.

Argumente în favoarea acestui mecanism :

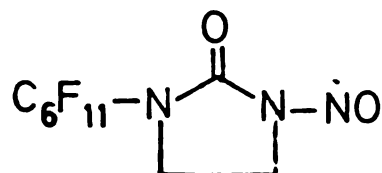
1) toți produșii de reacție identificați pînă în prezent sînt compatibili cu această schemă /68/ ;

2) traparea carbocationului 2-cloroetil cu agenți nucleofili (ioni halogenură) și identificarea (GC-SM) a 1,2-dihalogenoetanilor corespunzători, 53 /68/;

3) studiul (GC-SM) comparativ al produșilor de descompunere (37° tampon fosfat, pH 7,4) ai BCNU-deuterat fie la restul 2-cloroetil legat de atomul de azot nenitrozat, fie la restul 2-cloroetil legat la atomul de azot nitrozat. Repartizarea deuteriului în produșii de descompunere este consistentă cu formarea intermediară a carbocationului 2-cloroetil, care reacționează în continuare conform schemei 2 /70/.

Calea C, care decurge prin intermediul 1,2,3-oxadiazolidinei, 39, a fost postulată de curînd spre a explica dependența de pH a formării acetaldehidei (schema 2) /69/.

Totuși, deoarece datele comparative privind descompunerea acestor derivați lipsesc aproape cu desăvîrșire, doar BCNU și CCNU fiind studiați sub acest aspect, mecanismele discutate pot avea un caracter limitat. Pare probabil ca mecanismul de descompunere adoptat să fie dependent atît de natura radicalului R cît și de condițiile de reacție. Acest lucru este demonstrat de descompunerea analogului decafluorociclohexil (FCCNU) al CCNU care în tampon fosfat (pH 7) formează printr-o eliminare intramoleculară a clorului 1-(decafluorociclohexil)-3-nitrozoimidazolidin-2-onă 54 /71/.



În ceea ce privește soarta izocianatului, 38, acesta poate suferi o hidroxidecarboxilare cu formare de amine, 56, care cu izocianatul ne-transformat conduc la derivați de uree 1,3-disubstituiți simetrici, 57. În prezența unei amine exogene, 58, izocianatul reacționează cu aceasta înainte de a suferi hidroxidecarboxilare, conducând la derivați de uree 1,3-disubstituiți asimetrici 59 (schema 3). Aceste reacții sînt susținute de rezultate experimentale /12/.

- schema 3 -

VI. Metabolizarea 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureeilor

Studiile efectuate în vederea elucidării mecanismului de acțiune al N-NU au relevat încă de la început o serie de caracteristici puțin obișnuite, și anume :

a) faptul că N-NU constituie, probabil, forme de transport eficiente ale unor intermediari reactivi (vezi cap.V) ;

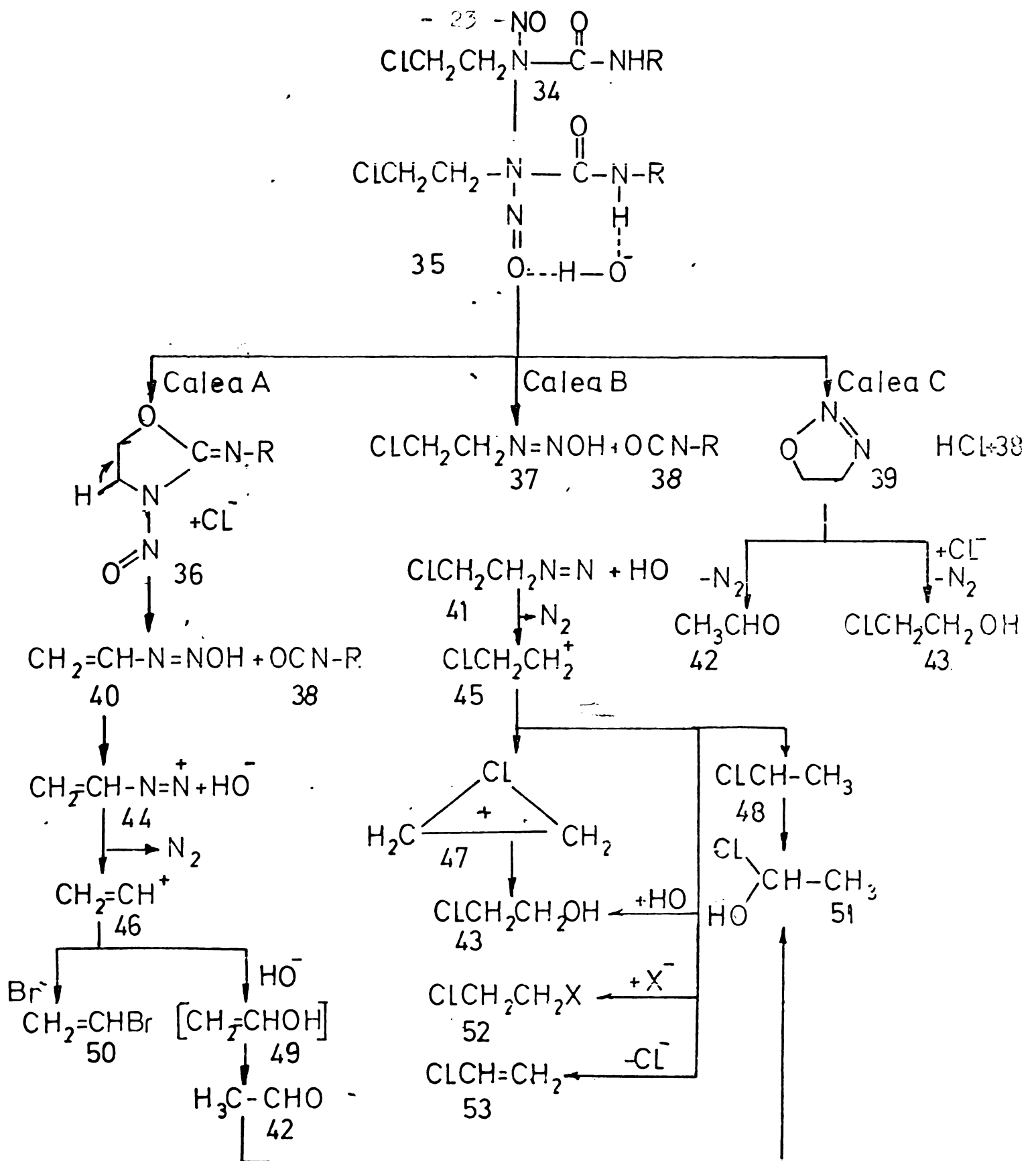
b) aceștia sînt capabili să interacționeze cu macromoleculele celulare (proteine, acizi nucleici) producînd, în funcție de doză, fie efecte letale, fie întîrzierea mitozei celulelor;

c) N-NU manifestă activitate ridicată față de leucemia L 1210 ip și ic ;

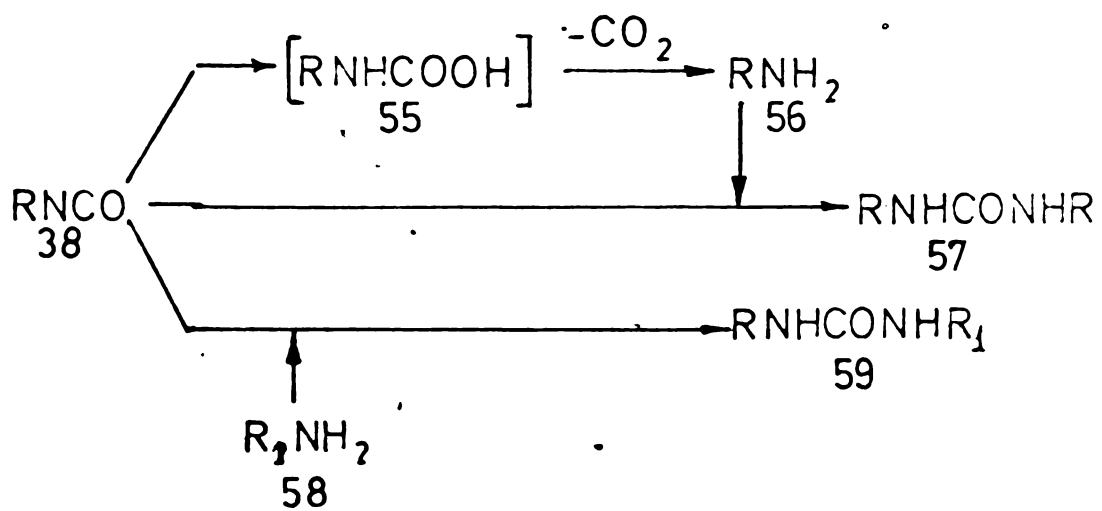
d) N-NU posedă capacitatea de a străbate bariera sînge-cereier.

Un prim element important al farmacocineticii acestor derivați îl constituie timpurile de înjumătățire chimice și biologice (tabel 8) /72-75/.

Folosirea N-NU marcate atât în restul 2-cloretil cît și în radicalul R, a arătat că răspîndirea produsilor de descompunere în plasmă și lichidul cerebrospinal (LCS) este promptă și decurge după cinetici asemănătoare /72/. Astfel, în cazul CCNU, radioactivitatea restului ciclohexil se acumulează preferențial în plasmă (plasmă:LCS/2;1), iar cea da-



Schema 2



Schema 3

torată restului 2-cloretii în LCS (plasmă: LCS/1:3). În ambele fluide, concentrația maximă se atinge, indiferent de modul de administrare, după circa 0,5 ore și se menține timp îndelungat (36-48 ore) /72/.

Tabel 8

Timpurile de înjumătățire ($T_{0,5}$) chimice și biologice ale unor nitrozouree folosite în clinică /72/

$T_{0,5}$ compus	Durata (min)		
	BCNU	CCNU	MeCCNU
biologic ⁽¹⁾	15-30	94	-
chimic ⁽²⁾			
șoareci	5	6	5
câini	5	15	-
maimuțe	5	15	-
om	ND ⁽³⁾	ND	ND

1) estimat prin numărul de celule omorâte în vivo; 2) estimat prin determinarea concentrației moleculelor intacte în plasmă; 3) nu s-a detectat moleculă intactă în plasmă.

Excreția se face în special prin rinichi, cea biliară și reabsorbția intestinală având totuși un rol important /72,76,77/. Producții de degradare identificați în cazul CCNU-ciclohexil C^{14} sînt: ciclohexil amina, 1,3-diciclohexil ureea și CO_2 ; pentru CCNU-etilen C^{14} mai mult de 60% din radioactivitatea totală se detectează în urină (circa 50% sub formă de tioli alchilați, rezultați prin reacția directă dintre tioli și carbocationul 2-cloretii sau produsii săi de reacție 2-cloro-etanolul, acetaldehida, etc.) /75,76/. Rezultate asemănătoare se obțin și în cazul MeCCNU /78/.

În afara descompunerii neenzimatice a N-NU, acestea suferă simultan și o degradare sub influența enzimelor microzomale. Aceste bio-

transformări sînt puțin cunoscute și depind de natura radicalului atașat la atomul de azot nenitrozat. S-a stabilit că atât CCNU cît și MeCCNU suferă o hidroxilare rapidă la inelul ciclohexanic (citocrom P-450 dependentă, sub acțiunea microzomilor hepatici, înainte de hidroliza restului nitrozouree /79/. Cinci din cei șase izomeri hidroxilați ai CCNU, teoretic posibili, au fost identificați la șobolani și numai doi la om (4-cis și trans HO-CCNU) /48,80,81/. Acest aspect a fost studiat printr-o metodă extrem de elegantă (metabolic switching). Folosindu-se CCNU complet deuterat la inelul ciclohexanic (CCNU-d11) s-a arătat posibilitatea influențării hidroxilării microzomiale prin înlocuirea H cu D /49/. Nu este sigur dacă hidroxilarea CCNU este însă determinantă pentru activitatea sa antileucemică /49,82/. BCNU poate de asemenea constitui un substrat pentru enzimele microzomale (mai ales cele hepatice), care produc denitrozarea sa, cu formarea 1,3-bis(2-cloretil)uree, printr-un mecanism încă nelămurit /72,83/. Rezultă deci, că sub acțiunea enzimelor microzomiale unele nitrozouree sînt dezactivate (de ex. BCNU), în timp ce altele pot fi transformate în compuși aparent mai activi (de ex. CCNU).

- Datele rezultate din studiile de metabolizare ale 2-cloretil nitrozoureelelor (efectuate în special cu BCNU, CCNU și MeCCNU marcate) au arătat

- o rapidă absorbție, distribuție și metabolizare a acestora, mediată parțial prin enzimele microzomiale;

- reținerea preferențială de către proteinele plasmatică a radioactivității legate de radicalul R (ciclohexil, Me-ciclohexil, etc.), și de către ADN a celei legate de restul 2-cloretil;

- capacitatea restului 2-cloretil sau a produsilor săi de degradare de a străbate bariera sînge-creier;

- persistența îndelungată în fluidele circulante (plasmă, LCS) a produsilor de descompunere ai N-NU, ceea ce ar putea constitui o explicație și pentru fenomenele de toxicitate tardivă constatate (trombopenii tardive, etc.) /72,76,78/.

VII. Mecanismul de acțiune la nivel molecular al 1-(2-clor- etil)-1-nitrozourelor

Așa cum s-a arătat, intermediarii rezultați în urma descompunerii, neenzimatice sau enzimătice, a derivaților de N-NU, pot reacționa ulterior atât prin carbamoilarea cât și prin alchilarea macromoleculelor celulare. Nu s-a reușit încă precizarea structurii intermediarului responsabil de efectul antitumoral, care de altfel poate sau nu să fie diferit de cel care produce efectele toxice.

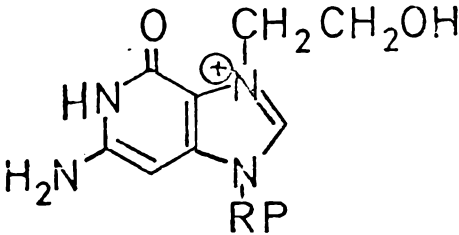
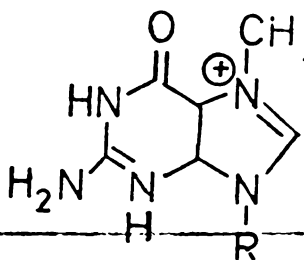
O primă categorie de fapte pentru lămurirea acestei probleme, este furnizată de studiile, efectuate in vitro și in vivo, privind interacțiunea N-NU cu macromoleculele celulare. Se constată o legare preferențială de proteine (în special de polilizină) a radicalului greșat la atomul de azot nenitrozat. Radicalul 2-cloretil reacționează în proporții egale, dar în cantitate semnificativ mai scăzută, atât cu acizii nucleici (AN) cât și cu proteinele /84/.

Coroborate cu proprietățile biologice ale N-NU (vezi cap. I și cap. II) datele de mai sus sugerează ipoteza că alchilarea, aproape unanim acceptată, a ADN-ului ar putea fi responsabilă de acțiunea lor antitumorală /85/. Primele argumente în sprijinul unui astfel de mecanism au fost aduse de studiul interacțiunii BCNU și BFNU cu poliribonucleotidele și ribonucleotidele sintetice, studiu care a pus în evidență situsurile probabile și posibile de alchilare a ADN (tabel 9) /86-89/.

Conform ipotezei recent formulate de Kohn /90-95/, reacția N-NU cu ADN are loc cu formarea de legături încrucișate (cross-linking) responsabile pentru efectul letal astfel indus. Acest efect a fost demonstrat în cazul culturilor celulare, o caracteristică a inducerii de legături încrucișate fiind faptul că acest proces are loc relativ lent și continuă chiar după îndepărtarea drogului din mediu. Se consideră că acest fenomen are loc în două etape. Prima constă în reacția rapidă a carbocationului 2-cloretil cu centrul O₆ din guanină. Cea de a doua

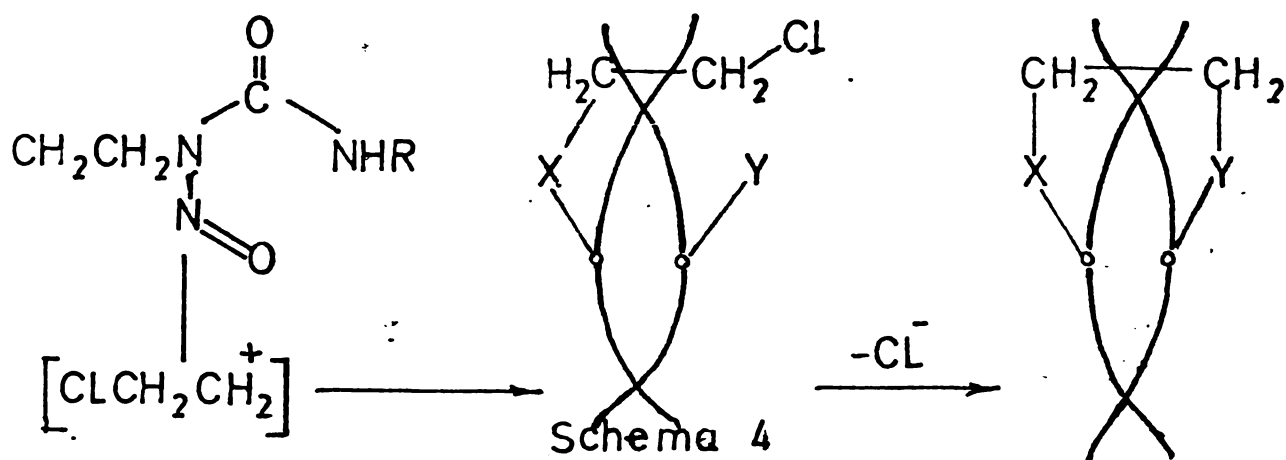
Tabel 9

Produsii de alchilare obtinuti "in vitro"
cu N-(2-haloetil)-N-nitrozouree /89/

N-NU	Material tratat	Produse de alchilare
	poli C	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \text{NH} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \\ \text{N} \\ \text{RP} \end{array}$ $\text{H}_2\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C-N} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \\ \text{N} \\ \text{RP} \end{array}$
BCNU	poli G	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 
	poli A și poli U	reacție foarte slabă
	guanină	} produși de cross-linking
	guanină + citidina	
	citidină	$\text{XH}_2\text{CH}_2\text{C-N} \begin{array}{c} \text{NH} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \\ \text{N} \\ \text{R} \end{array}$ $\text{H}_2\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C-N} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \\ \text{N} \\ \text{R} \end{array}$
BFNU	guanină	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$ 
		X=F, OH
BCNU, BFNU	adenină	$\text{XH}_2\text{CH}_2\text{C-N} \begin{array}{c} \text{NH} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{N} \\ \text{N} \\ \text{N} \\ \text{R} \end{array}$ $\text{H}_2\text{C} \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C-N} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{N} \\ \text{N} \\ \text{N} \\ \text{R} \end{array}$
		X=Cl, F, HO

etapă, lentă, implică alchilarea (printr-un mecanism $\text{S}_{\text{N}}2$) a unei baze de pe lanțul vecin, probabil a citozinei la N_4 , cu eliminarea simultană

a Cl^- . Alchilarea citozinei nu are loc în prima etapă din cauza implicării acestei poziții în edificiul legăturilor de H al ADN-ului /90/. Este foarte probabil că prin 2-cloroetilarea guaninei la O_6 să se producă o distorsiune a moleculei de ADN ceea ce ar permite scoaterea din acest edificiu a funcțiunii N-4 a moleculelor de citozină adiacente făcându-le astfel accesibile din punct de vedere steric /90,96/. Viteza redusă cu care are loc alchilarea grupării N-4 poate fi explicată prin nucleofilitatea scăzută a acestei funcțiuni /90/ (schema 4).



Au fost puse în evidență în urma interacțiunii ADN+N-NU și alte tipuri de leziuni și anume: legături încrucișate ADN-proteine (sensibile la proteinaza K), rupturi monocatenare, etc. /91/.

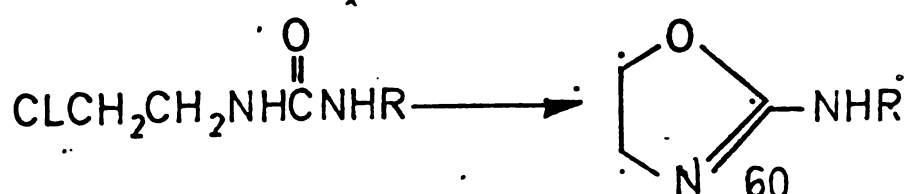
Deși capacitatea N-NU de a produce legături încrucișate la nivelul ADN, reprezintă o posibilitate atractivă de explicare a activităților lor antitumorale, nu este însă imposibil ca interacțiunea lor cu ARN și/sau cu proteinele (nucleare sau citoplasmatic), să fie responsabile, cel puțin parțial, de această proprietate /97/.

Izocianații reprezintă cel de al doilea produs major de descompunere al N-NU, structura lor depinzând de natura radicalului de la atomul de azot nenitrozat. În funcție de reactivitatea izocianatului rezultat N-nitrozoureele corespunzătoare pot fi puternic sau slab carbamoylante /97/. Acțiunea lor se manifestă de preferință la nivelul aminoacizilor, peptidelor și proteinelor (tabel 10).

Locurile unde se poate produce carbamoilarea amino-
scizilor, peptidelor și proteinelor /97/

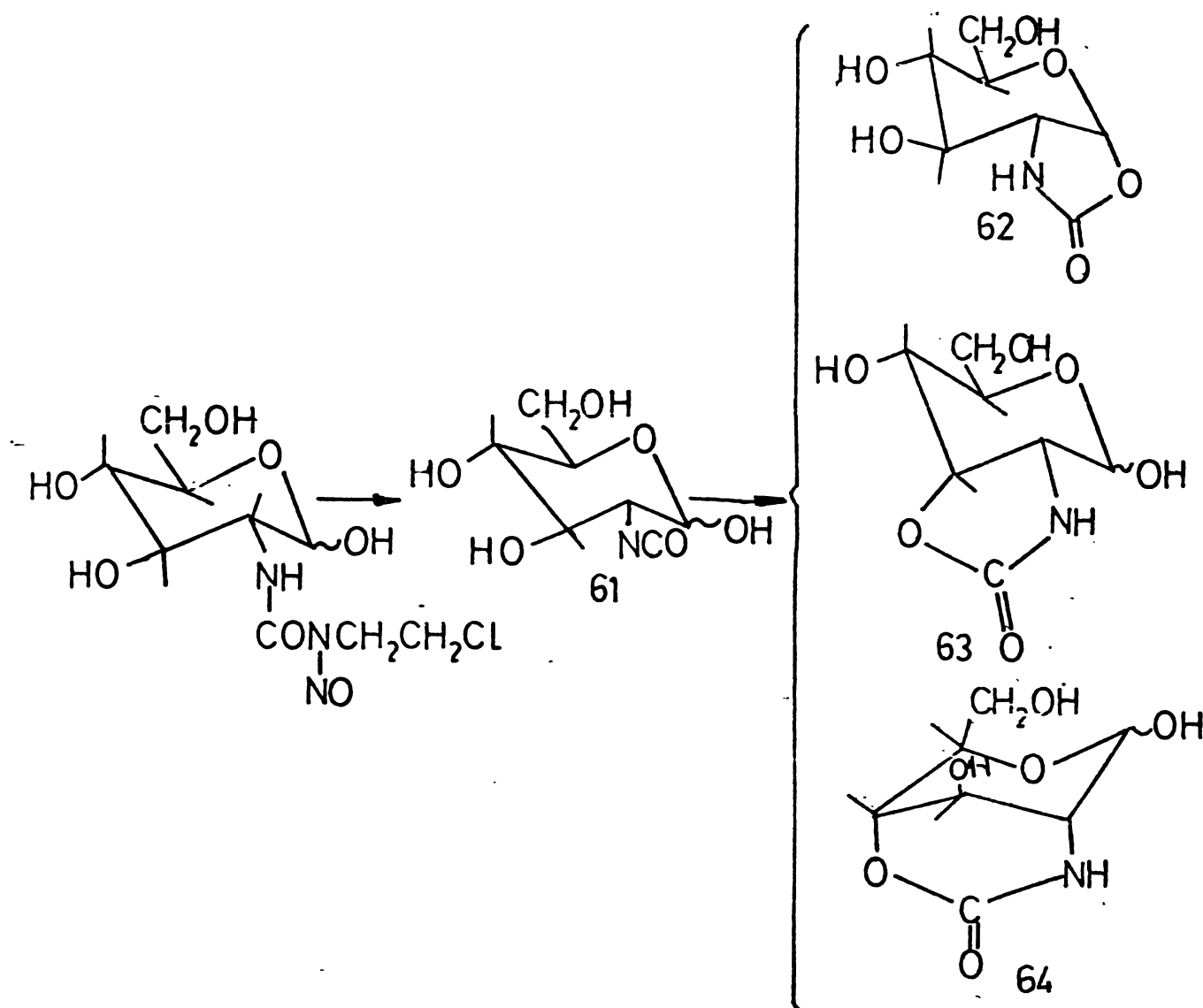
- grupările α amino din α amino acizi
- grupările α și ϵ amino din lisina
- grupările aminoterminale din peptide și proteine
- grupările ϵ amino din resturile lizină ale peptidelor și proteinelor
- grupările tiolice, grupările OH

BCNU și CCNU manifestă o acțiune puternic carbamoilantă /98/. Izocianații rezultăți din descompunerea lor produc: inactivarea ADN-polimerazei II /99/; inhibiția specifică a ADN-ligazei /6,100/ modificarea proteinelor nucleare (în special a histonelor H_1 bogate în lizină și accesibile steric) /95/; inhibiția progresiei celulare de-a lungul întregului ciclu celular /85/; inhibiția biosintezei de ARN /101,102/ etc. Natura efectelor biochimice induse depinde în mare măsură de structura chimică a izocianaților. Un exemplu semnificativ îl constituie cazul BCNU, când carbamoilarea grupărilor amino, conduce la derivați de 2-cloretil uree, care în condiții fiziologice se ciclizează cu formarea unor oxazoline (60) /103/. Formarea unor astfel de oxazoline este imposibilă în cazul altor derivați de N-NU /103/.



Dat fiind că nu toate N-NU active sînt puternic carbamoilante se poate considera ca aceasta nu este direct legată de activitatea lor anti-tumorală. Majoritatea autorilor consideră procesul de carbamoilare responsabil de efectele toxice (sistemice) ale acestor derivați /19,98,104/.

Un argument în favoarea acestei teze ar fi toxicitatea mult mai scăzută a clórozotocinei în raport cu cea a CCNU (la doze comparabile), explicabilă prin posibilitatea carbamoilării intramoleculare a izocianatului 61, rezultat din descompunerea ei (schema 5).



Schema 5

Totuși acest argument nu are valoare absolută, cu atât mai mult cu cât s-a arătat în trialuri clinice recente că clórozotocina posedă totuși proprietăți mielosupresive /41/. Astfel semnificația biologică a activității carbamoilante rămâne controversată.

VIII. Relații cantitative structură chimică - activitate biologică (QSAR) în clasa 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureeilor

Stabilirea unor relații cantitative structură - activitate, în clasa N-NU, constituie o etapă importantă în dezvoltarea acestui domeniu. Pentru cazul particular al N-NU, o dificultate suplimentară provine din faptul că mecanismul lor de acțiune nefiind încă elucidat, parametrii folosiți pentru calcularea unor astfel de relații s-ar putea să nu fie cei mai semnificativi.

VIII.1. Parametrii fizico-chimici și biologici utilizați în clasa N-NU pentru corelări QSAR sînt următorii :

a) parametrii fizico-chimici :

- timpul de înjumătățire ($T_{0,5}$ min.) exprimă viteza de descompunere, în condiții fiziologice (tampon fosfat, pH 7,4 și 37°). Acest parametru este invers proporțional cu constanta vitezei de descompunere a N-NU măsurată în aceleași condiții /5,105/.

- liposolubilitatea (log P), sau logaritmul coeficientului de partiție (P) în sistemul octanol-apă, este o măsură relativă a caracterului hidrofil sau hidrofob al substanței considerate /31,106/.

- activitatea alchilantă (A) determinată față de p-nitro-benzil-piridina (NBP) în condiții aproximativ fiziologice, exprimă electrofilia carbocationilor puși în libertate în cursul hidrolizei acestor compuși /4,5,105,106/.

- activitatea carbamoilantă (Ca), măsoară capacitatea restului izocianat eliberat în cursul hidrolizei de a carbamoiila lizina /5,107/.

b) parametrii biologici :

- activitatea anticanceroasă, față de tumori experimentale cu creștere rapidă (leucemie L 1210, P 388) sau lentă (melanom B16, tumoră pulmonară Lewis, etc.) se exprimă prin logaritmul inversului concentrației ce produce un efect antitumoral standard (definit sub forma creșterii

timpului de supraviețuire - CTS%- sau prin indici terapeutici ED 99, ED 50, ED 99/ED 50, etc.).

- toxicitate acută exprimată prin log 1/C (C - concentrația echivalentă dozei letale 10% - DL10).

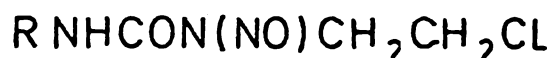
Corelarea matematică a parametrilor fizico-chimici cu cei biologici s-a făcut cu ajutorul unor ecuații liniare sau multiliniare de regresie sau prin ecuații parabolice.

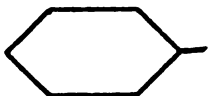
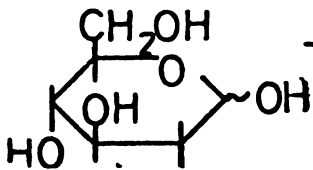
VIII.2. Corelarea activității biologice cu parametrii fizico-chimici. Clasa N-nitrozoureelor reprezintă un exemplu tipic de domeniu în care considerații de acest gen, la prima vedere destul de abstracte, au dus la rezultate concrete. Concluziile studiilor întreprinse /46,105, 108/ pot fi rezumate astfel :

a) Modificarea substituentului atașat la atomul de azot nenitrozat, conduce la compuși cu proprietăți fizico-chimice și biologice care variază în limite foarte largi (tabel 10).

Tabel 10

Proprietățile fizico-chimice ale unor derivați de N-NU utilizați clinic sau aflați în faze înaintate de testare /97/



Compus	R	log P	%CCNU			DL10 mmoli/kg	CTS% L 1210
			T _{0,5}	A	Ca		
CNU	H		2	577	20	31	205
CCNU		2,83	100	100	100	121	364
BCNU	CH ₂ CH ₂ Cl	1,53	82	267	68	116	260
clorozotocina		-0,22	40	452	4	64	332

De exemplu, deși lipofilicitatea variază cu aproape 4 ordine de mărime între MeCCNU (puternic lipofil $\log P = 3,30$) și clorozotocină (hidrofilă cu $\log P = -0,22$), din punct de vedere al activității lor anticanceroase ele rămân comparabile. Deci acest parametru pare să influențeze mai curînd spectrul antitumoral al compuşilor discutați, decît activitatea lor ca atare.

b) între timpul de înjumătățire ($T_{0,5}$) și activitatea alchilantă există o proporționalitate inversă, fapt concordant cu mecanismul de descompunere postulat pentru N-NU /5/. Considerînd mecanismul de hidroliză al tuturor N-NU studiate ca fiind analog, este de așteptat ca să existe o proporționalitate directă între viteza de descompunere a acestora și cea de alchilare a NBP, dacă prima constituie etapa cinetic limitativă /31/.

c) $T_{0,5}$ este într-o relație de proporționalitate directă cu activitatea carbamoilantă, radicalii care contribuie la mărirea stabilității N-NU fiind și cei care generează izocianații cu cea mai mare afinitate față de lizină /5/.

d) nu s-au putut stabili corelații între $T_{0,5}$ și liposolubilitate, între activitatea alchilantă și cea carbamoilantă și între activitatea alchilantă și liposolubilitate /5/.

Dintre parametrii fizico-chimici, activitatea alchilantă și cea carbamoilantă par să influențeze în mod hotărîtor activitatea biologică /5/.

VIII.2.1. Importanța liposolubilității pentru proiectarea de noi compuși Abilitatea N-NU de a străbate bariera sînge-creier, constituie poate cea mai importantă proprietate a acestor compuși, care pot astfel distruge celulele leucemice cantonate intracerebral. În ciuda complexității fenomenelor de transport, ea poate fi legată de liposolubilitate, putîndu-se stabili în ultimă instanță relații cantitative (QSAR) între activitatea antileucemică și $\log P$ /31,46,107/. Valorile optime

ale liposolubilității calculate pe bază datelor obținute pe tumori experimentale (fie $\log P_o$), deși diferite de la autor la autor (tabel 11) sînt mult mai mici decît cele obținute pentru alte tipuri de compuși, farmacologic activi, capabili să străbată bariera hematoencefalică (de exp. $\log P_o$ pentru barbiturice este $\cong 2$) /109/.

Tabel 11

Limite optime de valori pentru $\log P$ în clasa N-NU

$\log P_o$	sistem testare	număr compuși	lit.
- 0,6	L 1210, șoareci	23	31
0,8	carcinom Lewis, șoareci	14	46
0,4	sarcom 9L ic., șobolani	6	108

Această discrepanță s-ar putea explica prin aceea că leucemia L 1210 ic nu constituie un model potrivit pentru un neoplasm cerebral, implicînd și procese infiltrative /108/. Faptul că clorozotocina este mult mai puțin activă decît CCNU, față de neoplaziile cerebrale, confirmă importanța acestui parametru /97/.

În orice caz trebuie menționat că liposolubilitățile optime calculate cu ajutorul relațiilor de tip QSAR pentru leucemii și tumori solide sînt destul de diferite /28,46/.

Sumarizînd rezultatele obținute, se pot preciza următoarele :

a) străbaterea barierei sînge-creier de către N-NU admite o liposolubilitate optimă între $3.0 \gg \log P_o \gg 0.0$;

b) compușii cu $\log P \gg 3.0$ sînt activi mai curînd față de tumorile solide de tipul carcinomului Lewis /28/;

c) compușii cu $\log P \ll 0.0$ sînt foarte activi față de leucemiile experimentale, dar străbat greu bariera hematoencefalică.

VIII.2.2. Corelarea activității antitumorale cu timpul de înjumătățire, activitatea alchilantă și cea carbamoilantă.

Excluzând liposolubilitatea, care nu este considerată un parametru independent, analiza de regresie pentru o serie de șase N-NU, arată că activitatea antileucemică a acestora nu se corelează semnificativ cu nici unul dintre parametri fizico-chimici considerați (ec. 1-3) /103/ :

$$\text{CTS\%} = 2,0248 T_{0,5} + 176,4315 \quad \frac{r}{0,62352} \quad (1)$$

$$\text{CTS\%} = 2,03299A + 388,7646 \quad 0,52981 \quad (2)$$

$$\text{CTS\%} = 0,01327Ca + 280,9177 \quad 0,00381 \quad (3)$$

Se obțin îmbunătățiri ale indicelui de corelare dacă activitatea antileucemică se exprimă prin indici terapeutici, și dacă se iau în considerare simultan mai mulți parametri fizico-chimici, în cadrul unor ecuații multilinare (ec. 4-5, 6 derivați de N-NU) /5/ :

$$\text{ED50} = -0,00188Ca - 0,00288A + 0,331 \quad \frac{r}{0,782} \quad (4)$$

$$\text{ED50} = -0,0021Ca - 0,00326A + 0,000407 P + 0,365 \quad 0,788 \quad (5)$$

$$\text{ED50/DL10} = 0,00173Ca - 0,00537A - 0,0337P + 0,6880 \quad 0,712 \quad (6)$$

În general rezultă că activitatea alchilantă are o pondere mai mare decât cea carbamoilantă în ecuațiile de regresie de mai sus. Deși A contribuie atât la toxicitatea față de gazdă cât și față de celulele leucemice, creșterea activității alchilante mărește efectul terapeutic /5/.

Desigur, datele de mai sus nu sînt complet semnificative sub aspect statistic, dar literatura de care dispunem nu prezintă analiza unor loturi numeroase și omogene de compuși din această clasă.

VIII.2.3. Corelarea toxicității cu parametri fizico-chimici

Toxicitatea nematopoetică reprezintă manifestarea majoră a toxicității N-NU la mamifere și principalul factor ce limitează utilizarea lor clinică /97/. Din acest motiv, constatarea că derivații din această

clasă, care la atomul de azot nenitrozat au atasat un rest zahar, sînt mai puţin toxici faţă de măduvă, este foarte importantă, sub aspect practic /110/.

Deşi iniţial s-a postulat că, în cazul N-NU, activitatea alchilantă este responsabilă de efectul antitumoral iar cea carbamoilantă de cel toxic, se pare, totuşi, că mărimea toxicităţii faţă de neutrofile nu este determinată exclusiv de activitatea carbamoilantă a compuşilor respectivi. De exemplu, nici GANU nici clorozotocina nu micşorează numărul de neutrofile, deşi primul este de 16 ori mai carbamoilant decît al doilea /104,105/.

Reprezentarea grafică a dependenţei toxicităţii (DL_{10}) de A şi Ca, evidenţiază că derivaţii foarte alchilanţi sau foarte carbamoilanţi sînt la fel de toxici. Pe de altă parte există derivaţi cu valori A şi Ca mici, care sînt de asemenea toxici, toxicitatea compuşilor mai hidrofilii fiind mai accentuată /5/.

Analiza matematică a proprietăţilor acestor compuşii conduce aşa cum reiese din ecuaţiile de mai sus (ec.7-13) /5/ la următoarele concluzii :

$DL_{10} = -0,00192Ca + 0,3569$	$\frac{r}{0,246}$	(7)
$DL_{10} = -0,00304A + 0,3529$	0,369	(8)
$DL_{10} = -0,00457P + 0,1615$	0,629	(9)
$DL_{10} = -0,0048Ca - 0,00574A + 0,7075$	0,639	(10)
$DL_{10} = -0,00148Ca + 0,00444P + 0,2452$	0,656	(11)
$DL_{10} = -0,00045A + 0,00436P + 0,180$	0,630	(12)
$DL_{10} = -0,00324Ca - 0,00319A + 0,0028P + 0,480$	0,700	(13)

- lipofilicitatea pare factorul dominant în determinarea toxicităţilor relative ale compuşilor analizaţi ;

- corelarea DL_{10} cu A este mai bună decît cu Ca şi se obţine o îmbunătăţire semnificativă a coeficientului de corelare dacă se ţine

seama de ambii parametri /5,105/.

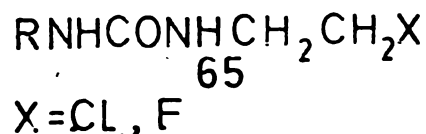
VIII.3. Concluzii

Deși formularea relațiilor structură chimică - activitate biologică, în clasa N-NU, abordată inițial cu mare entuziasm nu a condus la rezultate spectaculoase, totuși din aceste studii a reieșit că pentru ca un derivat de 1-(2-haloetil)-1-nitrozouree-3- substituită să prezinte proprietăți terapeutice optime, el trebuie să aibe: activitate alchilantă ridicată, activitate carbamoilantă scăzută, reactivitate chimică relativ scăzută și o valoare a lipofilicității situată la limita superioară a intervalului propus de Hansch.

IX. Sinteza-mono și 1,3-di(2-haloetil)ureelor

Aceste tipuri de uree constituie intermediarii cheie în sinteza 1-(2-haloetil)1-nitroso sau 1,3-di(2-haloetil)-1-nitrozoureeilor, produși anticanceroși cu mare eficiență. Din acest motiv prepararea lor face obiectul unei discuții mai detaliate.

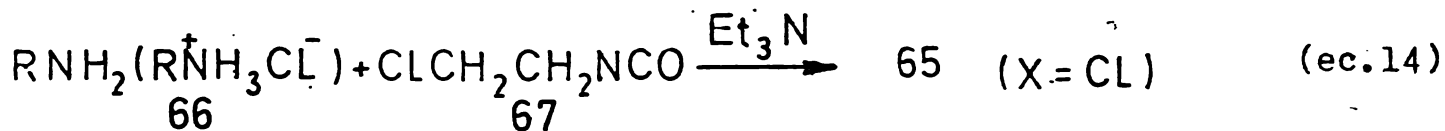
Deoarece datele farmacologice analizate au arătat că în cazul N-nitrozoderivaților de uree prezența resturilor 2-clor sau 2-fluoretil (și deocamdată numai a acestora) conferă derivaților respectivi proprietăți antileucemice cu totul remarcabile (vezi cap. III) ne vom referi în continuare în special la metodele particulare de obținere a ureelor precursore corespunzătoare (65).



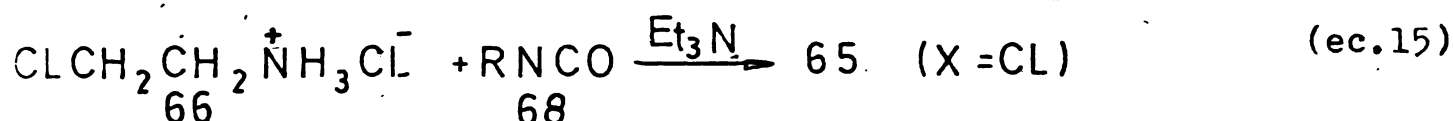
În sfârșit, dat fiind că spectrul antitumoral al N-nitrozoureeilor este determinat în mare măsură de natura radicalului R din 65, un număr mare de 2-fluoro sau 2-cloretiluree au fost sintetizate, având R dintre cei mai diferiți (resturi alifatice, cicloalifatice, heterociclice, carbonhidrați, etc.).

Din sistematizarea bogatului material existent, rezultă că 2-cloretilureele se pot obține prin una din următoarele metode :

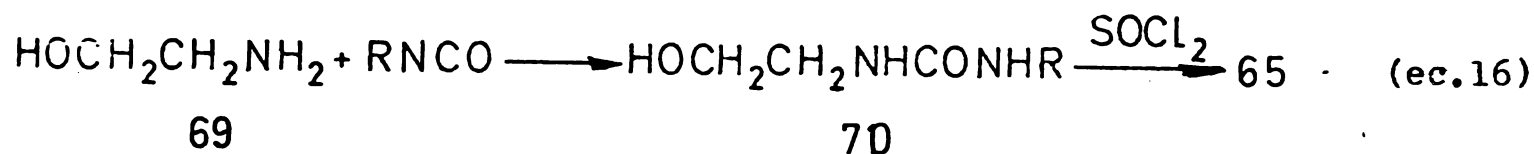
a) cuplarea 2-cloretil izocianatului 67 cu amina dorită, 66, (sau clornhidratul acesteia) în prezența sau absența unor acceptori de HCl suplimentari (Et₃N, Py) în solvenți convenabili (ec.14) /25-27,35, 36,49,54-56,60,81,111-126/.



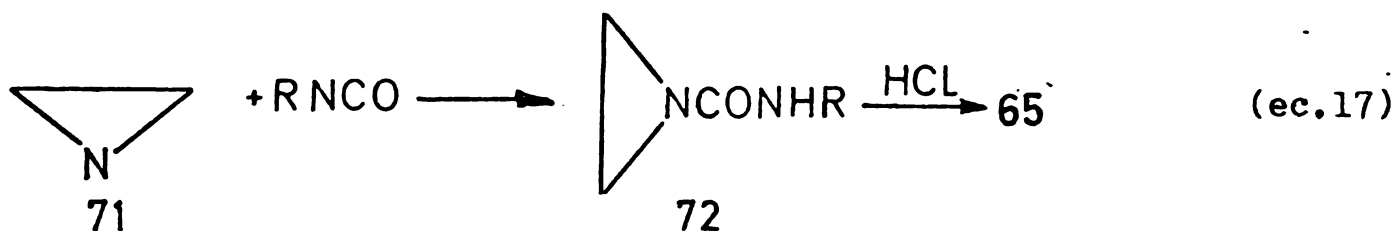
b) cuplarea 2-cloretil aminei clornhidrat cu izocianatul corespunzător restului R, 68, în prezența de amine terțiare (ec.15) /27,47, 127,128/.



O variantă a acestei metode constă în înlocuirea 2-cloretil aminei cu 2-hidroxietyl amină, 69, ureele astfel obținute, 70, fiind transformate în 2-cloretil derivați, 65, cu ajutorul unui agent de clorurare, de obicei SOCl₂ (ec.16) /25,26,129/.



c) din etilenimină, 71, și RNCO, aziridinilureele intermediare, 72, fiind transformate la tratate cu HCl conc. în 2-cloretil derivații doriți (ec.17) /25,130/.

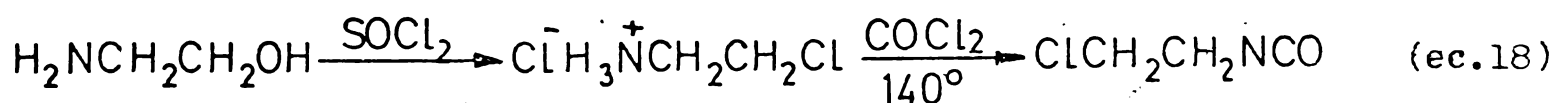


Alegerea uneia sau alteia din variantele de mai sus, depind de accesibilitatea relativă a reactanților sau de obiectivul sintezei. Metoda cea mai utilizată constă în cuplarea 2-cloretil izocianatului cu aminele dorite (metoda a), importanța ei fiind justificată de posibilitatea obținerii unor serii largi de derivați (sinteza aminelor fiind mai ușoară decât a izocianatilor corespunzător). Un al doilea motiv

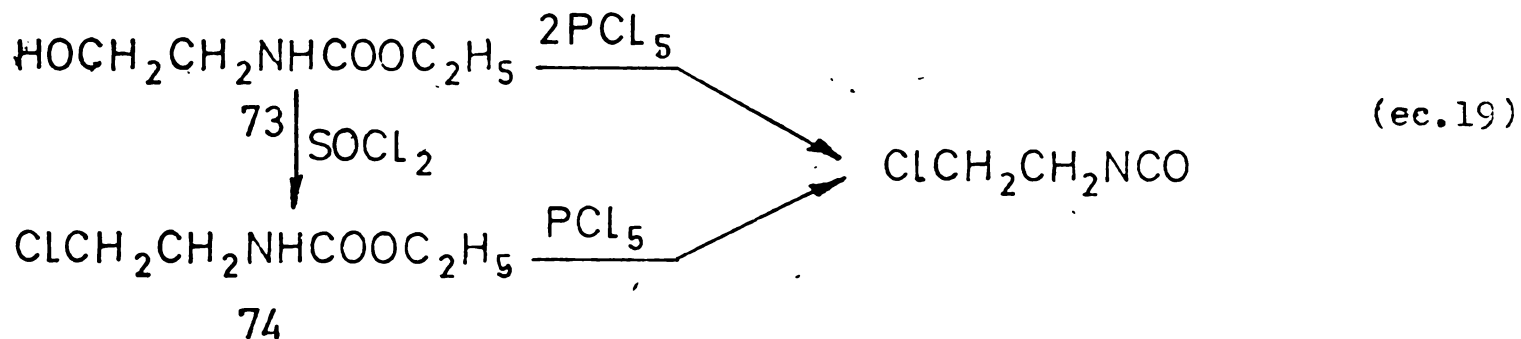
rezidă în reactivitatea crescută a 2-cloretil izocianatului, 67, ceea ce permite realizarea cuplării în condiții comode și cu randamente ridicate. Datorită avantajelor acestui procedeu sinteza 2-cloretil izocianatului prezintă o importanță deosebită. Trebuie menționat că reactivitatea sa ridică o serie de probleme tehnologice deloc neglijabile.

Dintre metodele de sinteză ale 2-cloretil izocianatului, 67, cele mai cunoscute sînt următoarele :

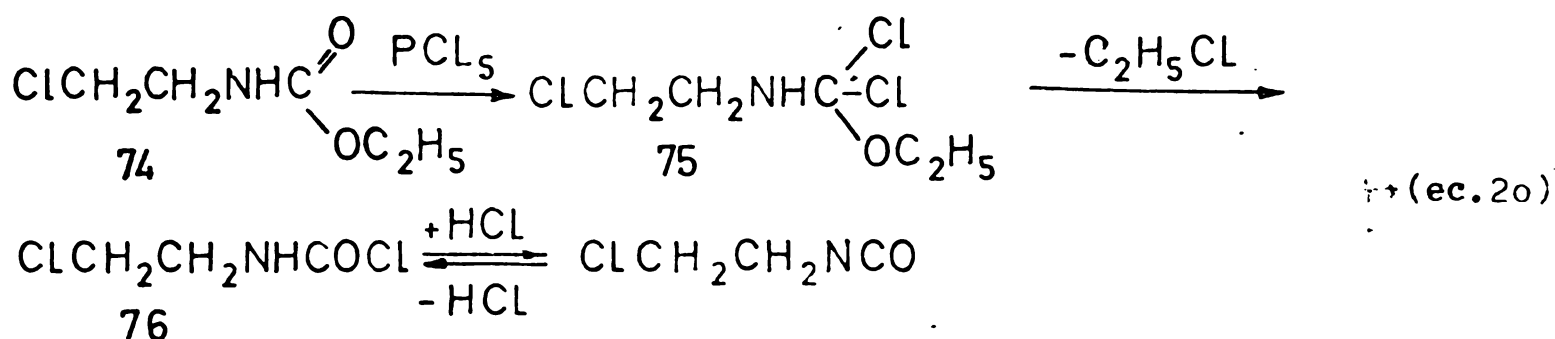
- din monoetanol-amină prin clorurare și fosgenare, fără separarea 2-cloretil aminei. HCl (ec.18) /131,132/.



- din acțiunea pentaclorurii de fosfor asupra hidroxietiluretanului, 73, sau cloretil uretanului, 74 (ec.19) /133,134/.

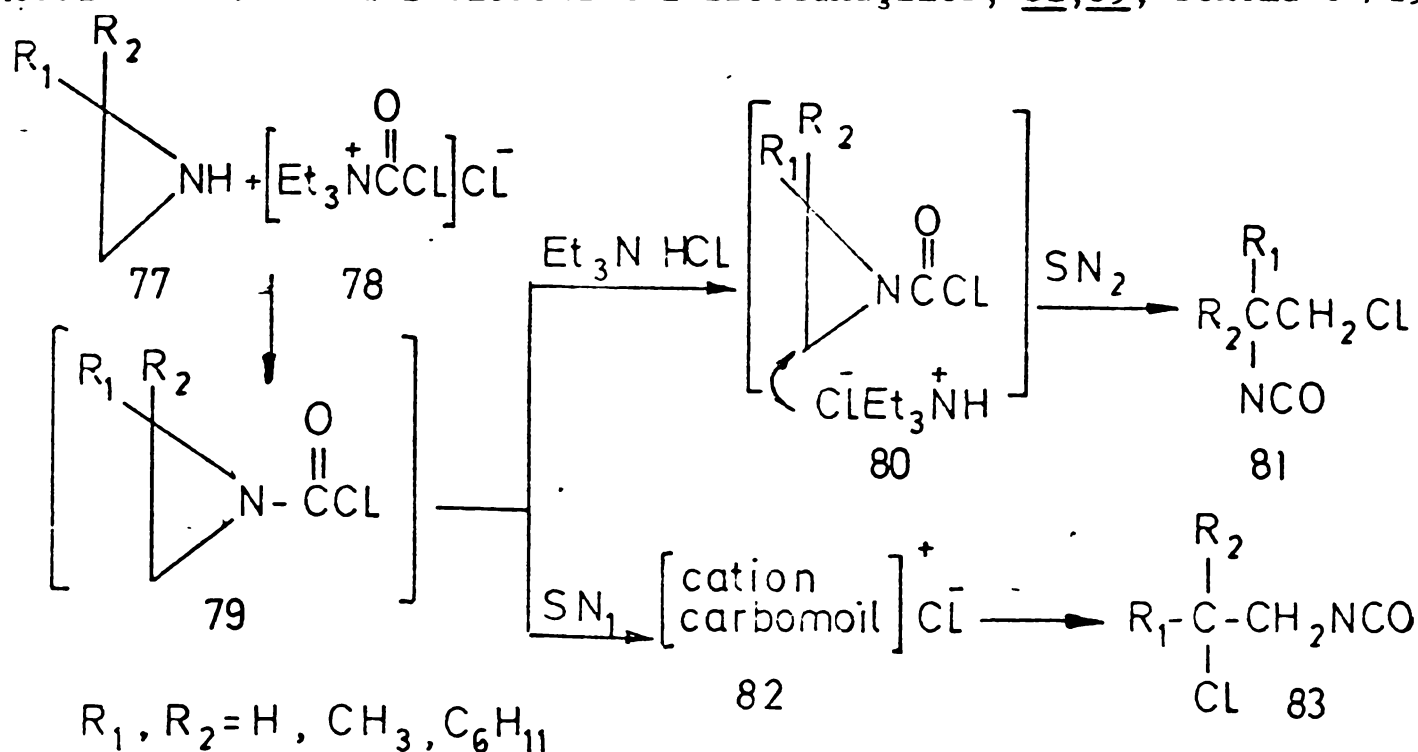


Se pare că, inițial, sub acțiunea PCl₅ oxigenul grupării carbonil este înlocuit cu doi, conform următoarei secvențe de reacții (ec.20) /133/



- reacția complexului trietilamină (piridină) : fosgen/1:1, 78, cu aziridină (sau aziridine substituite), 77, metodă care prezintă avantaje nete față de cele raportate anterior, constituind și un procedeu

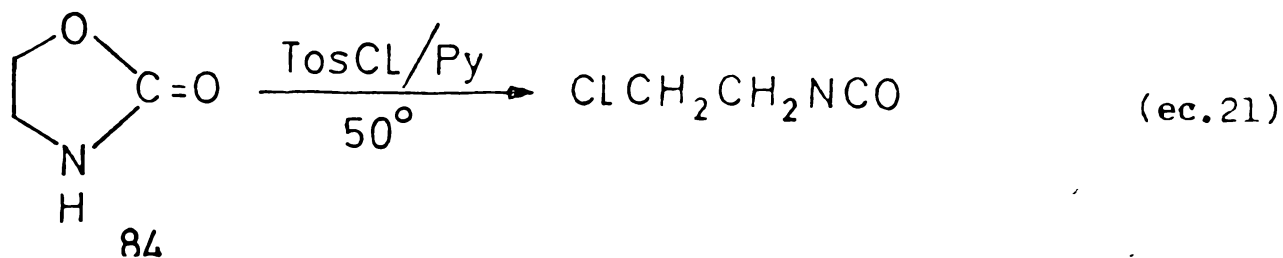
general de sinteză a 2-cloroalchil izocianaților, 81,83, sehema 6 /135/.



Schema 6

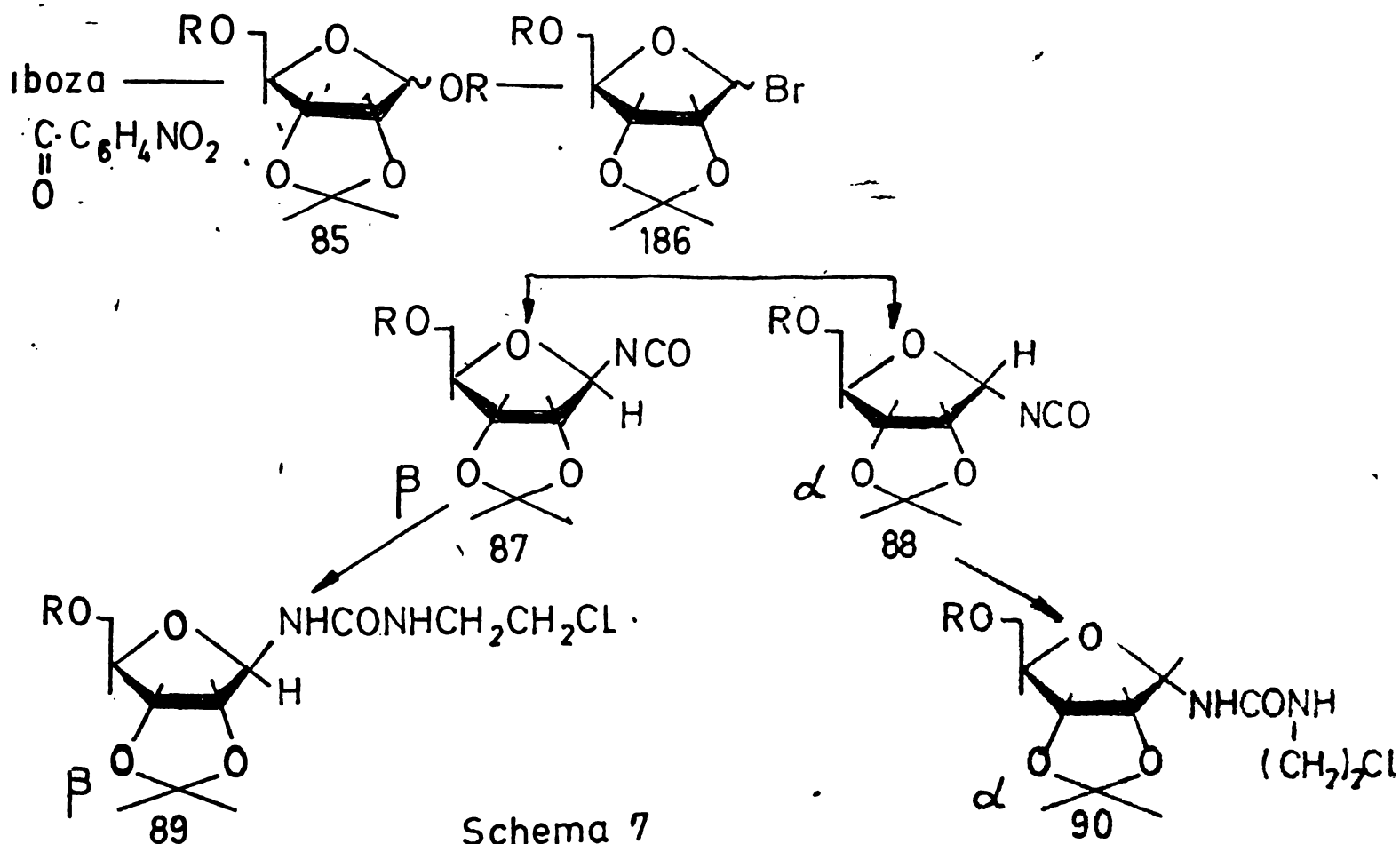
Se admite formarea intermediară a unei 1-(aziridinil)-carbamoil cloruri, 79, care printr-un mecanism SN_1 sau SN_2 (ori o combinație a acestora, în funcție de gradul de substituție al inelului aziridinic), se disociază în N-cloroformil carbocationi, 80, și Cl^- (SN_2) sau carbamoil cationul, 82, cu structură neelucidată (SN_1), din care rezultă izocianații, 81, și respectiv 83 /135/. Evident în cazul aziridinei nesubstituite rezultă exclusiv 2-cloretul izocianatul ($81=83$). În absența bazelor se obțin β, β' -dicloroalchiluree /136/.

- o metodă recentă obține 2-cloretul izocianatul în condiții blânde ($t=50^\circ$) și cu randamente ridicate prin descompunerea uretanului ciclic, 84, sub acțiunea clorurii de tosil și în prezență de piridină (ec.21) /137/.



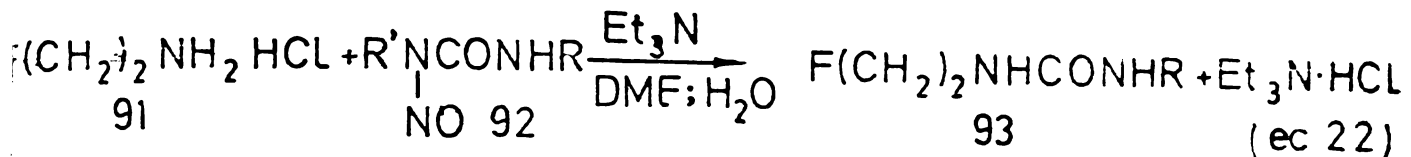
Un exemplu interesant de sinteză a 2-cloretilureelor printr-o cuplare a 2-cloretil aminei cu izocianatul $RNCO$ (metoda b), este ilus-

trat printr-o serie de sinteze stereospecifice, efectuate în seria glicozil nitrozoureeilor. Se sintetizează izocianații corespunzători restului zahar, care se pot separa în cei doi anomeri α și β , 87, 88 prin cristalizare din solvenți adecvați, și a căror structură poate fi confirmată neechivoc prin metode spectrofotometrice. Cum izocianații reacționează cu un agent nucleofil, de exemplu 2-cloretil amina, cu păstrarea configurației, se pot obține ureele, 89 respectiv 90, anomerice pure (schema 7) /127/. Este de subliniat că separarea amestecului a două uree anomere se poate face și cromatografic, dar atribuirea configurației reale este mult mai dificilă /36/.

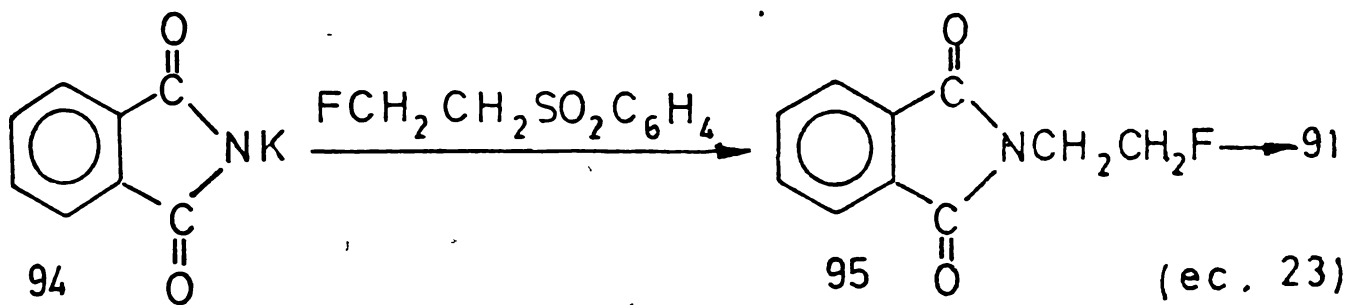


În ceea ce privește sinteza 2-fluoretil ureelor sînt descrise în literatură trei procedee, dintre care primele două sînt aplicate curent și anume :

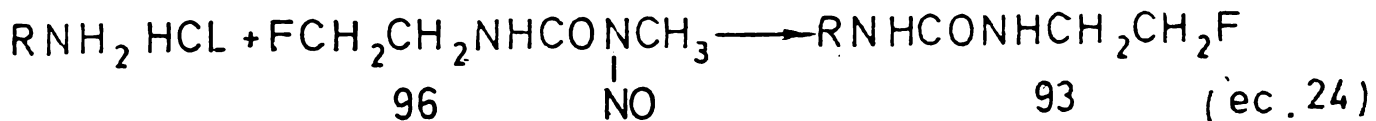
- a) cuplarea clorhidratului 2-fluoretil aminei, 91, cu o nitrozouree, 92, avînd restul R (dorit) atașat la atomul de azot nenitrozat (ec.22) /26,27,111/.



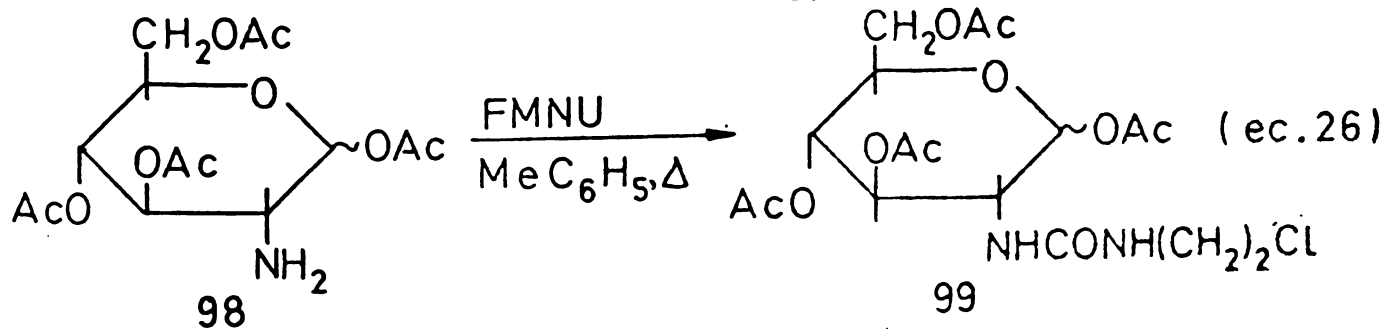
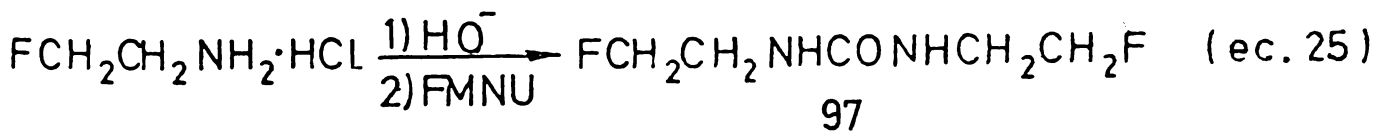
2-Fluoretil amina HCl, 91, se poate obține prin metoda Gabriel /128/ sau printr-o variantă îmbunătățită, care constă în cuplarea ftalimidei potasice cu 2-fluoretil-p-toluensulfonat /26/. N-(2-fluoretil)ftalimida formată, 95, se supune hidrazinolizei (ec.23) /26/.



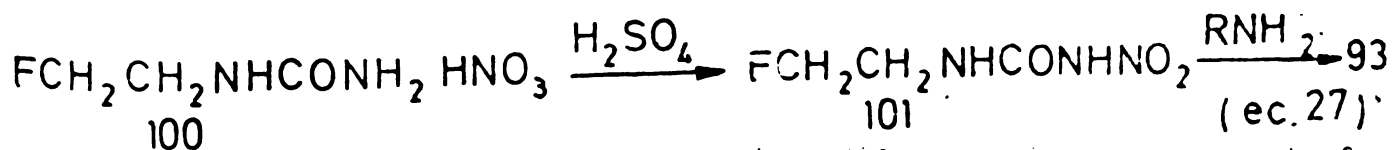
b) din clorhidratul aminei corespunzătoare restului R cu 1-metil-3-(2-fluoretil)-1-nitrozouree, 96 (ec.24) /26/.



Dezcompunerea apoasă a 96 presupune formarea intermediară a 2-fluoretil izocianatului, compus neizolat încă, dar a cărei apariție în cursul reacției este evidentă (ec.25,26) /111/.

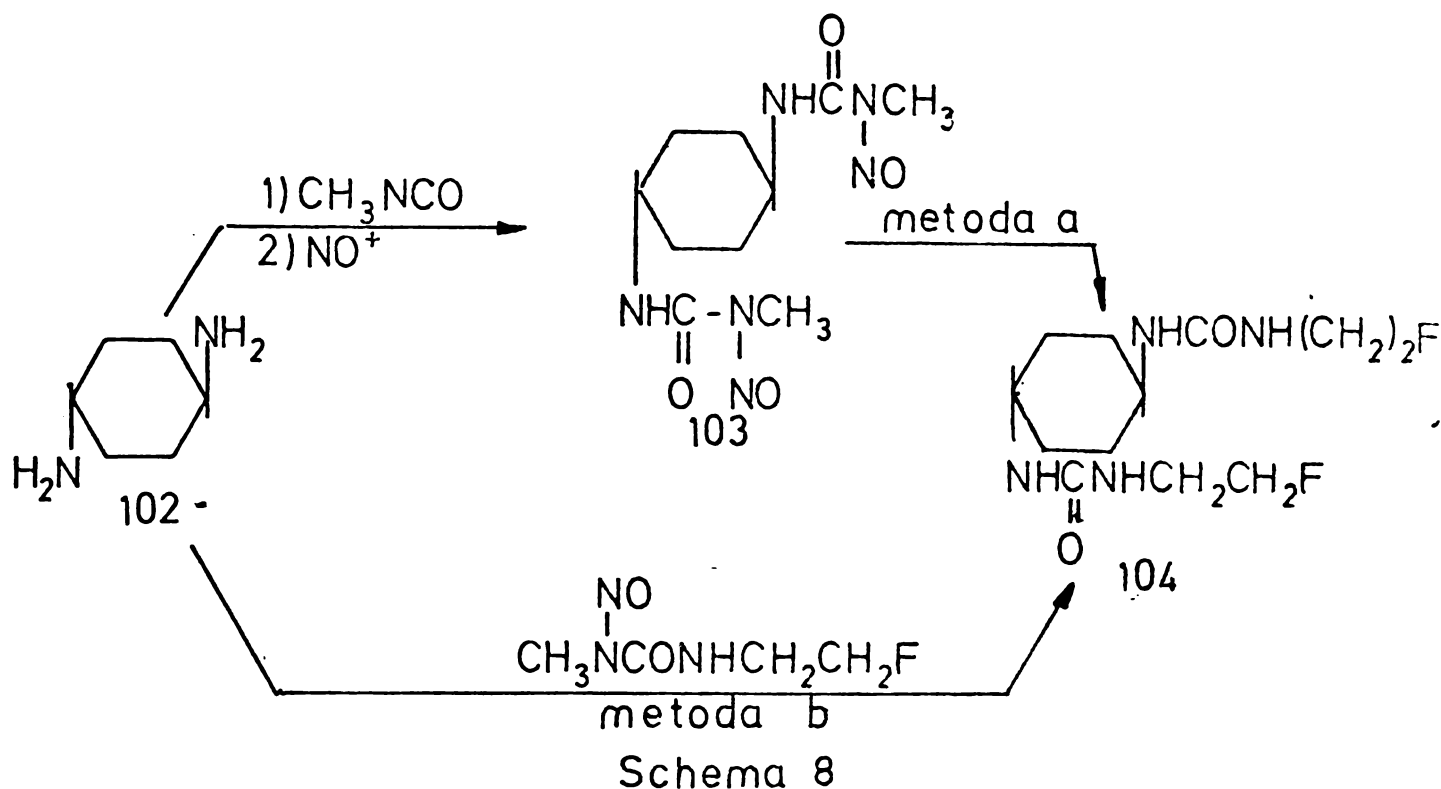


c) din 1-(2-fluoretil)-3-nitrouree, 100, obținută la rândul ei din nitrat de 2-fluoretiluree cu H₂SO₄ (ec.27) /27,111/.



Alegerea uneia sau alteia din căile de sinteză depinde în primul

rînd de accesibilitatea materiilor prime. Astfel, dacă dorim să economisim o amină scumpă (cum este de ex. 1,4-transciclohexan-diamina, 102), se folosește de obicei metoda b (schema 8) /26/.



X. Sinteza derivaților de 1-(2-cloretil)-nitrozouree

Interesul, inițial limitat, pentru sinteza N-nitrozoureeilor s-a datorat utilizării lor ca intermediari stabili în obținerea diazoalcaloidelor. Ulterior, evidențierea proprietăților lor biologice de excepție, a stimulat intens studiul acestui domeniu.

Principalele metode de obținere a N-nitrozoureeilor constau fie în procedee de nitrozare directă a ureelor corespunzătoare (în general adaptări după procedeele folosite în sinteza N-nitrozoamidelor), fie în sinteza ca atare a funcțiunii N-nitrozoureeidice, folosind sintoni ce conțin gruparea nitrozo.

Considerînd prima categorie de procedee, de departe cea mai răspîndită, agenții de nitrozare sînt cei utilizați pentru obținerea N-nitrozoamidelor, și anume :

- a) azotit de sodiu (solid sau soluție) în acizi minerali /138,139/,

saŭ acid acetic și anhidridă acetică /138/;

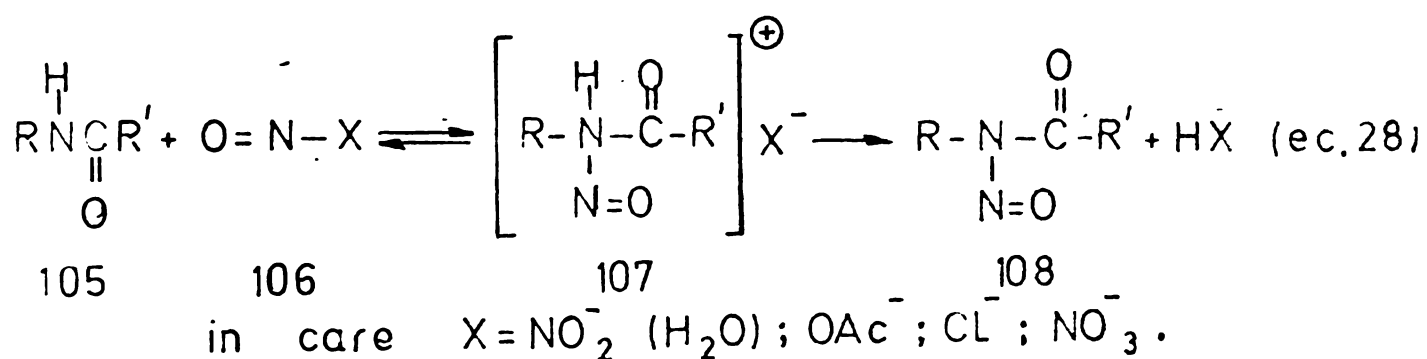
b) trioxid de azot în eter sau acid acetic și anhidridă acetică /140,141/ ;

c) clorură de nitrozil în acid acetic și anhidridă acetică în prezență de acetat de sodiu și pentaoxid de fosfor /142-145/;

d) tetroxid de azot în prezență de acceptori de acid azotic (acetat de sodiu sau piridină) /138,146/.

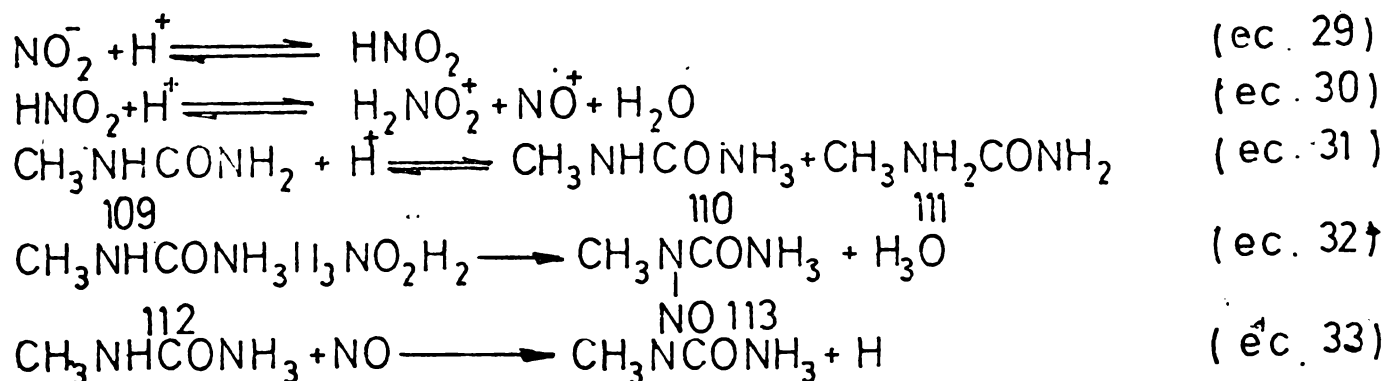
Dintre aceștia tetroxidul de azot constituie reactivul de elecție, avînd un spectru larg de utilitate, procedeul fiind rapid și conducînd la produși finali puri cu randamente excelente.

Ecuția generală de nitrozare a amidelor se poate reprezenta astfel (ec.28) /138/ :

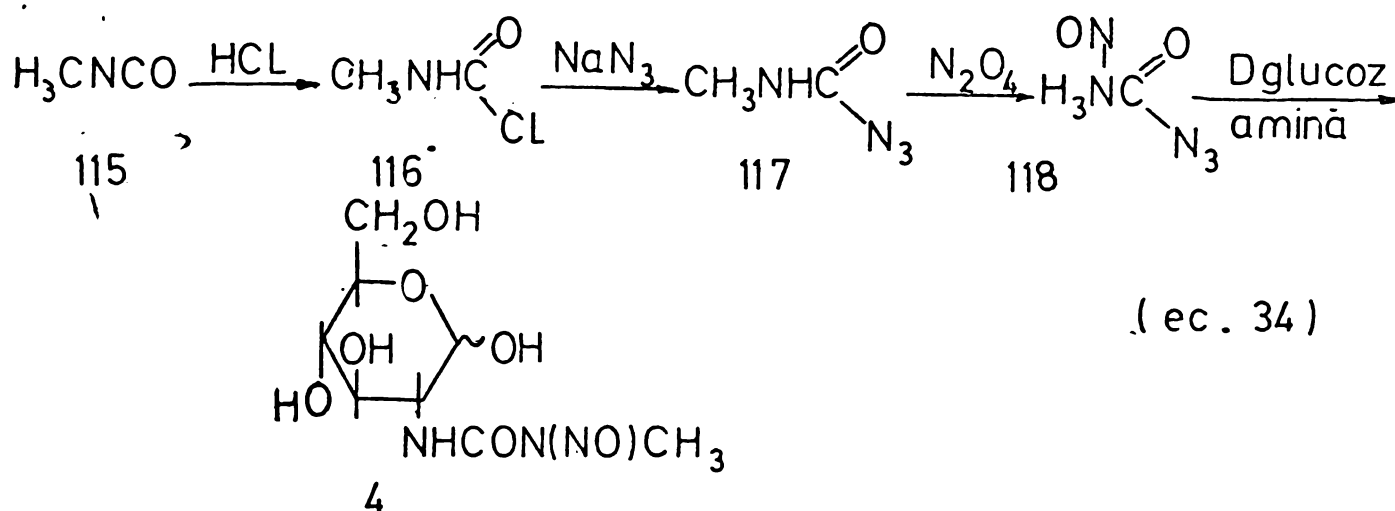


Se cunosc relativ puține date în literatură privind mecanismul și cinetica reacției de nitrozare a derivaților de uree. Se admite că nitrozarea se produce prin atacul electrofil al ionilor de nitrozoniu (NO^+) și/sau ionilor de nitracidiu (H_2NO_2^+) asupra unor centre bogate în electroni din molecula de uree, cum ar fi unul din cei doi atomi de azot. În funcție de influențele (sterice sau electronice) exercitate de substituenții acestor centre bazice se pot obține doi izomeri, singuri sau în amestec. Iată, spre exemplificare, mecanismul propriu pentru nitrozarea metilureei cu azotit de sodiu în acid percloric (ec.29-33) /146/;

În cea de a doua categorie de procedee, intră cele ce folosesc cuplarea unor amine cu reactivi speciali, de exemplu de tipul N-nitrozozididelor substituite, reacție din care se obține direct numai izomerul



dorit. Un bun exemplu în acest sens îl constituie sinteza streptozotocinei, 4, substanță cu bune proprietăți antitumorale (ec.34) /147,148/.



Conform schemei generale descrise anterior, derivații de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree se pot obține prin :

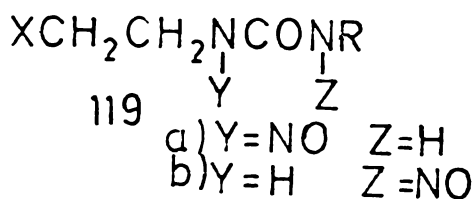
- a) nitrozarea directă a derivaților de uree ;
- b) prin reacția aminelor cu N-(2-cloretil)-N-nitrozocarbazida sau cu p(o)-nitro(cian)-benzil-N-(2-cloretil)-N-nitrozocarbamat.

Pentru nitrozarea directă a 2-cloretil nitrozoureele se utilizează următorii agenți de nitrozare ;

- azotit de sodiu în mediu acid /23,25-27,35,36,49,55,58,112,117,118,122,123,125,149-157/;
- trioxid de azot /33,35,54,60,81,150,158,159/;
- tetroxid de azot /111,112,121,160-162/ și
- clorură de nitrozil /36,123,127/.

Allegerea lor și a condițiilor de nitrozare se face astfel încât să se obțină produsul dorit, pe cât posibil pur și cu randament cât mai ridicat.

Una din problemele cheie în sinteza acestui tip de derivați constă în obținerea în stare pură a izomerului 1-(2-haloetil)-1-nitrozouree, 119a, considerabil mai activ din punct de vedere biologic decât izomerul



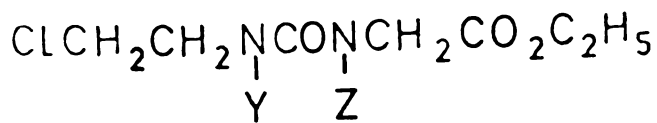
1-(2-haloetil)-3-nitrozouree, 119b.

Este evident că problemele cele mai dificile privind obținerea compuşilor din această clasă rezidă în elab-

borarea unor căi de sinteză care să conducă selectiv sau unechivoc la izomerul dorit precum și confirmarea structurii și purității lui izomerice.

Regulile care guvernează poziția de nitrozare în cazul 1-(2-haloetil)-ureelor țin seama de următorii factori :

- nucleofilia atomului de azot. Este evident, conform mecanismului de nitrozare, că nitrozarea va avea loc la atomul de azot cel mai bazic și că sub o anumită valoare a bazicității reacția nu mai are loc. Astfel, în timp ce 1,3-bis-(2-cloretil)-ureea se nitrozează ușor în HCOOH cu NaNO₂, la rece, 1,3-carbonil diglicinatul nu poate fi transformat în nitrozoderivatul corespunzător /25/. Totuși, atribuirea structurii N-nitrozoureei pe baza diferențelor de nucleofilie a celor doi atomi de azot, este riscantă. Astfel, produsului obținut prin nitrozarea 5-(2-cloretil)-hidantoatului de etil, i s-a atribuit, pe baza acestui considerent, structura 120a /25/.

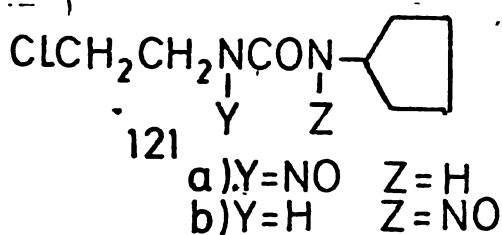


- a) Y=NO Z=H
b) Y=H Z=NO

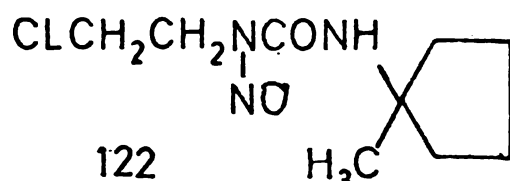
punerii cu amine) s-a dovedit a fi incorectă, structura reală fiind 120b /26/.

- efectele sterice și electronice exercitate de substituentul R, contribuie de asemenea în mod semnificativ la stabilirea rației izome-

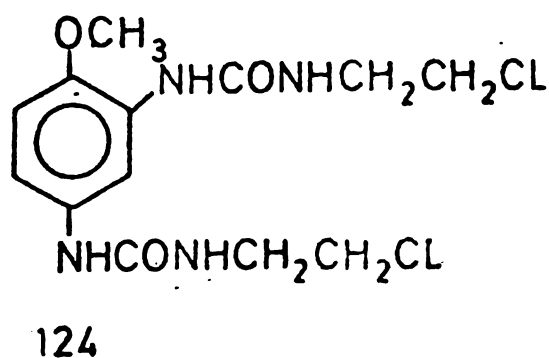
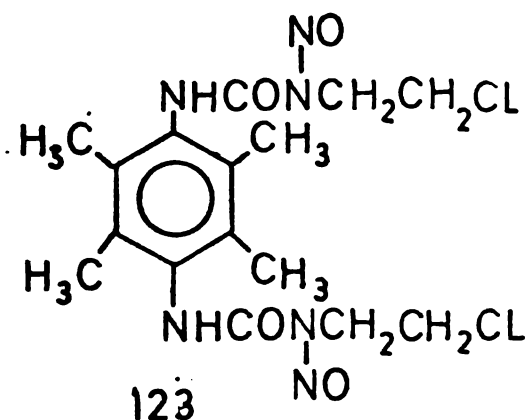
rice. Prezența unor substituenți voluminoși (ca de ex. alchil ramificați, ciclohexil) orientează substituția în poziția 1. Spre deosebire de restul ciclohexil, alți cicloalcani (ciclopentil sau cicloheptil) nu prezintă efecte sterice marcante /26,27/. Astfel nitrozarea 1-(2-cloretil)-3-ciclopentil ureei, conduce la un amestec de nitrozo izomeri, 121, în proporția



1:3. Substituirea hidrogenului de la atomul de carbon al inelului ciclopentanic de care se leagă funcția ureidică, cu o grupare metil mărește considerabil efectele sterice, obținându-se exclusiv 1-(2-cloretil)-3-(1-metilciclopentil)-1-nitrozouree, 122 /26/. Factorii electronici contribuie, de asemenea, semnificativ la orientarea nitrozării. Exemplul 1-(2-cloretil)-3-fenil ureei este semnificativ /26/.

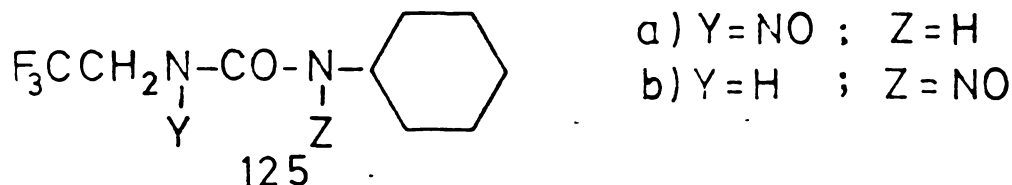


S-au notat efecte sterice și în cazul preparării unor nitrozouree de la fenilendiamine orto-substituite. Astfel nitrozarea în poziția 3 este apreciabil împiedicată în cazul preparării 3,3'-(tetrametil-p-fenilen)-bis-[1-(2-cloretil)-1-nitrozoureei], 123, în timp ce nitrozarea în aceleași condiții a 3,3'-(4-metoxi-m-fenilen)-bis-[1-(2-cloretil)-ureei], 124, generează, practic, toți izomerii posibili /26/.

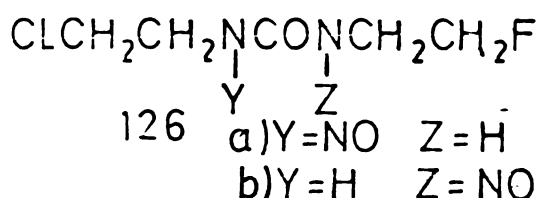


Factorii sterici pot fi parțial contracarați de efectele electronice puternice ale unor substituenți. Se poate aminti cazul 1-(2,2,2-trifluoroetil)-3-ciclohexil-ureei, la nitrozarea căreia se obține prefe-

rențial izomerul 3-nitrozo, 125b /2/.

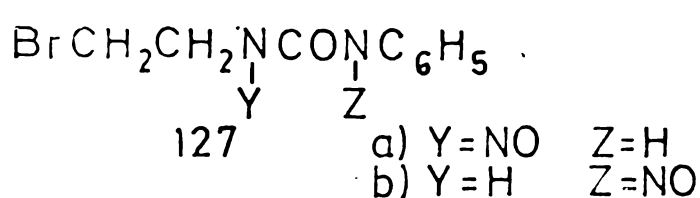


Nu este exclus însă ca rația izomerică să depindă și de alți factori decât cei sterici și electronici. Nitrozarea 1-(2-cloretil)-3-(2-fluoretil)ureei conduce la amestecuri conținând cei doi izomeri, 126a, și 126b, în proporții variabile între 1:1 și 2:5. Purificarea izomerică



a unui amestec 2:5 produce o mică modificare a rației izomerice, ceea ce nu se poate atribui unei migrări a grupării NO /27/.

- un alt factor important, în ceea ce privește determinarea rației izomerice îl constituie condițiile de lucru. Efectul apei asupra rației izomerice a fost observat pentru prima oară în cazul 1-(2-brometil)-3-fenilureei, care la tratare cu NaNO₂ solid în HCOOH 85% conduce la un amestec de izomeri 127a:127b/1:1, în timp ce în mediu de HCOOH



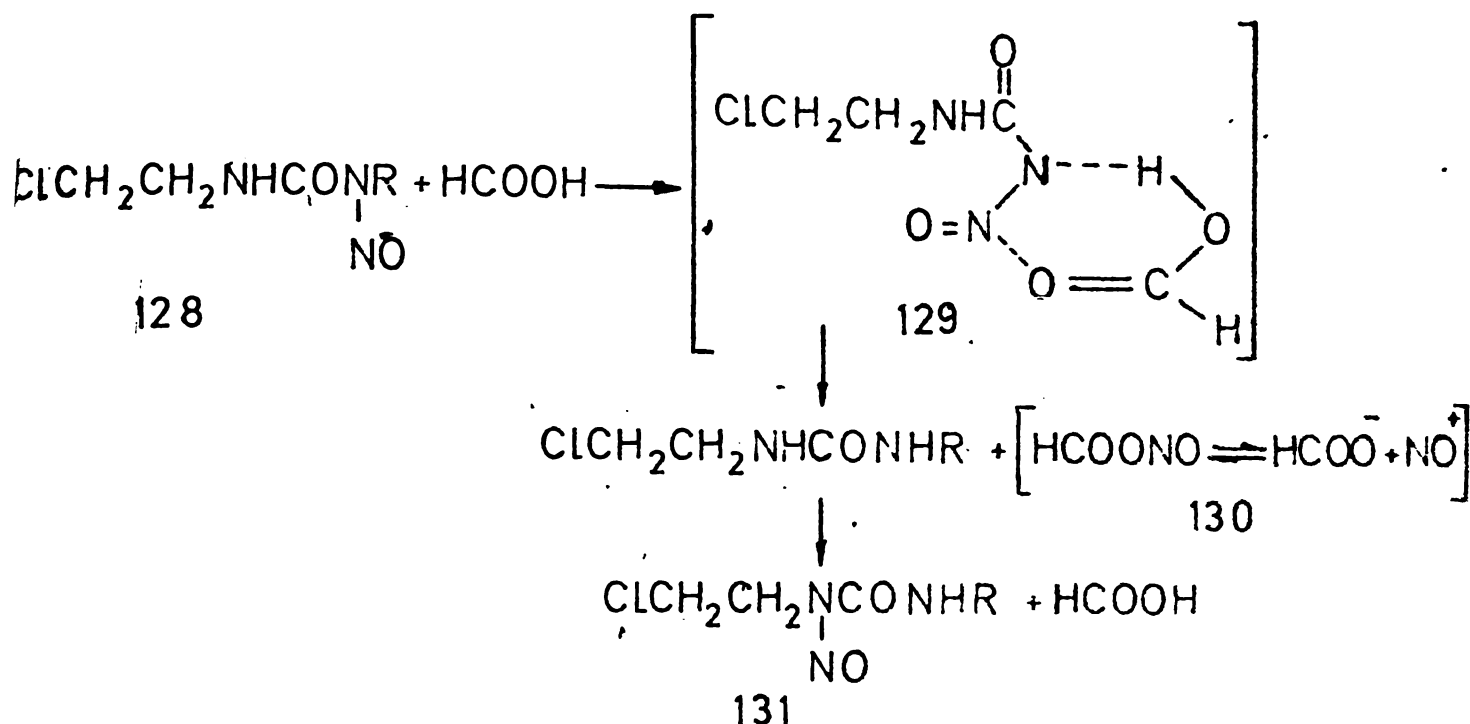
98-100% rezultă exclusiv izomerul 1-nitrozo, 127a /2/. Prezența apei are efecte similare și în cazul nitrozării

1-(2-cloretil)-3-fenil sau ciclohexilureei /26/.

În vederea realizării unor nitrozări selective, literatura recomandă ca mediu de reacție HCOOH 98-100% sau HCl conc. cu azotit de sodiu solid, sau trioxid de azot.

a) Procedeele care folosesc HCOOH 98-100%, sînt de departe cele mai utilizate în această clasă. Mai mult s-a reușit purificarea cantitativă a amestecurilor de izomeri prin dizolvarea lor în HCOOH 98-100% rece și reprecipitare lentă, după un timp, cu apă. Are loc, probabil, un transfer al grupei NO în HCOOH, ceea ce implică formarea formil nitritului, 130 (schema 9) /26/. Procesul invers nu este afectat în

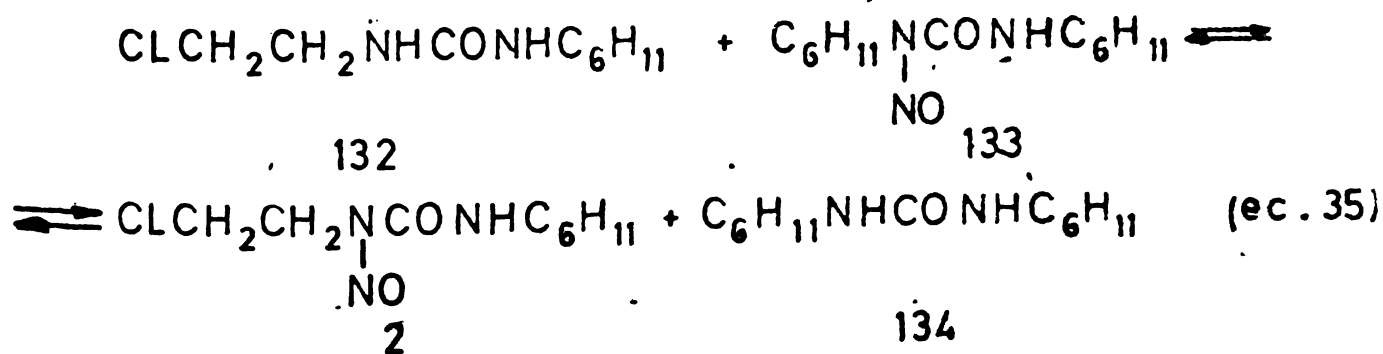
diu apos.



Schema 9

Compoziția izomerică poate depinde de un echilibru guvernat de relativa stabilitate a izomerilor față de extracția grupării NO și, aparent, cu creșterea concentrației apei, există o valoare peste care numai are loc extracți. Din acest motiv în sistemele apoase unde forma izomerilor poate să nu fie reversibilă, rația izomerică depinde, în primul rând, de vitezele lor relative de formare /26/.

Transferul grupei nitrozo poate avea loc: a) intramolecular (așa cum este formulat în schema 9) sau b) intermolecular. Astfel, la dizolvarea în HCOOH 98-100%, urmată apoi de diluare cu apă, a unui amestec echimolecular de 1-(2-cloretil)-3-ciclohexiluree, 132, și 1,3-diciclohexilnitrozouree, 133, compoziția amestecului rezultat este consistentă cu un echilibru, care favorizează formarea compusului cel mai stabil, 2 (ec.35) /26/.



Utilizarea HCOOH 98-100%, ca mediu de nitrozare, este limitată de structura și reactivitatea substituenților R. Astfel, în cazul când R conține una sau mai multe grupări HO (alcool mono sau poli hidroxilic, rest zahar) se produc esterificări ale acestora (se formează nitriții respectivi) /35,60,112,163/ și nu întotdeauna stabilitatea nitrozoderivaților permite eliberarea lor /60/. În cazul zaharurilor, nitrozarea în HCOOH mai prezintă un inconvenient suplimentar, și anume produce anomerizări /36,127/.

b) Procedee de nitrozare în HCl conc. cu NaNO_2 sau N_2O_3 .

Viteza crescută cu care au loc reacțiile de nitrozare în aceste condiții se datorește, probabil, formării în situ a clorurii de nitrozil. S-a demonstrat, în acest caz, posibilitatea purificării unui amestec de nitrozoizomeri în soluție etanolică de HCl conc., deci posibilitatea migrării grupării NO și în sisteme apoase. Transpoziția are loc, probabil, prin extracție de grupă nitrozo ca clorură de nitrozil /35,113/.

c) Alte medii de nitrozare, care cel puțin în cazul anumitor structuri, permit o nitrozare selectivă: N_2O_3 în acetonă (în cazul glicozil ureelor) /54/ sau apă (în cazul ureidonucleozidelor) /150/; clorura de nitrozil, mai ales pentru nitrozarea ureelor cu resturi zahar, ea evitând producerea de anomerizări /36/.

Obținerea N-nitrozoureeilor direct din amine, prin cuplare cu reactanți potriviți, este o metodă nouă și relativ puțin studiată. Avantajele acestei metode constau în:

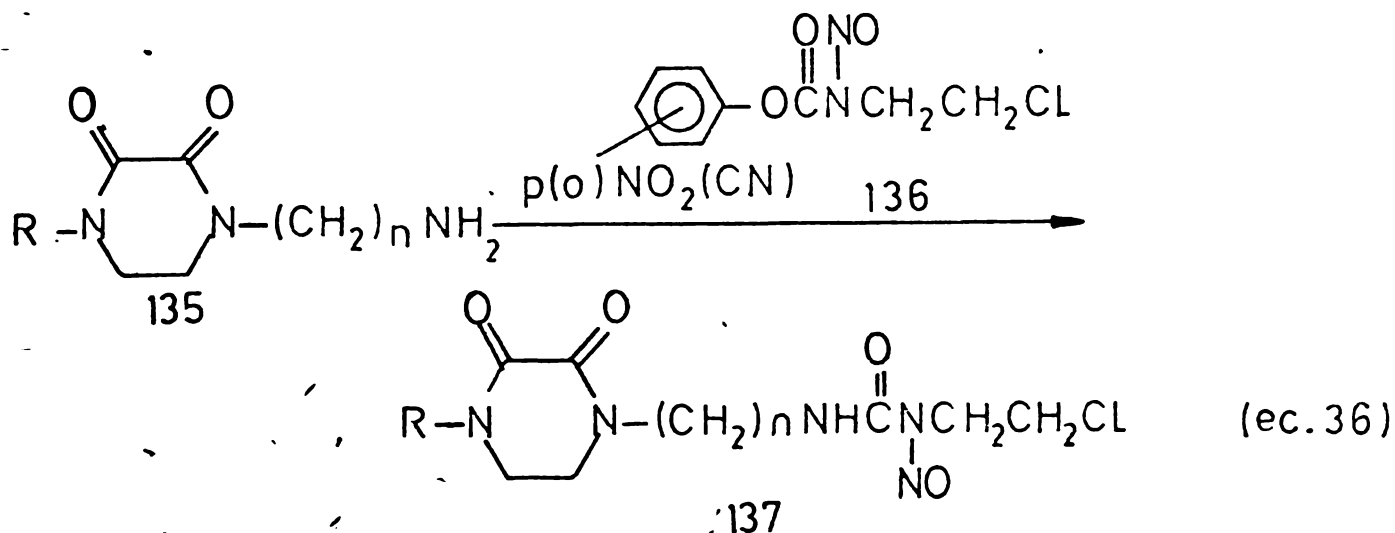
- obținerea unor produși izomerici puri cu structură bine precizată;
- posibilitatea sintezei unor nitrozouree ale căror substituent R nu rezistă la agenții obișnuiți de nitrozare;
- obținerea nitrozoureeilor într-o singură fază (aspect important mai ales în vederea conservării unor amine scumpe).

Aplicarea, deocamdată, relativ redusă a acestei metode, în domeniul studiat de noi, se poate pune pe seama reactivității, de obicei, ridicate a reactivilor de cuplare (de ex. N-nitrozocarbamolazidelor, care face mani-

pularea și conservarea lor dificilă. Pe de altă parte purificarea amestecului de reacție este uneori laborioasă.

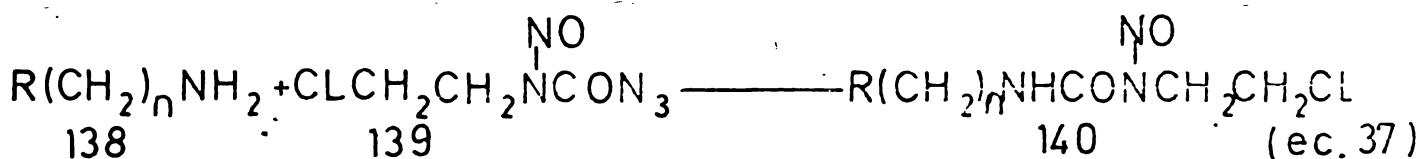
Sinteza 1-(2-cloretil)-1-nitrozocureelor-3-substituite se poate face, conform acestui procedeu, prin :

- cuplarea aminelor cu p(o)-nitro(cian)-fenil-N-(2-cloretil)-N-nitrozocarbamat, 136 (ec.36) /164-167/.

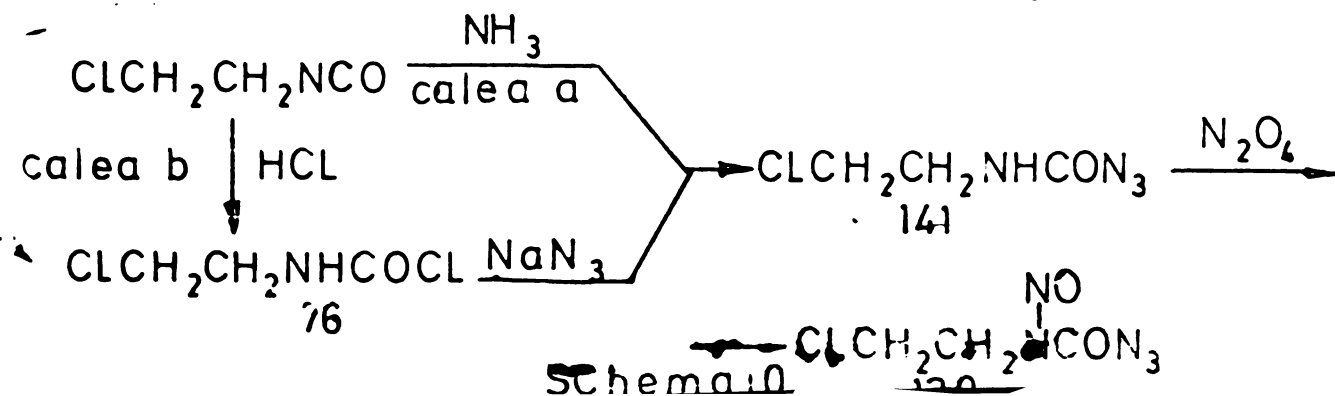


Folosirea acestui reactiv de cuplare, 136, este avantajoasă (manipulare mai ușoară, randamente foarte bune.80%), dar, din păcate, literatura privind obținerea și reacțiile sale nu este accesibilă /164-167/;

- cuplarea aminelor cu N-(2-cloretil)-N-nitrozocarbamoilazidă, 139 (ec.37) /47, 168/.



Pentru sinteza N-(2-cloretil)-N-nitrozocarbamoil azidei, 139, se propun două variante și anume: a) prin adădire de acid azothidric la 2-cloretil izocianat /47/ și b) prin reacția 2-cloretil carbamoil clorurii, 76, cu NaN_3 , urmată de nitrozare cu NOCl /57/. Nitrozarea cu N_2O_4 se dovedește a fi superioară, permițând obținerea unui reactiv, 139, pur, cu randament cantitativ, care poate fi folosit ca atare (fără izolare) în cuplare cu aminele (schema 10) /47/.

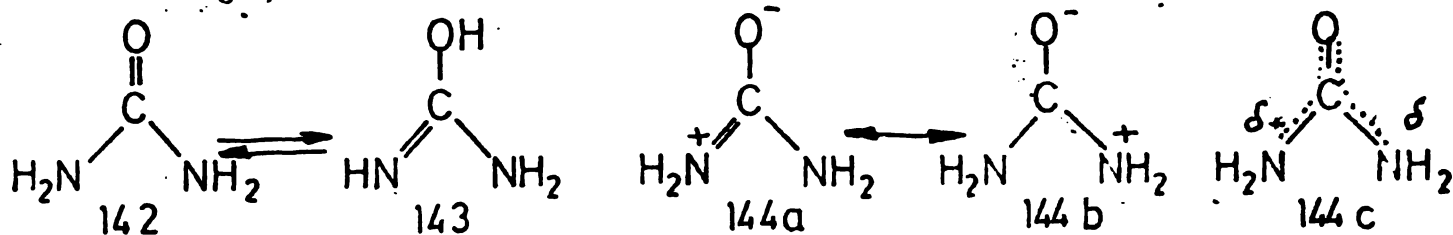


XI. Metode fizico-chimice de determinare a structurii derivaților de uree și nitrozouree.

Utilizarea metodelor fizico-chimice în analiza derivaților de uree și N-nitrozouree discutați în prezenta lucrare, permite atât stabilirea neechivocă a structurii și conformației lor, cât și caracterizarea analitică a acestor derivați în raport cu produșii secundari rezultați din reacțiile lor de sinteză. Din acest punct de vedere, deși valoarea informațiilor furnizate de spectroscopia optică (uv și ir) este incontestabilă, totuși multe probleme structurale nu ar putea fi elucidate fără datele puse la dispoziție de rmn. Recent noi metode fizice au fost aplicate pentru studiul acestor derivați, și anume: spectrometria de masă, cromatografia de gaze și cromatografia de lichide de înaltă presiune. Toate acestea s-au dovedit utile în stabilirea cu acuratețe a structurii și purității compuşilor studiați.

XI.1. Elemente structurale caracteristice derivaților de uree, evidențiate spectrofotometric (uv, ir, rmn)

Structura și geometria moleculei de uree au fost determinate prin difracție de raze X, obținându-se o imagine concludentă asupra aranjării spațiale a atomilor ce o compun /161-171/. Planaritatea moleculei de uree, stabilită de altfel și prin spectrometrie Raman, ir și rmn /172/, permite admiterea unei tautomerii uree-izouree $142 \rightleftharpoons 143$. Pentru forma cetonică, 144, se poate presupune existența unui hibrid de rezonanță, rezultat din suprapunerea unor structuri de tipul 144c.



Din datele obținute prin difracție de raze X /175,173/, rezultă că :

- a) legăturile C-N sînt echivalente (ceea ce exclude, cel puțin

în stare solidă, posibilitatea existenței structurii 143);

b) legăturile C-N și C-O posedă un caracter parțial de dublă legătură (lungimile legăturilor C-N = 1,37 Å și C-O = 1,25 Å , avînd valori intermediare între cele caracteristice unor legături simple sau duble), ceea ce concordă cu existența unui hibrid de rezonanță;

c) derivații de uree există sub forma unor structuri dipolare, ca și amidele secundare, 144c /170,174/.

XI.1.1. Date spectrale în uv caracteristice derivaților de uree.

Spectrele uv ale derivaților de uree sînt puțin studiate, date ceva mai detaliate fiind accesibile numai în cazul ureelor aromatice /175-182/. Dacă în cazul alchilureelor cromoforul $\nu_{C=O}$ prezintă o bandă intensă într-un domeniu greu accesibil < 186 nm (tranziție $\pi-\pi^*$) /183,184/, în cazul aril ureelor atribuirea maximelor de absorbție este îngreunată datorită intervenției benzilor caracteristice sistemului aromatic. Spectrul uv al acestor derivați este sensibil la orice substituție a nucleului aromatic, ce tinde să perturbe sistemul conjugat (prin efecte electronice, inductive sau electromeré, și/sau efecte sterice, mai ales orto efecte, inhibiție sterică a rezonanței, etc.). Modificarea poziției și intensității benzilor de absorbție ale aril ureelor sînt funcție și de natura solventului, ceea ce se explică prin proprietățile amfotere ale funcției ureidice și permite admiterea unei tautomerii uree-izouree /175-182/.

XI.1.2. Date spectrale în ir caracteristice derivaților de uree.

Spectrometria ir este incontestabil mai utilă în studiul derivaților de uree, putîndu-se deosebi cîteva benzi caracteristice pentru compușii aparținînd acestei clase.

Informațiile obținute pe această cale permit discutarea și clarificarea următoarelor aspecte :

a) structura derivaților studiați (gradul de substituție, poziția și natura substituenților, etc.);

b) existența tautomeriei uree izouree ;

c) geometria moleculei de uree, și anume proporția de rotameri realmente existentă în soluție și în stare solidă.

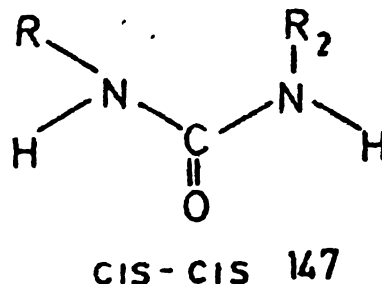
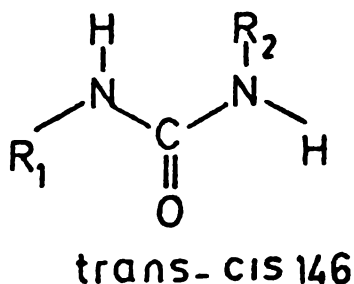
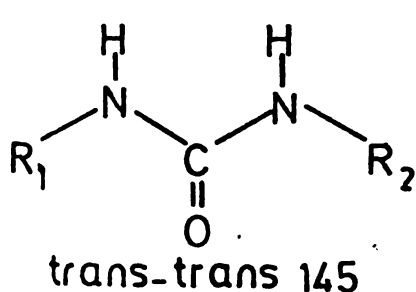
Principalele elemente din spectrul ir, caracteristice ureei și derivaților săi, ce pot răspunde dezideratelor de mai sus sînt :

a) benzile de absorbție ale legăturilor N-H (ν_{N-H} simetrice și asimetrice, din domeniul $3200-3500\text{ cm}^{-1}$ și δ_{N-H} de deformație, cunoscute și ca benzi amidă II, III, V, din regiunea $1550-1600\text{ cm}^{-1}$) /185-190%;

b) benzile de absorbție ale legăturii C=O ($\nu_{C=O}$ -amidă I- în regiunea $1550-1650\text{ cm}^{-1}$ și cele de deformație din domeniul $1250-1300\text{ cm}^{-1}$) /186,188-190%;

c) benzile caracteristice vibrațiilor de schelet (amidă IV și VI, în regiunea $800-600\text{ cm}^{-1}$), vibrații de mai mică utilitate în diagnosticul de structură uzual.

Pentru derivații de uree 1,3-disubstituiți există, teoretic cel puțin posibilitatea apariției unor restricții de rotație în jurul legăturii C-N, ceea ce ar duce, în anumite cazuri, la evidențierea unei izomerii de rotație, putîndu-se desemna trei rotameri: trans-trans, cis-trans și cis-cis (prin conformație trans-trans se înțelege o relație trans între o grupă NH și C=O în jurul legăturii C-N):



Datele experimentale pledează pentru admiterea drept conformație preferențială pentru derivații de uree 1,3-disubstituiți cea trans-trans /185/. Dintre argumentele ce sprijină această ipoteză putem cita diferențele constatate între spectrul ir al derivaților menționați și cel al etilen ureei, care posedă în mod obligatoriu o conformație cis. Astfel ν_{NH} și ν_{CO} din etilen uree apar la frecvențe mai mari decît cele din de-

rivații neciclici, banda amidă II nu variază cu modificarea stării fizice și este situată la valori mai mici decât cea din ureele neciclice /185, - 190/.

XI.1.3. Analiza spectrelor de rezonanță magnetică nucleară ale derivaților de uree. Utilizarea spectrometriei rmn în studiul derivaților de uree furnizează informații asupra :

- a) echilibrului tautomer uree izouree, în soluții;
- b) vitezei de schimb, inter sau intramolecular, a protonilor amidici;
- c) ionizării și protolizei acestor derivați în soluții apoase, la diferite valori ale pH-ului;
- d) conformației și gradului de restricție al rotației libere în jurul legăturii C-N.

Caracteristic pentru spectrele rmn ale derivaților de uree sînt absorbțiile largi ale protonilor legați direct de atomii de azot. Studiul lor este îngreunat de dependența lor de temperatură solvent și pH precum și de influența momentului de quadrupol al atomului N^{14} /191-193/. În solvenți capabili să încetinească ritmul schimburilor intermoleculare de protoni (cum ar fi de ex. hexametil fosfor triamida), care induce formarea unor legături de hidrogen cu ureele, înregistrarea spectrelor se face în condiții mult îmbunătățite. În aceste condiții deplasările chimice ale protonilor NH pot fi utilizate în stabilirea tipului de uree analizat/192/

De asemenea studiul cuplajelor protonilor NH cu cei aparținînd radicalilor legați la același atom de azot furnizează o serie de informații privind :

- a) rotația liberă în jurul legăturii C-N /193/. Din acest punct de vedere derivații de uree se deosebesc net de amide, la care legătura C-N are un caracter mai pronunțat de dublă legătură. Cele două grupări metil din dimetil formamidă sînt asimetrice în timp ce cele patru grupări din tetrametil uree apar în spectrul rmn ca un singlet, ceea ce denotă

echivalența lor /191/.

b) viteza de schimb prototropic a protonilor NH cu mediu. Se poate aprecia că, în condiții normale cu excepția anumitor structuri, schimbul de protoni este suficient de lent pentru a nu anula cuplarea.

XI.2. Elemente structurale caracteristice derivaților de 1-(2-clor-etil)-1-nitrozouree, evidențiate spectrofotometric.

Ca și în cazul ureelor, difracția de raze X furnizează o imagine tangibilă a structurii sterice a derivaților de N-nitrozouree, ce ne permite o interpretare corectă a datelor spectrale furnizate de celelalte metode fizice. Un aport deosebit din acest punct de vedere îl aduce studiul MeCCNU prin difracție de raze X /194/.

Din diagrama stereoscopică astfel obținută (fig.1) și în urma determinării lungimilor legăturilor chimice și unghiurilor de valență rezultă că :

a) atomii grupării nitrozouree și atomii de carbon C_2 și C_4 , de care aceasta este legată, sînt aproape coplanari;

b) cele două legături C-N sînt inegale, $C - N = 1,431 \text{ \AA}$, $C - N = 1,323 \text{ \AA}$, această ultimă valoare indicînd un caracter parțial de dublă legătură /194/. Lungimea legăturii $C - N = 1,482 \text{ \AA}$, este tipică pentru o legătură simplă C-N /194/;

c) compararea valorilor obținute pentru lungimile legăturilor $N_1 - N_2 = 1,33 \text{ \AA}$ și $N_2 - O_1 = 1,218 \text{ \AA}$, sugerează preponderența formelor neasociate, deși între moleculele de nitrozouree se constată legături de hidrogen (slabe) între oxigenul cetonc (O_2) al unei molecule și atomul de hidrogen de la N_3 al alteia ($HN_3 \dots O_2 = 2,29 \text{ \AA}$) /184/.

- fig.1 -

XI.2.1. Elemente spectrale în ir caracteristice nitrozoureeilor.

Nitrozarea funcției ureidice determină următoarele schimbări caracteristice ale spectrelor ir :

a) nitrozarea funcției ureidice determină o creștere a frecvenței de absorbție a grupării carbonil ($\nu_{C=O}$ 1710 - 1740 cm^{-1}), ceea ce s-ar putea datora creșterii caracterului său de dublă legătură. Substituirea totală a N-nitrozoureelelor produce o scădere a frecvenței ν_{CO} /195/.

b) existența în soluție a unui singur izomer conformațional, trans-trans, 145. Ca argument în acest sens se aduce faptul că în soluții diluate, N-alkil-N-nitrozoureele prezintă ν_{NH_2} asim 3540 cm^{-1} și ν_{NH_2} sim 3420 cm^{-1} . La creșterea concentrației apar benzi noi, largi, la frecvențe mai joase, care se datorează, probabil, unor legături de hidrogen intramoleculare. În spectrul 1,3-dialkil nitrozoureelelor nu se constată un efect asemănător, această diferență în comportare datorându-se diferenței în accesibilitatea la protonii amidici (în 1,3-dialkil derivați NH este implicat în legături de hidrogen intramoleculare, în timp ce în cazul monoalkilureelor mai rămâne un proton disponibil pentru legături intermoleculare). Aceste atribuiri sînt susținute și de determinările efectuate în solvenți conținînd adaosuri de dioxan. Se știe că dioxanul este un excelent acceptor de H și deci poate forma ușor legături de hidrogen. Prezența lui în soluții diluate de mono și dialkil nitrozouree alterează spectrele, dar pentru ultimele este nevoie de concentrații considerabil mai mari de dioxan, pentru a rupe legăturile de hidrogen intramoleculare /195/.

c) analiza spectrelor ir ale derivaților de nitrozouree permite, în anumite cazuri, determinări conformaționale. Astfel, pentru 1-(2-clorociclohexil)-3-nitrozoureele, conformerii ecuatoriali au ν_{NH} în domeniul 3290-3340 cm^{-1} , la frecvențe ceva mai mici decît cei axiali, diferențe care nu se constată în cazul derivaților de uree precursori /28/.

XI.2.2. Elemente spectrale de rmn caracteristice derivaților de nitrozouree sînt :

deplasările chimice ale protonilor NH apar la frecvențe mai joase decît în amide și sînt mai net separate (cu 1,3 ppm, față de 0,7

ppm în amide) /195/ ;

- sînt, în anumite limite (233-340°K), independente de temperatură /195/.

Aceste date experimentale sînt în concordanță cu existența unor legături de hidrogen intramoleculare puternice, care determină o creștere a restricției rotației libere în jurul legăturii (O)C - N(NO) și de aici existența preferențială a unui singur conformer.

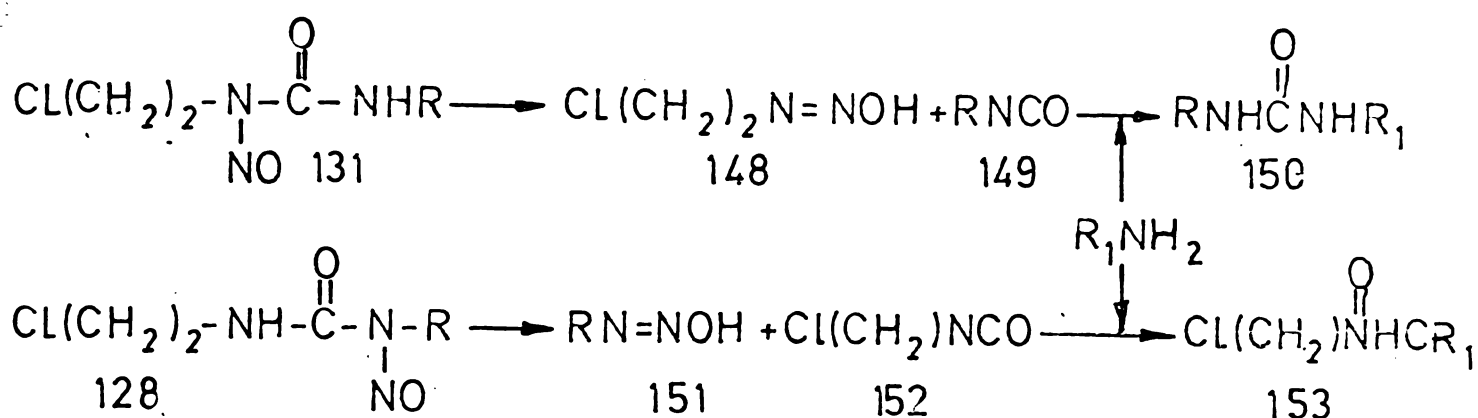
Spectrele rmn ale derivaților de nitrozouree 1,3-disubstituiți evidențiază absorbții bine rezolvate ale protonilor substituenților atașați la atomul de azot și o singură absorbție pentru NH.

XI.3. Determinarea cu ajutorul metodelor fizico-chimice de analiză, a purității izomerice a N-nitrozoureei.

Este evident că în cazul nitrozării derivaților de uree problema cheie, care se pune, este determinarea structurii și purității izomerice a produsului astfel obținut. În cazul particular al 1-(2-haloetil)-ureei se urmărește, de obicei, obținerea exclusivă a izomerului 1-(2-haloetil)-1-nitrozo, care pare a fi un inhibitor mult mai eficient al creșterii tumorale decît izomerul 3-nitrozo.

Pentru derivații de 2-cloretil nitrozouree, determinarea structurii și purității izomerice se face preferențial cu ajutorul a două metode: a) descompunere cu amine și b) spectrometrie rmn.

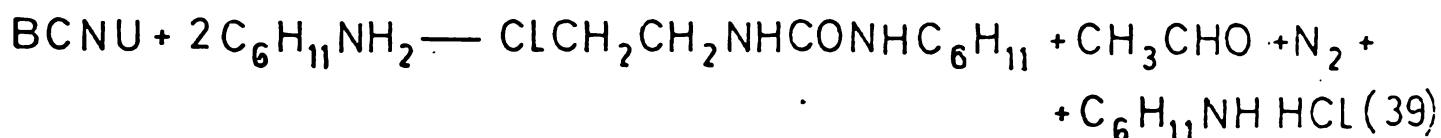
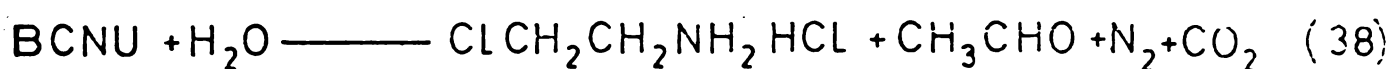
XI.3.1. Metoda descompunerii derivaților de N-nitrozouree în mediu bazic apos cu amine, utilizată în scopuri structurale se bazează pe următoarele fapte : 1) fiecare dintre cei doi izomeri, 128, 131, duce prin reacție cu amine la uree diferite; 2) această reacție are loc cantitativ; 3) ureele obținute, 150, 153, sînt compuși stabili ușor de caracterizat. Sirul de reacții pe care se bazează această metodă se poate reprezenta schematic astfel (schema 11) :



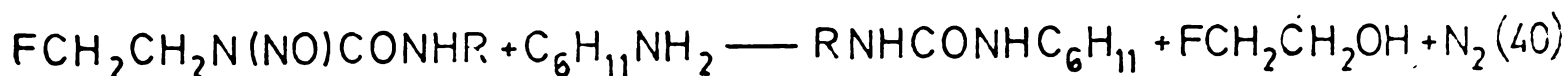
Schema 11

Obținerea cantitativă a unei singure uree este o dovadă aproape sigură a existenței unui singur izomer, pe când detectarea a doi produși indică, evident, un amestec de N-nitrozo izomeri. Izolarea unui singur produs, dar în cantitate mică, nu exclude posibilitatea unei nitrozări random /26,27/.

Inconveniențele acestei metode, în cazul 2-cloretilor nitrozoureeilor, se datoresc reacțiilor secundare ce se pot produce datorită labilității legăturii C-Cl. Astfel în cursul reacției poate să se formeze HCl, care neutralizează amina, aceasta din urmă trebuind să se găsească în exces (ec.38,39) /26,27/.



De subliniat că, descompunerea apoasă a 2-fluoretilor nitrozoureeilor, în prezența de amine, nu este complicată de eliminare de HF (ec.40) /26/.



Un alt inconvenient al acestei metode constă (pe lângă caracterul său laborios), în faptul că rezultatele pot fi interpretabile. Din acest motiv, actualmente, utilizarea ei în scopuri analitice este sporadică. Totuși, sînt cazuri în care ea rămîne metoda de elecție, ca de exemplu în stabilirea structurii unor N-nitrozoureee cu substituenți alchil rami-

ficați, unde datorită suprapunerii semnalelor rmn, această tehnică devine inoperantă /26/.

XI.3.2. Atribuirea structurii și purității izomerice derivaților de nitrozouree prin spectrometrie rmn. Pentru cazul 2-cloretii nitrozoureeilor, deosebirea spectrului rmn al grupării $N(NO)CONH-CH_2CH_2Cl$ (spectru A_2B_2X datorită cuplării protonilor NH cu protonii grupărilor metilen adiacente) față de cel al grupării $NHCON(NO)-CH_2CH_2Cl$ (A_2B_2) este evidentă și caracteristică /26,27/. În primul caz se obține un multiplet nerezolvat (pseudosinglet), pe când în cel de al doilea apar două triplete distincte și bine rezolvate /26,27/.

Un foarte frumos exemplu de rezolvare cu ajutorul spectrometriei rmn a structurii derivaților de nitrozouree, îl reprezintă studiile de rmn efectuate în clasa glicozil nitrozoureeilor, care au permis atât stabilirea purității izomerice cât și anomerice /36,127/. Astfel, apariția unui triplet în zona protonilor amidici (datorită cuplării NH cu CH_2CH_2Cl) este o dovadă a unei nitrozări random și din raportul intensităților semnalelor se poate stabili rația izomerică. Pe de altă parte, dat fiind că constantele de cuplare ale protonilor anomerici cu protonul vecin din carbonhidrat, au valori diferite pentru fiecare anomer (de ex. în cazul structurilor piranozice sînt mai mari pentru conformerul β), se poate deduce raportul conformerilor din amestec /36, 127/.

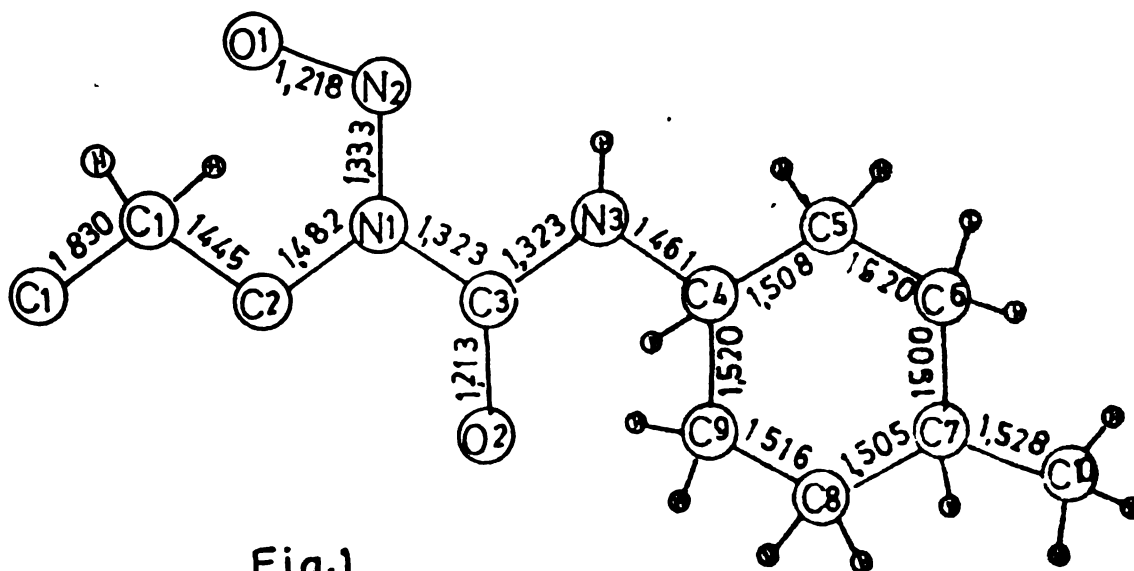


Fig.1

PARTEA A DOUA

.

CERCETARI PERSONALE

Partea a II-a

Cap.XII. Ipoteza de lucru

Sinteza și studiul derivaților de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree, tema prezentei lucrări, s-a impus atât prin actualitatea și ponderea pe care acest tip de compuși o au în chimioterapia cancerului, cât și prin aspectele deosebit de interesante și încă neelucidate pe care le ridică mecanismul lor de acțiune, ceea ce conferă speranța, justificată, de găsire a unor compuși mai activi.

Așa cum s-a arătat, intermediarii rezultați prin descompunerea enzimatică sau neenzimatică a N-NU, posedă fie capacitate alchilantă (prin eliberare de: carbocationi ca $\text{ClCH}_2\text{CH}_2^+$, etc.), fie carbamoilantă (prin eliberare de izocianați, RNCN), fiind capabili să interacționeze cu macromoleculele celulare (acizi nucleici sau proteine).

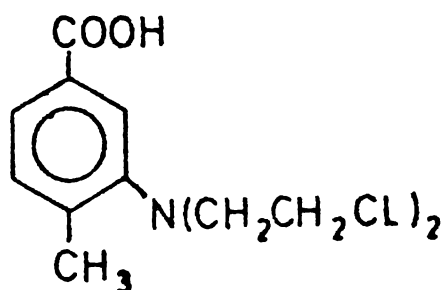
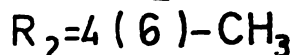
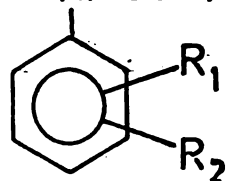
Corelările calitative sau cantitative structură chimică - activitate biologică, efectuate în această clasă, deși nu au condus la rezultate spectaculoase, au precizat totuși o serie de condiții structurale, care condiționează manifestarea unei activități antileucemice optime, și anume: a) activitate alchilantă ridicată; b) activitate carbamoilantă scăzută și c) o valoare a liposolubilității situată la limita superioară a intervalului propus de Hansch adică între $-1.0 \ll \log P \ll 2.0$ /106/.

Aceste date coroborate cu cele privind mecanismul de descompunere al N-NU, sugerează (fără să dovedească în mod direct acest lucru) că intermediarul alchilant este responsabil pentru activitatea antitumorală a acestor compuși iar cel carbamoilant pentru toxicitatea lor.

În dezvoltarea tezei am încercat o abordare rațională a domeniului N-NU atât pe baza unor considerente de această natură cât și unor corelări cantitative (QSAR) care să ne conducă la confirmarea, infirmarea sau evidențierea unor noi condiții structurale necesare unei activități anti-leucemice superioare.

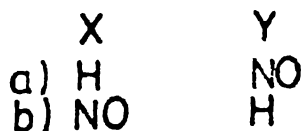
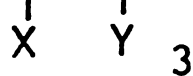
In acest scop proiectarea de noi compusi in aceasta clasă a urmă-

1.- Grefarea grupării 2-cloretil-nitrozouree pe structuri chimice cu proprietăți certe de transportor pentru alte funcțiuni citotoxice. Astfel sinteza derivaților aromatici de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree 1, s-a bazat pe datele acumulate în laboratorul nostru în cursul studiului întreprins asupra azotiperitelor, cînd acidul 3-amino-4-metilbenzoic s-a dovedit un transportor eficient al acestor funcțiuni ceea ce a permis obținerea unor derivați cu proprietăți antitumorale bune (dintre care acidul 3-bis-(2-cloretil)-amino-4-metil-benzoic, IOB-82, a intrat în uz clinic, fiind primul citostatic original românesc, 2 /196/.

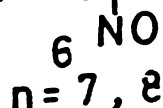
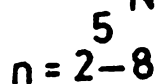
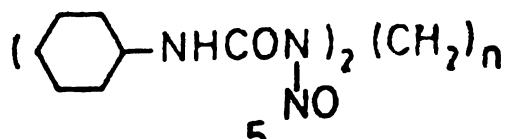
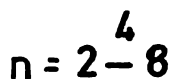
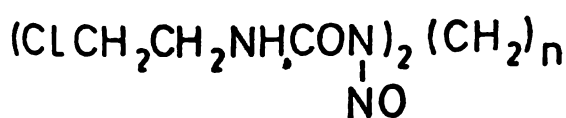


2.- Verificarea diferenței de activitate biologică între izomerii

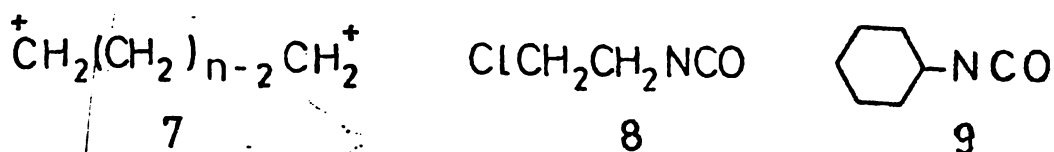
1-NO, 3a și 3-NO, 3b în cazul unor serii de bis nitrozouree alifatică și cicloalifatică omologe. După cum se știe, datele de literatură sînt unanime în a admite că din punct de vedere al activității biologice este in-



teresant numai izomerul 1-NO, 3a. Prin urmare, studiile noastre s-au îndreptat către sinteza de dinitrozo derivați de tipul 4, 5 și 6 din următoarele motive :



a) compuşii 4 și 5 (n=2-8) prin analogie cu schema de descompunere stabilită pentru BCNU ar trebui să conducă in vivo la dicarbocationi omologi, 7, și la izocianați diferiți (8 și respectiv 9). Dacă interacțiunea dintre dicarbocationii 7 și macromoleculele celulare este preponderentă,

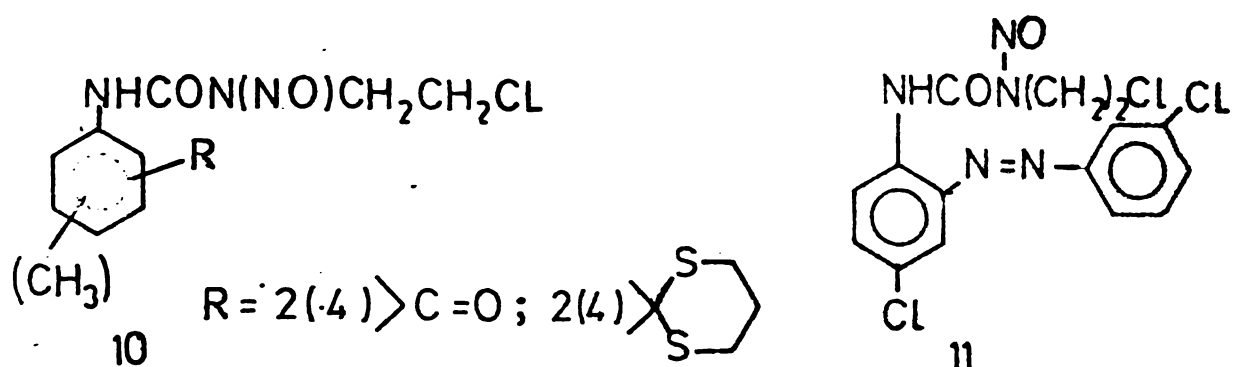


atunci este de așteptat ca ambele tipuri de compuşii să aibă acțiuni biologice similare. Dacă în schimb izocianații sînt intermediarii esențiali atunci efectul lor biologic ar trebui să fie diferit.

b) Prin compararea activității compuşilor 4 (izomeri 3-NO), cu cea a compuşilor 6 (izomeri 1-NO) s-ar putea obține, în conjuncție cu studiul schemei lor de descompunere, indicații suplimentare privind mecanismul de acțiune al N-NU.

c) În lumina celor discutate anterior derivații de tipul 4 și 5 ar trebui să prezinte o activitate superioară N-nitrozourelor cunoscute (CCNU, BCNU, etc.) deoarece există posibilitatea formării unor dicarbocationi care ar putea fi agenți de cross-linking mai puternici decît carbocationul 2-cloretii generat de derivații menționați anterior.

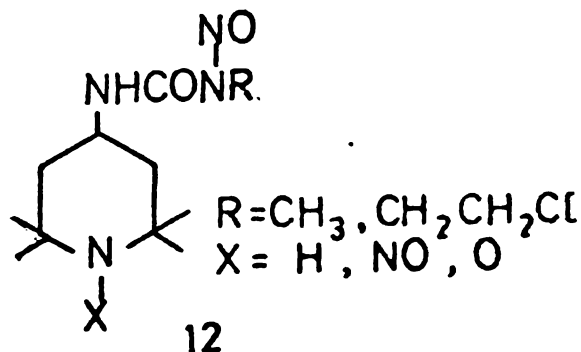
3.- Proiectarea unor compuşii capabili de activare metabolică (10, 11). Studiile privind metabolizarea N-nitrozourelor au evidențiat că CCNU suferă anterior descompunerii sale neenzimatice, o rapidă activare metabolică in vivo, și anume o hidroxilare a nucleului ciclohexanic. Hidroxi-intermediarii rezultați au o activitate biologică importantă, deși rolul lor farmacologic nu este încă lămurit. Se poate admite totuși că existența unor condiții structurale care să ușureze sau să orienteze această hidroxilare ar putea avea o influență pozitivă asupra activității biologice. În acest scop ne-am propus sinteza unor analogi de CCNU care să conțină în nucleul ciclohexanic grupări cetonice libere sau protejate (10).



O altă cale de îmbunătățire a proprietăților farmacologice ale capilor de serie (de ex. CCNU, BCNU) o constituie și încercarea de a reduce toxicitatea lor sistemică menținând activitatea anticancerasă la un nivel acceptabil. În acest sens s-a arătat că oferirea posibilității unei carbamoilări intramoleculare (prin grefare pe moleculă a unor grupări nucleofile ușor accesibile), conduce în unele cazuri, la compusi cu activitate antileucemică remarcabilă și cea ce este important asociată unei toxicități scăzute (de ex. clorozotocina) /35/. Proiectarea unor 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree aromatice cu grupări diazo-capabile de a fi reduse enzimatic, 11, la aminele corespunzătoare constituie o tentativă de confirmare a acestei ipoteze.

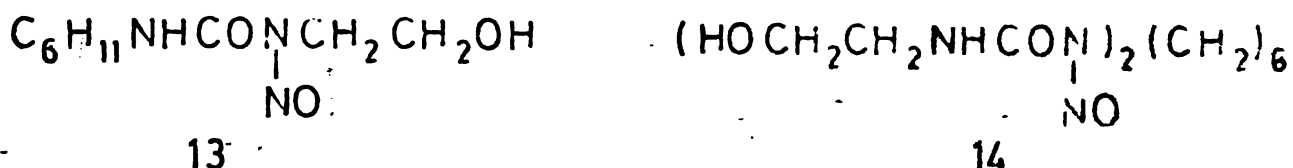
4.- Grefarea funcțiunii N-nitrozouree pe structuri noi, cu proprietăți farmacologice cunoscute, în vederea găsirii unor noi capi de serie exploatabili. Din acest punct de vedere ni s-au părut interesant de sintetizat derivații de triaceton-amină, 12, deoarece :

a) se respectă o condiție structurală, ce pare esențială pentru

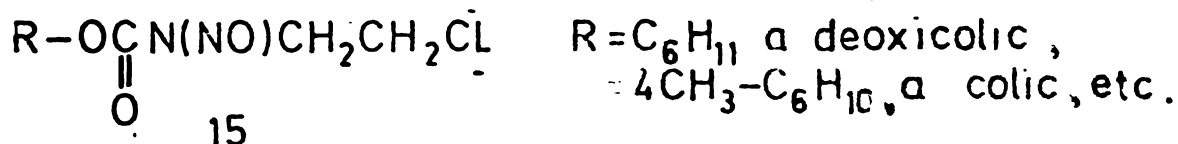


activitate, aceea de legare a funcțiunii NU de un ciclu asemănător steric ciclohexanului /59/, și b) există posibilitatea obținerii pe această cale a unor N-nitrozouree cu markeri de spin, care se pretează excelent unor studii de metabolizare și distribuție în organism (farmacocinetică). Mai trebuie menționat că printre derivații de triaceton amină se numără și compuși cu proprietăți de radiosensibilizatori hipoxici, evident foarte interesanți în chimioterapia cancerului.

5.- În sfârșit modificările inedite aduse structurii 1-(2-cloretil)-nitrozouree prin sinteza unor 1-(2-hidroxietil)-nitrozouree, izomeri 1-NO,



13, sau 3-NO, 14, sau prin sinteza de N-(2-cloretil)-N-nitrozourétani, 15, vor permite lărgirea ariei studiilor cantitative și calitative de



tip structură-activitate ce constituie ultima parte a acestei lucrări.

Sinteza și proprietățile noilor compuși, proiectați pe baza acestor considerente teoretice, sînt prezentate în continuare după o clasificare ce ține seama, în primul rînd, de înrudirile structurale și de metodologia lor de sinteză, și doar în subsidiar de considerentele expuse în acest capitol. S-a căutat totuși ca gruparea compușilor noi obținuți să respecte, pe cît posibil, ambele criterii.

XIII . Sinteza unor noi derivați de N-nitrozouree

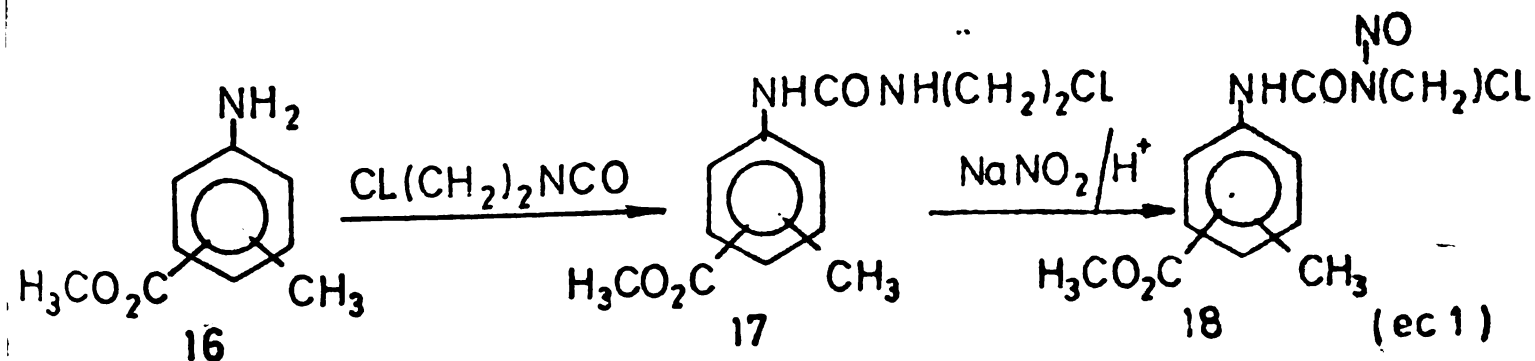
Proiectarea de noi compuși din această clasă a urmărit, așa cum am arătat în capitolul precedent, atât obținerea de noi structuri potențial antileucemice cît și introducerea unor modificări structurale, care să permită obținerea unor indicații suplimentare asupra mecanismului lor de acțiune.

S-au sintetizat și caracterizat următoarele tipuri de N-nitrozouree (precum și intermediarii corespunzători) :

1. 1-(2-cloretil)-1-nitroso-3-aryluree ;
2. Derivați homo și hetero-cicloalifatici de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree :
 - 2.1. Analozi de CCNU și MeCCNU substituiți la inelul ciclohexanic
 - 2.2. 2,2,6,6,-tetrametil-4-piperidinil nitrozouree
 - 2.3. 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree policiclice.
3. Derivați alifatici de bis/1-(2-cloretil)-1(3)-nitrozouree/ și bis/1-(ciclohexil)-3-nitrozouree/.
4. Derivați alifatici și cicloalifatici de 1-(2-hidroxietil)-1(3)-nitrozouree.
5. Derivați de N-(2-cloretil)-N-nitrozouretani.
6. Procedeu de obținere a 2-cloretil izocianatului.
7. Procedeu tehnologic de preparare a CCNU.

XIII.1. Sinteza 1-(2-cloretil)-1-nitroso-3-aryl ureelor

S-au sintetizat atât derivații corespunzători acidului 4-metil-3-amino-benzoic (molecula transportoare a grupării azotiperitice în cazul derivatului IOB-82, 2) cât și ai altor acizi toluici înrudiți. 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureele acizilor toluici, 18 (a-c) s-au obținut prin tratarea aminelor corespunzătoare, 16 (a-c) , cu 2-cloretil izocianat și nitrozarea 2-cloretil ureelor astfel obținute, 17 (a-c), cu NaNO_2 în mediu acid, conform schemei de mai jos (ec.1).



Aminele aromatice precursoare, 16 (a-c), s-au obținut prin nitrozarea esterilor acizilor toluici, separarea izomerilor și reducerea lor catalitică (Pd/C), conform procedurilor cunoscute /197/.

Derivații de aril uree, 17, au fost preparați prin două procedee și anume :

a) prin cuplarea aminelor aromatice cu 2-cloretil izocianat; 17 (a-c), (metoda A); cap.XVIII.1.

b) prin cuplarea izocianatilor aromatici (ex.tolil-diizocianat) cu 2-cloretil amină; 17d (metoda B); cap.XVIII.1.

Reacțiile de cuplare se efectuează în solvenți aprotici, la rece, după care se lasă să se definitiveze la temperatura camerei. În general produșii precipită din mediul de reacție fie direct, fie la adăugare de solvenți potriviți. Ei se purifică prin triturare cu apă, alcool sau prin recristalizare din amestecuri alcool-apă.

Caracteristicile analitice ale noilor compuși 17, sînt sumarizate în tabelul 1. Spectrele ir efectuate în vederea confirmării structurilor propuse sînt date în tabelul 28 și discutate în cap.XIV.1.

- tabel 1 -

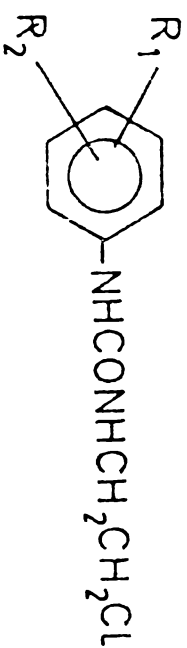
Nitrozarea derivaților de uree 17(a-e) s-a făcut utilizînd două variante și anume :A) HCOOH 98-100% și NaNO₂ solid; B) H₂SO₄ diluat și NaNO₂ solid. Este interesant de observat că se obțin, cu randamente acceptabile, compușii doriți, 18, izomerici puri (verificați cu ajutorul spectrelor de rnm) și prin folosirea acidului sulfuric diluat ca mediu de reacție (metoda B). Totuși mediul de elecție pentru obținerea 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureeilor rămîne HCOOH 98-100% (metoda A); cap.XVII.1.

Caracteristicile analitice ale derivaților de N-nitrozoureee obținuți sînt sumarizate în tabelul 2, iar datele spectrelor sînt discutate în cap.XIV. Pe baza acestora (în special a celor de rezonanță magnetică nucleară - rnm - cap.XIV.2. tabel 17,18), rezultă că s-au obținut în toate cazurile izomerii 1-(2-cloretil)-1-nitrozo.

- tabel 2 -

Tabel 1

Caracteristicile analitice ale derivaților aromatici
de 1-(2-cloretill)-uree, 17(a-e)



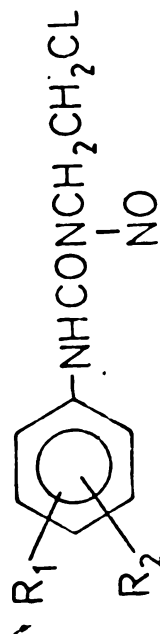
Nr. comp.	R ₁	R ₂	Procedeu (a)	Mediu reacție	Solvent recristalizare	n _D	pt ^o C	analiză elementară %			
								C	H	N	Cl
17a	3-COOCH ₃ ^(b)	4-CH ₃	A	CHCl ₃	EtOH	97	154	52,90	5,75	10,45	13,52
17b	2-COOCH ₃ ^(b)	6-CH ₃	A	CHCl ₃	EtOH	52	144-6	53,49	5,82	10,56	13,52
17c	2-COOCH ₃ ^(b)	4-CH ₃	A	C ₆ H ₆ , DMF	-	70	166-8	52,99	5,66	10,50	13,75
17d	3-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl ^(c)	4-CH ₃	B	C ₆ H ₆	-	72	204-6	47,10	5,25	17,05	21,31
17e			A	C ₆ H ₆	C ₆ H ₆	63	125	48,92	3,91	15,15	29,16

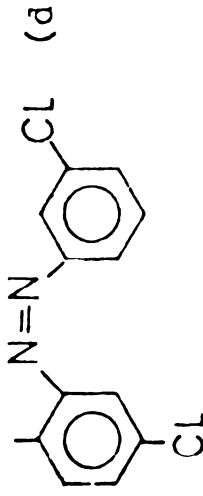
a) Procedee cuplare: A, R₁R₂C₆H₃NH₂ + ClCH₂CH₂NCO; B, R₁R₂C₆H₃NCO + H₂NCH₂CH₂Cl; b) Formula C₁₂H₁₅N₂O₃Cl, calc. %: C=53,23; H=5,59; N=10,35; Cl=13,09; c) Formula C₁₃H₁₈N₄O₂Cl₂, calc. %: C=46,85; H=5,45; N=16,81; Cl=21,27. d) Formula C₁₅H₁₃N₄OCl₃, calc. %: C=48,46; H=3,50; N=15,08; Cl=28,66.

Tabel 2

Caracteristicile analitice ale derivaților aromatici de

1-(2-cloretil)-1-nitrozouree, 18(a-e)



Nr. comp.	R ₁	R ₂	Procedeu (a)	n%	pt°C	Analiza elementară (găsit %)		
						C	H	N Cl
18a	3-COOCH ₃ (b)	4-CH ₃	A	50	98	48,10	4,85	13,97 11,79
18b	2-COOCH ₃ (b)	6-CH ₃	A	53	71-2	48,20	5,10	14,15 11,05
18c	2-COOCH ₃ (b)	4-CH ₃	B	89	96-8	47,61	5,18	13,90 12,23
18d	3-NHCN(NO)CH ₂ CH ₂ Cl (c)	4-CH ₃	B	77	100	40,00	4,51	20,88 18,36
18e			B	85	86	-	-	16,73 -

a) Procedee de nitrozare: A, H₂SO₄:H₂O/NaNO₂; B, HCOOH 98-100%; b) Formula C₁₃H₁₆N₆O₄Cl₂, calc%: C = 39,90; H = 4,12; N = 21,48; Cl = 18,12; c) Formula C₁₂H₁₄N₃O₄Cl, calc %: C = 48,08; H = 4,72; N = 14,02; Cl = 11,83; d) Formula: C₁₅H₁₂N₅O₂Cl₃ calc %: N = 17,28.

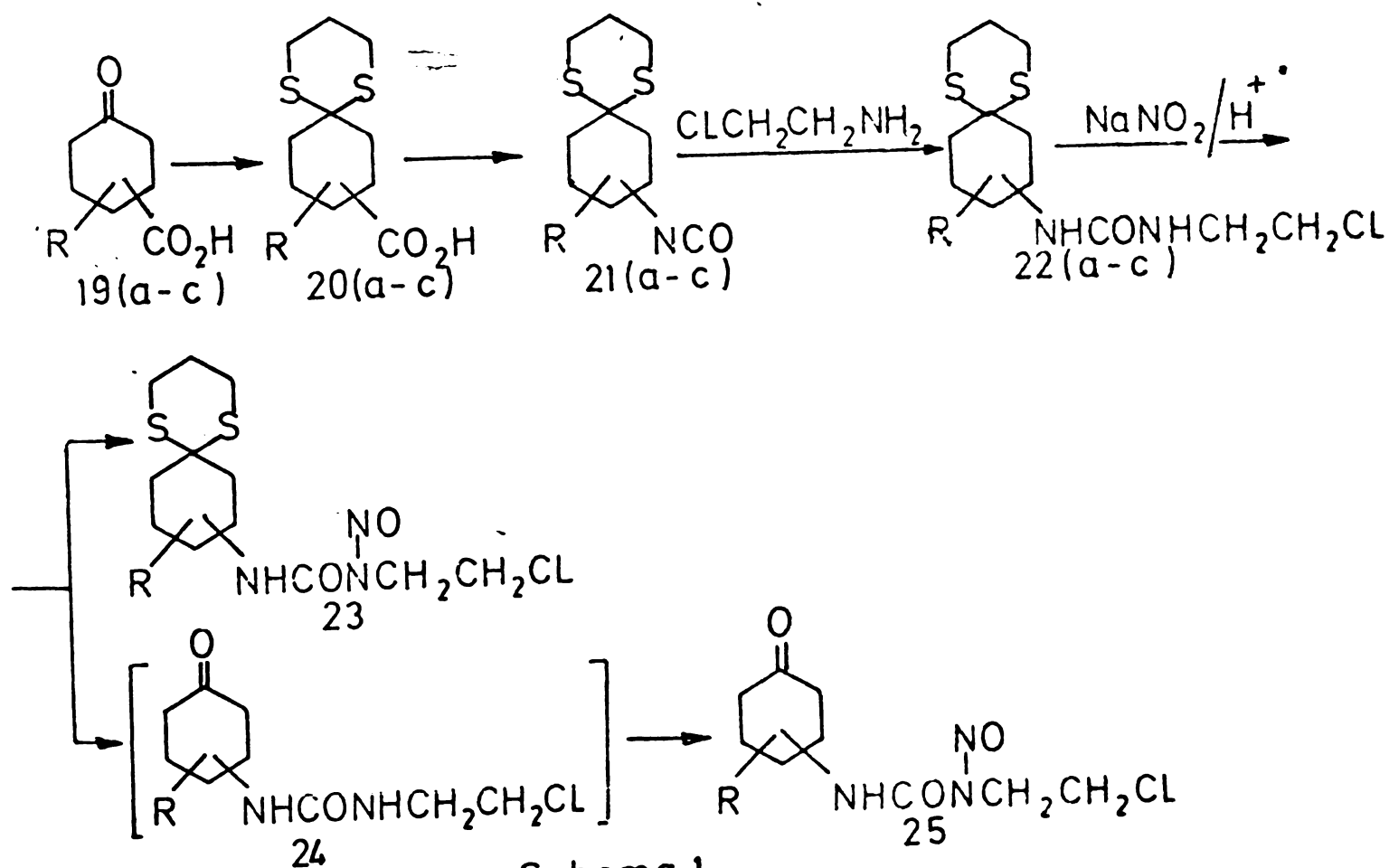
XIII.2. Derivați homo și hetero cicloalifatici de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree.

XIII.2.1. Analogi de CCNU și MeCCNU substituiți la inelul ciclohexanic.

S-a urmărit obținerea 1-(2-cloretil)-1-nitrozoureeilor derivate de la 2- și 4-ciclohexanonele corespunzătoare, în vederea clarificării rolului pe care l-ar putea juca unii produși de oxidare enzimatică, de acest tip, ai CCNU sau MeCCNU, în determinarea activității lor anticancerose.

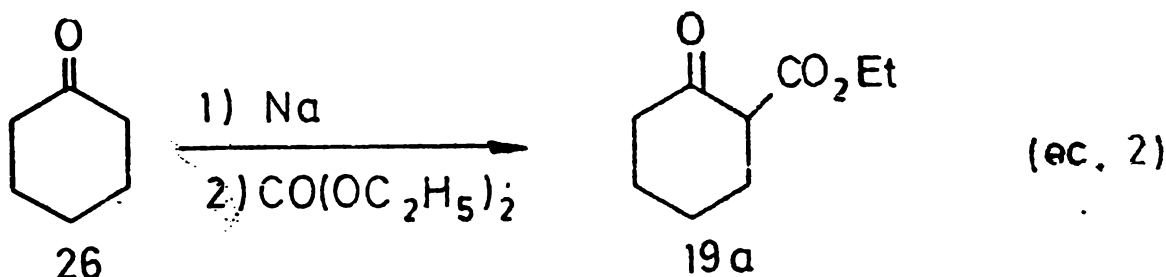
În cadrul schemei de sinteză propusă, pentru protejarea grupării cetonice, s-au preparat 1,3-ditianiil compuşii corespunzători. În vederea explorării proprietăților biologice a acestor structuri, s-au sintetizat și nitrozoureeele corespunzătoare. Compuşii noi din această serie pot fi reprezentați prin formula generală 10.

Schema de sinteză parcurge următoarele etape (schema 1) :



Acizii ciclonexanon carboxilici, 19(a-c), s-au obținut conform unor procedee cunoscute din literatură și anume :

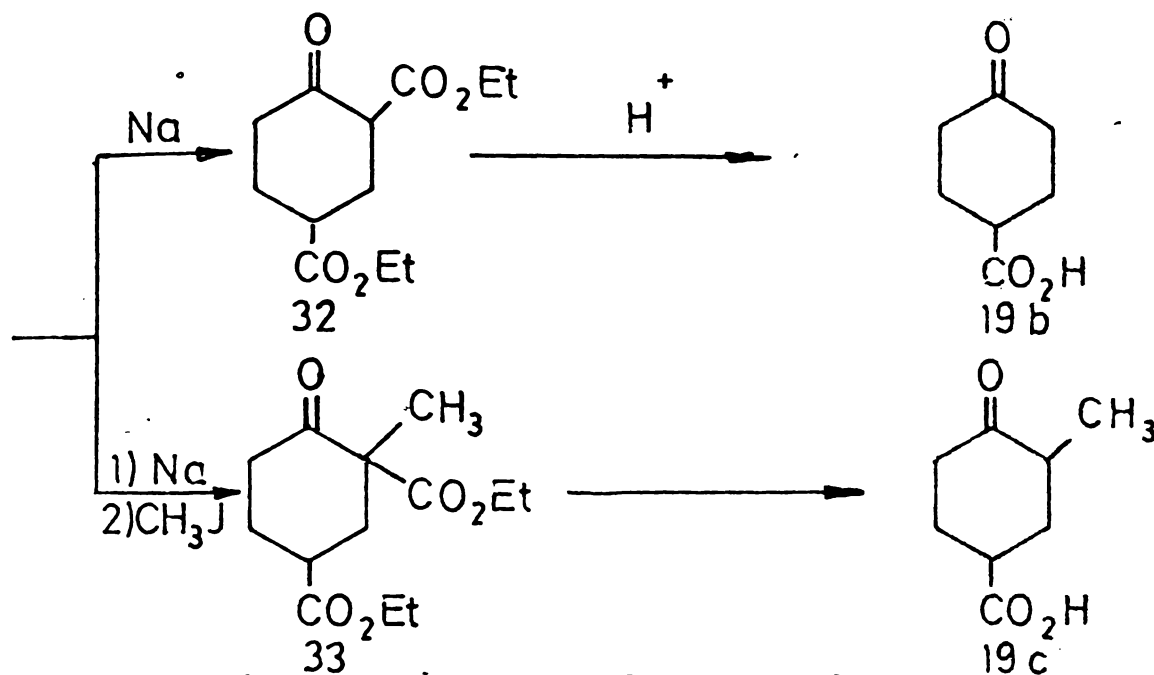
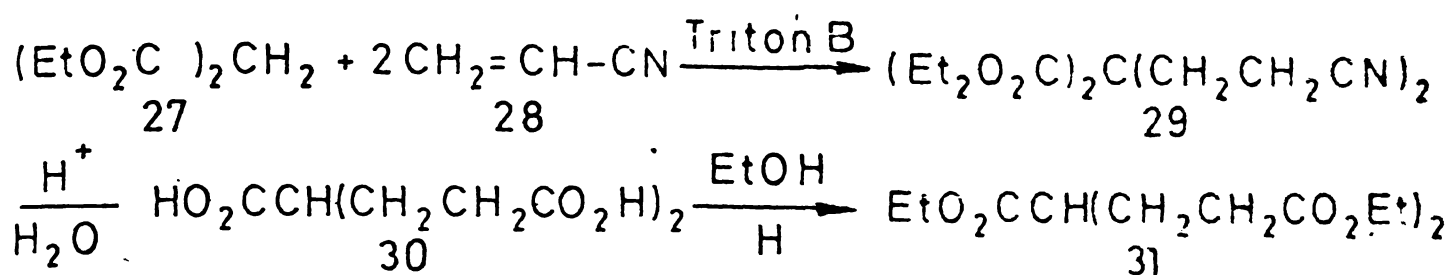
- esterul acidului 2-ciclohexanon carboxilic, 19a, prin carboxilarea ciclohexanonei (ec.2) ;



- acizii 4-ciclohexanon carboxilici, 19b,c, prin sinteză de ciclu /198/. Sinteza acidului 19b se realizează printr-un procedeu în cinci etape și care constă în condensarea acrilonitrilului cu ester malonic sodat, urmată de hidroliza dinitrilului 29, cu formarea acidului pentantricarboxilic, 30. Acesta se esterifică și printr-o condensare Dieckmann conduce la diesterul acidului ciclohexanon 2,4-dicarboxilic, 32. Prin hidroliză acidă și decarboxilare 32 produce într-o singură fază acidul 4-ciclohexanon carboxilic, 19b. Metilarea esterului acidului pentantricarboxilic, 31, cu iodură de metil, conduce, urmând aceeași secvență de reacții la acidul 3-metil-4-ciclohexanon carboxilic, 19c (schema 2) /198,199/.

Protejarea grupării cetonice a acizilor 19 s-a făcut cu 1,3-propan-ditiol, reactiv ce permite obținerea în condiții blinde a compuşilor ditianați corespunzători /200/. Ditianarea a fost preferată catalizării datorită stabilității mai mari a 1,3-ditianiilor derivaților, mai ales în mediu basic /200/. S-au obținut astfel următorii trei acizi nedescrși în literatura de specialitate, și anume : acidul 1,5-ditiaspiro[5,5]-undecan-6-carboxilic, 20a ; acidul 1,5-ditiaspiro[5,5]-undecan-8-carboxilic, 20b și acidul 1,5-ditiaspiro[5,5]-undecan-6-metil-8-carboxilic 20c a căror structură a fost confirmată prin analiză elementară și spectroscopie ir (tabel 3); cap.XVII.2.1. Aceștia servesc ca punct de plecare, conform schemei 1, la obținerea N-nitrozo derivaților doriți.

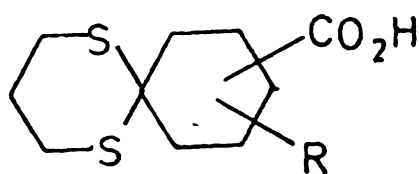




Schema 2

Tabel 3

Caracteristicile analitice ale acizilor 1,5-ditiaspiro[5,5] undecan-carboxilici, 20 (a-c)



Nr.	R	pt ^o C	n %	analiză elementară %		
				C	H	S
<u>20a</u> , 6-CO ₂ H ⁽¹⁾	H	192-3	80,4	51,74	7,36	27,17
<u>20b</u> , 8-CO ₂ H ⁽¹⁾	H	140-2	87	51,86	7,46	27,35
<u>20c</u> , 8-CO ₂ H ⁽²⁾	6-CH ₃	156-8	87	54,00	7,57	25,64

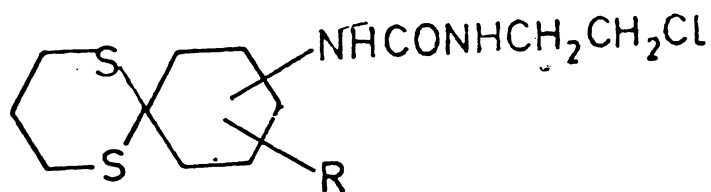
1) Formulă C₁₀H₁₇O₂S₂, calc. %: C=51,72; H= 6,9; S= 27,58

2) Formulă C₁₁H₁₉O₂S₂, calc. %: C=53,60; H= 7,32; S= 26,02.

Acizii 1,5-ditiaspiro [5,5]-undecan carboxilici, 20(a-c), sînt transformați prin metoda Curtius modificată. (Weinstock) /201/ în anhidridele mixte corespunzătoare, care fără a fi izolate sînt trecute în carbazidele respective folosind azidă de sodiu. Acestea imediat după izolare, sînt dizolvate în solvenți organici aprotici (CHCl_3 , C_6H_6), uscate și apoi degradate termic la izocianați. Reacția este controlată spectrofotometric în ir(urmărind dispariția absorbției caracteristice azidei $\nu_{\text{N}_3} \sim 2150 \text{ cm}^{-1}$ și apariția maximului intens de la $\sim 2270 \text{ cm}^{-1}$ datorat vibrației de grup ν_{NCO}). Izocianații rezultați, 21(a-c), sînt cuplați, fără izolare cu 2-cloretii amina; cap.XVIII.2.1. Caracteristicile analitice ale ureelor astfel obținute, 22(a-c), au fost tabelate (tabel 4), iar cele spectrale sînt discutate în cap.XIV.1, cap.XIV.2. și cap.XVIII.2.1. tabel 29. Conform acestor date structurile obținute corespund celor propuse.

Tabel 4

Caracteristicile analitice ale derivaților de 1-(2-cloretii)-3-1,5-ditiaspiro [5,5]-undecanil -uree, 22(a-c)



Nr.	R	pt ^o C	n _D	analize elementare %			
				găsit			
				C	H	N	Cl
<u>22a</u> , 6-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl ⁽¹⁾	H	131-2	35	47,01	6,77	8,86	11,61
<u>22b</u> , 8-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl ⁽¹⁾	H	144-6	40	46,78	7,03	8,86	11,91
<u>22c</u> , 8-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	6-CH ₃	133-6	38	47,92	7,11	8,72	11,38

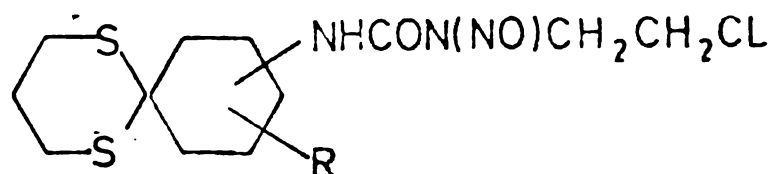
1) Formula $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{OS}_2\text{Cl}$, calc. %: C = 47,69; H = 6,81; N = 9,08; Cl = 11,42

2) Formula $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{OS}_2\text{Cl}$, calc. %: C = 48,38; H = 7,13; N = 8,68; Cl = 10,81

Nitrozarea derivaților de uree, 22(a-c), se efectuează în acid acetic glacial cu NaNO_2 solid. N-nitrozoderivații se extrag cu eter etilic, după diluarea amestecului de reacție cu apă. Extractele eterice după spălare, uscare și concentrare conduc la uleiuri care se purifică prin cromatografiere pe coloane de Kisselgur, folosind ca eluent CHCl_3 . Datele analitice ale acestor compusi, 23(a-c), sînt prezentate în tabelul 5, iar cele spectrale în cap.XIV.1, cap.XIV.2 tabel 17,18 și cap.XVIII.2.1. tabel 30 și ele corespund structurilor propuse.

Tabel 5

Caracteristicile analitice ale derivaților de 1-(2-cloretil)-3-1,5-ditiaspiro [5,5]-undecanil -1-nitrozouree, 23(a-c)



Nr.	R	pt ^o C	η %	analize elementare %			
				Măsit			
				C	H	N	Cl
<u>23a</u> ,6-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl ⁽¹⁾	H	ulei	96	43,05	6,39	12,63	10,11
<u>23b</u> ,8-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl ⁽¹⁾	H	93-95	90	43,21	6,30	12,05	10,15
<u>23c</u> ,8-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl ⁽²⁾	6-CH ₃	ulei	95	44,53	6,10	11,62	10,54

1) Formula $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2\text{Cl}$, calc. %: C=42,67; H=5,93; N=12,45; Cl=10,51.

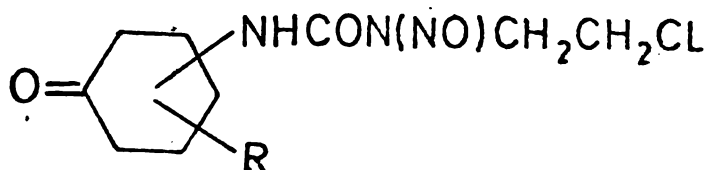
2) Formula $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2\text{Cl}$, calc. %: C=44,39; H=6,26; N=11,95; Cl=10,09.

În mod neașteptat, nitrozarea derivaților de uree, 22(a-c), cu NaNO_2 solid în HCOOH 98-100%, are loc concomitent cu clivarea restului ditiamic. Reacția permite obținerea, cu randamente destul de mici, a ciclohexanon-N-nitrozoureeilor corespunzătoare, 25(a-c), dovedindu-se a fi totodată și o metodă elegantă de deprotejare a grupării cetonice. Compusii sînt izolați după diluarea și filtrarea mediului de reacție, prin extrac-

ie cu CHCl_3 . Extractele cloroformice, spălate și uscate, sînt concen-
rate la 1/4 din volum și precipitate cu eter de petrol; cap.XVIII.2.1.
Caracteristicile analitice ale noilor compuși (tabel 6) cît și cele
spectrale (cap.XIV.1, cap.XIV.2 tabel 18 și cap.XVIII.2.1. tabel 31) cor-
ordă cu structurile propuse.

Tabel 6

Caracteristicile analitice ale derivaților de 1-(2-cloretil)-
3(ciclohexan-2,4-onă)-1-nitrozouree, 25(a-c)



Nr.	R	p.t ^o C	$\eta\%$	analize elementare %				
				C	H	N	Cl	
<u>25a</u> ,	2-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl ⁽¹⁾	H	ulei	59	43,30	5,98	16,65	14,80
<u>25b</u> ,	4-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl ⁽¹⁾	H	50	70	43,78	6,09	16,54	14,75
<u>25c</u> ,	4-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl ⁽²⁾	2-CH ₃	56	73	46,24	6,51	15,81	13,49

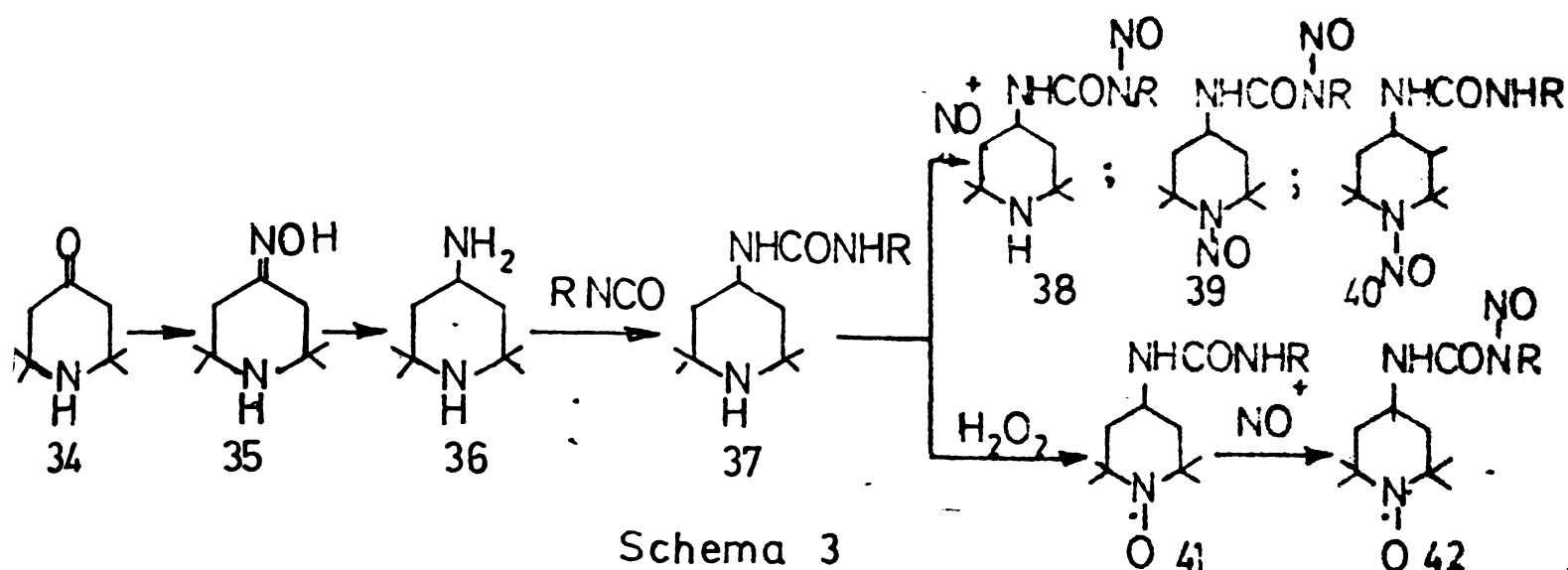
1) Formulă $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}$ calc % : C=43,64; H=5,66; N=16,99; Cl=14,34

2) Formulă $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}$ calc% : C=45,89; H=6,12; N=16,06; Cl=13,58

XIII.2.2.2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidiniluree și nitrozouree

In vederea obținerii unor N-nitrozouree noi cu markeri de spin, a
cărora comportare atât in vitro cît și in vivo ar putea fi studiată mai
fidel folosind metoda rezonanței electronice de spin, s-au sintetizat
cîteva 2-cloretil și metiluree derivate de la triaceton-amină, care
ulterior au fost nitrozate. Drept marker de spin s-a folosit gruparea
implicată în ciclul de 6 atomi, al triaceton-aminei.

Schema de sinteză a fost următoarea (schema 3) :



Sinteza triaceton-aminei, 34, și a oximei corespunzătoare, 35, s-a făcut după metodele cunoscute /202,203/. Conform datelor de literatură reducerea oximei cu Na metalic în alcool izoamilic, conduce printr-o metodă laborioasă și cu randamente mici la amina 36 /204,205/. Această metodă a fost îmbunătățită în cadrul lucrării de față, prin efectuarea reacției în n-propanol și extracția aminei cu eter etilic, fără prelucrări suplimentare, elaborându-se un procedeu comod, reproductibil și cu randamente de 60-70% de obținere a acestui intermediar (cap.XVIII.2.2.1).

Derivații de uree 37, care nu sînt descriși în literatura de specialitate, se obțin prin cuplarea aminei 36 cu metil respectiv 2-clor-etil izocianat, în eter de petrol la 10-15°; cap.XVIII.2.2. Datele analitice privind noii compuși 37(a-d) sînt sumarizate în tabelul 7. Datele spectrale (ir și rmn) sînt comentate în cap.XIV, tabel 17,18, cap.XVIII 2.2. tabel 32.

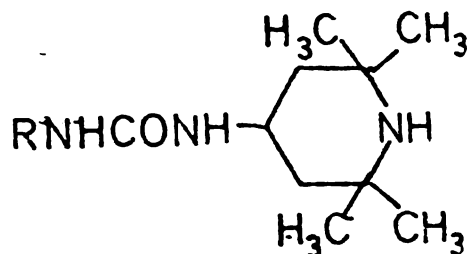
- tabel 7 -

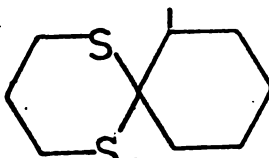
Derivații de uree 37 au fost fie nitrozați direct, fie întii oxidați la atomul de azot al heterociclului și apoi nitrozați.

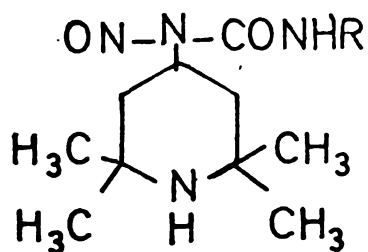
Teoretic, prin nitrozarea acestor compuși(37) se pot forma 5 nitrozoderivați izomeri și anume : trei mono-N-nitrozo derivați 38, 39 și 43 și doi dinitrozo derivați (40 și 44). Practic nu s-a constatat formarea izomerilor 3-N-nitrozo (43 și 44); (cap.XVIII.2.2.), ceilalți însă putînd fi obținuți în funcție de condițiile de lucru.

Tabel 7

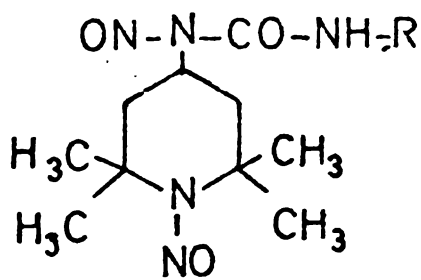
Caracteristicile analitice ale 3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-ureelor, 37 (a-d)



Nr.	R	pt °C	η%	analiză elementară							
				calculat				găsit			
				C	H	N	Cl	C	H	N	Cl
<u>37a</u>	CH ₃	194-7	85,50	61,97	10,80	19,72	-	61,80	10,68	19,81	-
<u>37b</u>	CH ₂ CH ₂ Cl	108-9	87,00	55,08	9,18	16,06	13,56	54,69	9,38	16,17	13,35
<u>37c</u>	C ₆ H ₁₁	90	84,00	68,33	11,03	14,95	-	-	-	14,70	-
<u>37d</u>		212-15	89,00	59,22	9,09	10,90	-	59,00	8,95	10,08	-



43



44

S-a evidențiat că mediul optim de nitrozare este acidul acetic 50% din care prin varierea condițiilor de reacție (raport reactanți, durată de reacție, mod de prelucrare) se pot obține izomerii de tip 33, 39 și 40, a căror structură a fost elucidată cu ajutorul spectrometriei de rezonanță magnetică nucleară (cap.XIV, tabel 17,18).

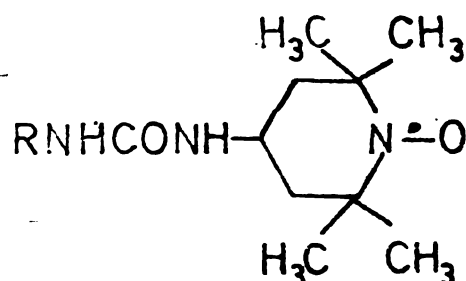
N-oxidarea derivaților de uree, 37, se face cu H₂O₂ 30%, wolframă de Na și EDTA /206-209/, conducând la nitroxizii 41, ce prezintă un spectru RES caracteristic. Probleme deosebite le ridică obținerea în stare pură

a compusului 41b.

Caracteristicile analitice ale nitroxizilor de acest tip sînt prezentate în tabelul 8, iar cele spectrale în ir și res în cap.XIV, tabelele 20 și respectiv 33.

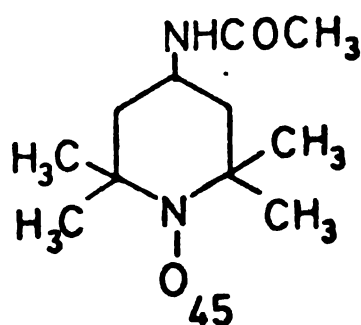
Tabel 8

Caracteristicile analitice ale 3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil-1-oxi)-ureelor 41 (a-d)



Nr.	R	pt °C	η%	analiză elementară							
				calculat				găsit			
				C	H	N	Cl	C	H	N	Cl
<u>41a</u>	CH ₃	133	75	57,89	9,65	18,42	-	57,50	9,45	18,10	-
<u>41b</u>	ClCH ₂ CH ₂	108	45	52,08	8,32	15,19	12,84	-	-	15,15	12,5
<u>41c</u>	C ₆ H ₁₁	60	35	64,86	10,13	14,19	-	64,70	10,20	14,00	-
<u>41d</u>		275	30	49,14	7,33	9,05	-	48,64	7,57	9,08	-

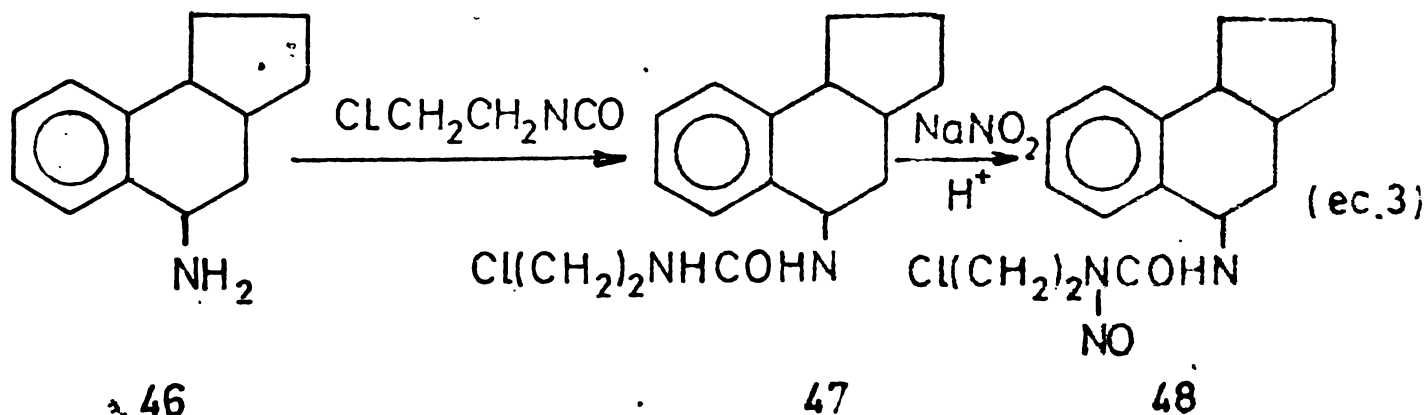
Nitrozarea derivaților de uree nitroxidici, 41, se realizează în acid acetic 50%, la rece, cu azotit de sodiu. Derivații finali se izolează din mediul de reacție prin extracție cu eter, spălarea atentă, uscare, și evaporarea subvacuum a acestor extracte; cap.XVIII.2.2. Incercările



noastre de a nitroza, în aceste condiții, amida 45, au ecuat. Acest fapt a fost folosit ca argument împotriva posibilității de formare a izomerilor 3-NO, în cazul N-oxizilor, unde determinările de rnm nu sînt posibile. Caracteristicile analitice ale N-nitrozoureeilor de tip 38, 39, 40 și 42 sînt prezentate în tabelul 9, iar cele structurale în cap.XIV, tabel 20 și 34.

- tabel 9 -

XIII.2.3.1-(2-Cloretil)-1-nitrozoureeele policiclice sînt reprezentate prin sinteza 1-(2-cloretil)-3-[8-(5',6'-benzo)-hexahidroindanil]-1-nitrozoureei, 48, (ec.3), obținut prin cuplarea aminei 46 (sintetizată de Dr.A.Glatz, Centrul de Chimie Organică) cu 2-cloretil-izocianat și nitrozarea ureei rezultate 47. Nitrozarea se realizează pe calea obișnuită, obținîndu-se, ca în general în cazul derivaților cicloalifatici cu cicluri de 6 atomi exclusiv izomerul 1-nitrozo.



Structura compusului 48 a fost confirmată de datele analitice și spectrale obținute (cap.XVIII².3.).

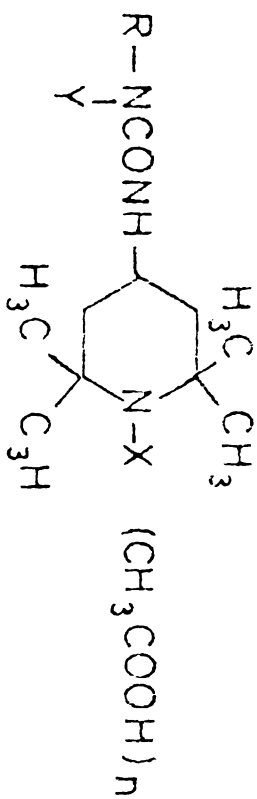
XIII.3. Derivați alifatici de bis/1-(2-cloretil)-1(3)-nitrozouree/ și bis/1-ciclonexil-3-nitrozouree/.

XIII.3.1. Derivați alifatici de bis /1-(2-cloretil) sau ciclohexil-3-nitrozouree/.

În vederea realizării unor derivați cu proprietăți farmacologice superioare cît și pentru obținerea de informații suplimentare privind

Table 9

Characteristic IR analytical derivatives of 3-(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)-nitrosourea

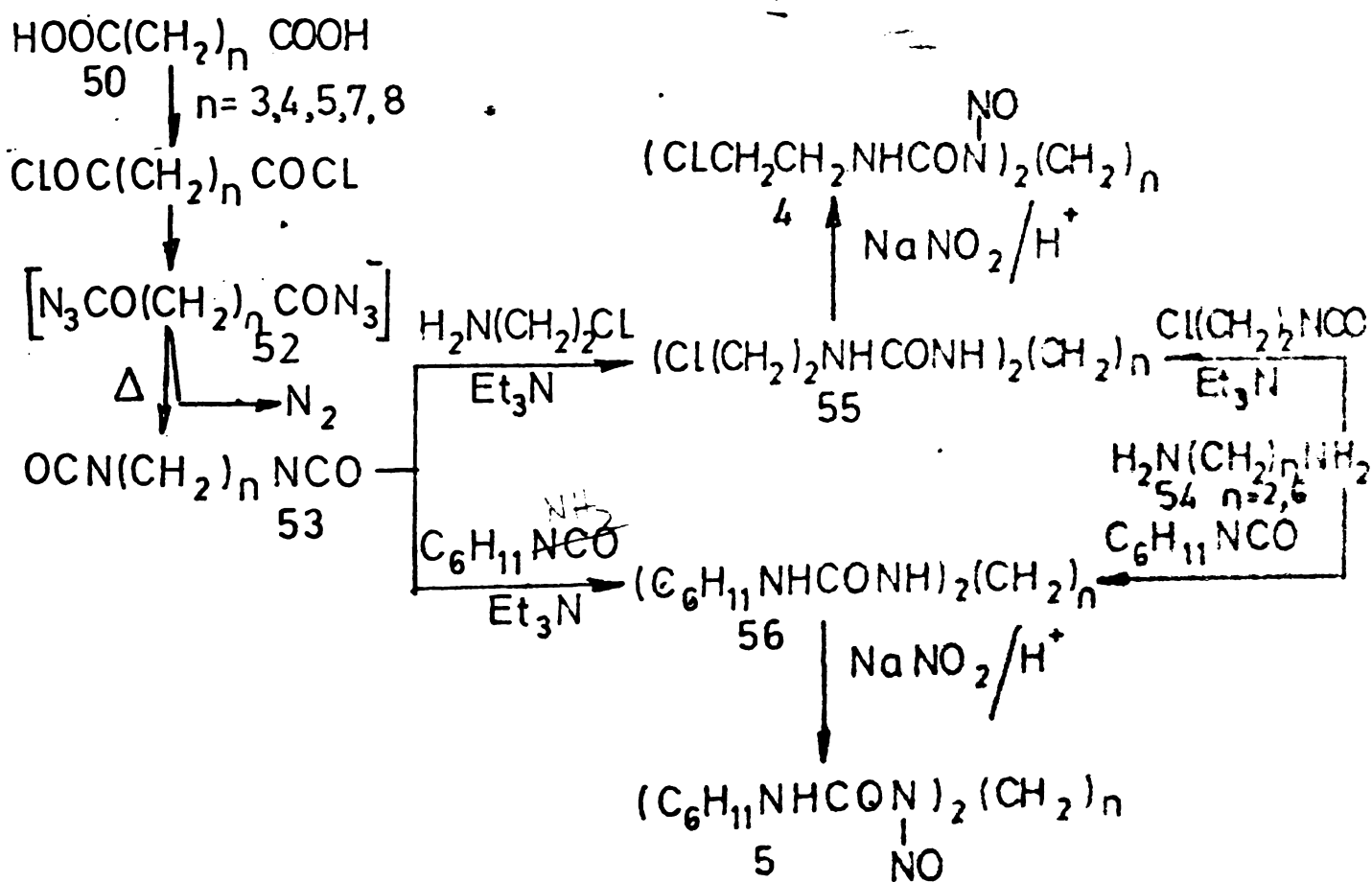


No.	R	X	Y	n	pt °C	mp °C	analytical data							
							C	H	N	Cl	C	H	N	Cl
38a	CH ₃	H	NO	2	119-121	60	48,13	8,02	14,97	-	48,00	7,99	14,85	-
38b	CH ₂ CH ₂ Cl	H	NO	1	91-98	75	46,78	7,55	13,64	-	47,09	7,71	13,64	13,50
40a	CH ₃	NO	NO	0	108,5-110	85	48,71	7,75	25,83	-	49,18	8,15	25,93	-
39a	CH ₂ CH ₂ Cl	NO	H	0	101-104	70	49,93	7,92	19,28	-	49,88	7,78	19,20	19,10
42a	CH ₃	O	NO	0	122-3	89	51,36	8,17	21,79	-	51,80	8,44	21,73	-
42b	CH ₂ CH ₂ Cl	O	NO	0	110	45	47,14	8,20	18,33	11,61	46,62	7,32	18,27	11,96

mecanismul de acțiune al unor noi N-NU s-au sintetizat o serie de derivați de di-N-nitrozouree, 4 și 5 (vezi cap.VII.).

Alegerea procedeeilor de preparare a acestor compusi a urmat mai ales utilizarea disponibilităților materiale existente, în cadrul unei șcheme de sinteză care să permită, pe cât posibil, realizarea compusilor doriți din intermediari comuni.

Schema 4 reprezintă etapele parcurse în sinteza derivaților 4 și 5 ($n = 2-8$). Materiile prime folosite au fost, în general, acizii dicarboxilici corespunzători, 50, și anume : acidul glutaric, adipic, pimelic, azelaic și sebacic, acizi care au fost procurați sau sintetizați prin metodele cunoscute. Prin tratarea acestora cu clorură de tionil sau oxalil se obțin, cu randamente bune, clorurile acide corespunzătoare, 51, care se



Schema 4

purifică prin distilare și se caracterizează prin punctul de fierbere și spectru ir (tabel 10 /210-216/.

Tabel 10

Caracteristici fizice ale clorurilor acide (51), carbamoil azidelor (52) și izocianaților (53) acizilor dicarboxilici alifatici (50)

	$(\text{CLCO})_2(\text{CH}_2)_n$ 51	$(\text{N}_3\text{CO})_2(\text{CH}_2)_n$ 52	$(\text{OCN})_2(\text{CH}_2)_n$ 53	
n	pf ^o C/mmHg cloruri acide	ν_{CO} (cm ⁻¹) cloruri acide	ν_{CON_3} (cm ⁻¹) azide	ν_{NCO} izocianat
3	80/10	1805	2135	2285
4	111/12	1805	2140	2280
5	122/4	1800	2142	2280
7	151/10	1725	2140	2285
8	170/14	1730	2138	2280

Reacția clorurilor acide cu azidă de sodiu (activată în prealabil), în solvenți neapoși, conduce la diazidele 52. Cursul acestei reacții este condiționat atât de puritatea clorurii acide cât și de reactivitatea azidei de sodiu. Deoarece reactivitatea NaN_3 scade în timp și între diferitele loturi există mari diferențe din acest punct de vedere, este recomandabil ca, înainte de a fi folosită, NaN_3 să fie reactivată (prin triturare cu hidrat de hidrazină 85%, dizolvare în apă și reprecipitare din acetonă) /217/. Transformarea azidelor, 52, în izocianați, 53, prin degradare Curtius /217/, este controlată atât prin degajarea de N_2 cât și spectrofotometric prin dispariția benzilor ν_{CO} (cloruri acide $\sim 1800 \text{ cm}^{-1}$) și ν_{N_3} (azide 2150 cm^{-1}) și apariția absorbției caracteristice vibrației de grup ν_{NCO} (izocianați $\sim 2270 \text{ cm}^{-1}$).

Deoarece izocianații, 53, nu se izolează din mediul de reacție și

soluțiile lor, astfel obținute, se folosesc ca stare pentru cuplarea cu aminele, este foarte important să se determine corect stîrșitul reacției. Prezența, în amestec, a clorurilor acide nereacționate, conduce la imu-rificarea ulterioară a derivaților de uree cu compuși de tip amidic, 57,
 $(RNHCO)_2(CH_2)_n$
⁵⁷
a căror formare micșorează randamentul și îngreunează considerabil puri-ficarea și caracterizarea derivaților de uree. Derivații de uree 55 și 56 ($n = 3, 4, 5, 7, 8$) se obțin prin cuplarea soluțiilor diizocianaților cores-punzători, 53 ($n=3-5, 7, 8$), cu 2-cloretul sau ciclohexil-amina /218, 219/; cap.XVIII.3.1.

Sinteza compușilor 55 și 56 ($n=2, 6$) s-a realizat prin cuplarea diaminelor $(H_2N)_2(CH_2)_n$ ($n=2, 6$) cu 2-cloretul sau ciclohexil izocianat /218/; cap.XVIII.3.1.

Cuplarea aminelor cu izocianații se realizează la rece, în sol-venți inerți (benzen, $CHCl_3$, toluen, etc.), în prezență de cantități ca-talitice de trietil-amină. Derivații de uree, 55, 56, precipită, de obicei din mediul de reacție. Purificarea lor se face prin triturare cu apă aci-dulată, apă, alcool, eter de petrol și, acolo unde este posibil, prin re-cristalizare din alcool. Prin acest procedeu derivații de uree, 55 și 56, se obțin, în general, cu randamente satisfăcătoare.

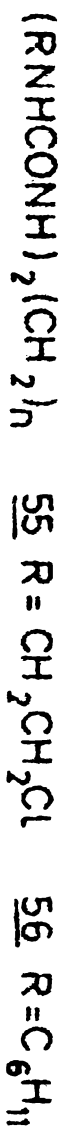
Datele analitice ale noilor compuși de uree sînt tabelate (tabel 11). Caracteristicile lor spectrale vor fi discutate ulterior (cap.XIV.1., tabel 35, 37).

- tabel 11 -

Nitrozoureele 4 și 5 s-au obținut prin nitrozarea ureelor precursorsa re cu $NaNO_2$ în mediu acid, $HCOOH$ 98-100% sau HCl 6N. În general compușii doriți precipită din mediu de reacție la diluare cu apă. Atunci cînd se formează uleiuri (de ex. 4, $n=3, 5, 7$), separarea se face prin extracție cu solvenți (eter etilic, cloroform, benzen). Probleme deosebite s-au ridicat la obținerea compusului 5 ($n=7$). Nitrozarea ureii precursoare 26 ($n=7$) cu $NaNO_2$ studiată în următoarele medii : $HCOOH$ 98-100%; CH_3COOH glacial și

Tabol 11

Caracteristicile analitice ale derivatilor de polimetilen blaure



No. n	Formula	pt °C	Procedeu (a)	Analize elementare						dB		
				calculat			gasit					
				C	H	N	Cl	C	H	N	Cl	
55a	C ₈ H ₁₆ N ₄ O ₂ Cl ₂	180-3	A ₁	35,43	5,96	20,66	26,14	35,55	5,92	20,70	26,60	25
55b	C ₉ H ₁₈ N ₄ O ₂ Cl ₂	141-3	B ₁	37,90	6,37	19,64	24,86	38,25	6,59	19,64	24,63	30
55c	C ₁₀ H ₂₀ N ₄ O ₂ Cl ₂	165	B ₁	40,13	6,75	18,73	23,69	40,00	6,83	18,87	23,54	72
55d	C ₁₁ H ₂₂ N ₄ O ₂ Cl ₂	131-2	B ₁	42,17	7,09	17,89	22,63	42,48	7,40	17,63	22,37	49
55e	C ₁₂ H ₂₄ N ₄ O ₂ Cl ₂	150-3	A ₁	44,03	7,41	17,12	21,66	43,85	7,50	16,90	21,43	91
55f	C ₁₃ H ₂₆ N ₄ O ₂ Cl ₂	120	B ₁	45,75	7,62	16,42	20,82	45,40	7,70	16,15	20,90	70
55g	C ₁₄ H ₂₈ N ₄ O ₂ Cl ₂	157	B ₁	47,32	7,96	15,77	19,95	47,81	7,98	15,27	-	80
56a	C ₁₆ H ₃₀ N ₄ O ₂	242-3	A ₂	61,88	9,76	18,05	-	61,53	10,05	18,20	-	83
56b	C ₁₇ H ₃₂ N ₄ O ₂	220	B ₂	62,91	9,96	17,27	-	62,53	10,00	14,47	-	95
56c	C ₁₈ H ₃₄ N ₄ O ₂	300	B ₂	63,85	10,14	16,55	-	43,44	9,68	16,46	-	89
56d	C ₁₉ H ₃₆ N ₄ O ₂	235-7	B ₂	64,72	10,31	15,89	-	64,96	10,63	16,23	-	98
56e	C ₂₀ H ₃₈ N ₄ O ₂	225	A ₂	65,52	10,47	15,28	-	66,09	10,56	15,39	-	75
56g	C ₂₁ H ₄₀ N ₄ O ₂	221-3	B ₂	66,25	10,61	14,72	-	66,70	10,10	14,57	-	78
56f	C ₂₂ H ₄₂ N ₄ O ₂	208	B ₂	66,94	10,74	14,20	-	67,42	10,60	14,43	-	67

a) Procedee de sinteză: A₁, H₂N(CH₂)_nNH₂ + ClCH₂CH₂NCO; A₂, H₂N(CH₂)_nNH₂ + C₆H₁₁NCO; B₁, OCN(CH₂)_nNCO + ClCH₂CH₂NH
 B₂, OCN(CH₂)_nNCO + C₆H₁₁NH₂.

$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$; HCOOH 98-100% și HCl 6N, a condus în toate cazurile la separarea unor uleiuri în care, spectrofotometric, se evidențiază uree nenitrozată (fig.1). Produsul dorit, $\underline{5}$ ($n=7$), se obține doar dacă se folosește pentru nitrozare un amestec HCOOH 98-100%: HCl 1:1; cap.XVIII 3.1.

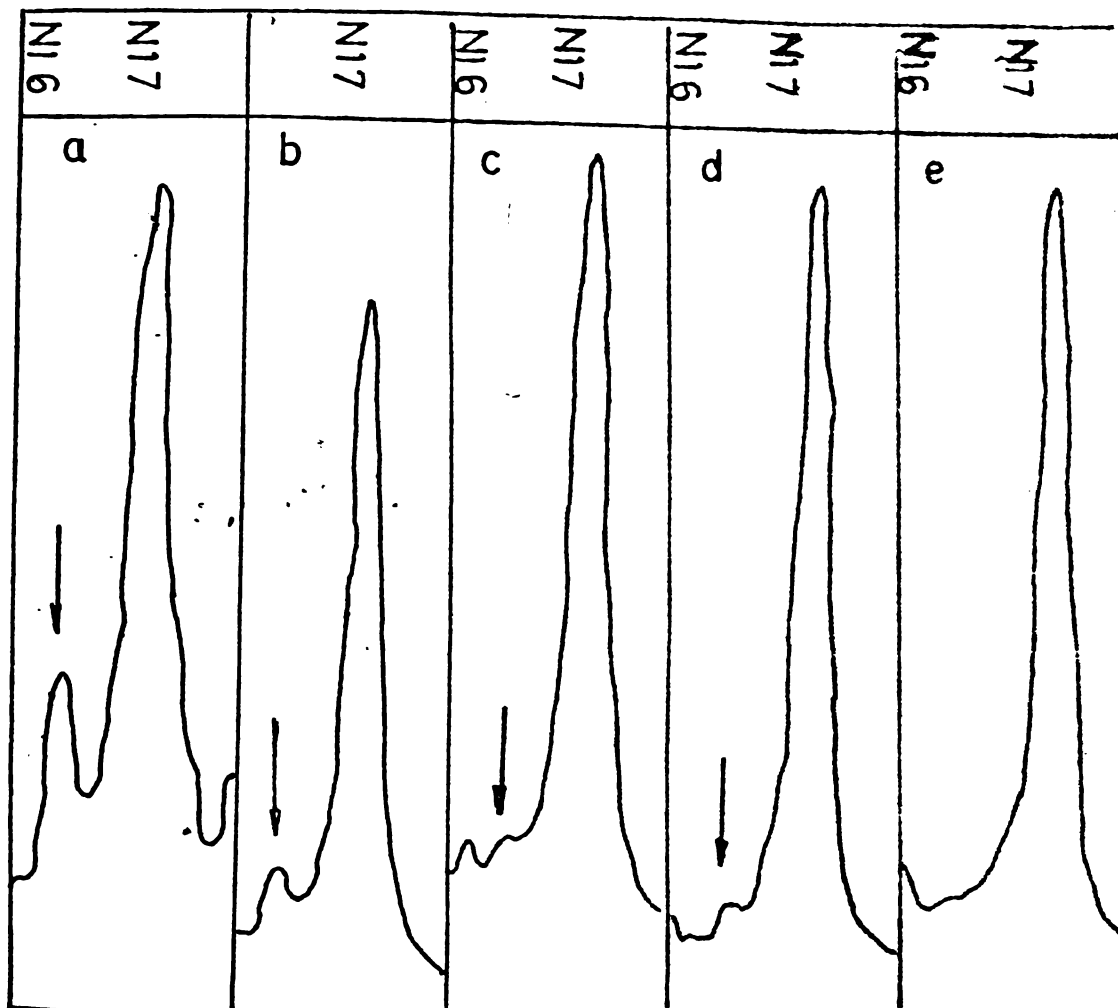
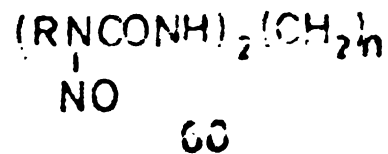
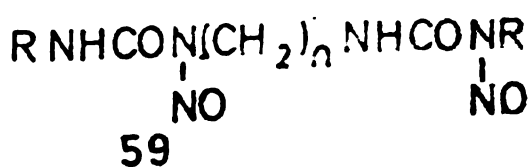
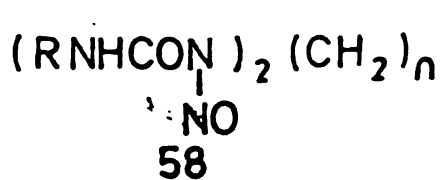


Fig.1 Spectre ir $\underline{5}$ f) a) $\text{AcOH}:\text{Ac}_2\text{O} / 3:1$; b) HCOOH 98-100%; c) HCl 10N; d) HCl 10N - HCOOH 98-100%: 2-1; e) HCl 10N - HCOOH 98-100%: 1-1; \rightarrow $\overset{\cdot}{\text{C}}\text{O}$ uree nenitrozată.

În toate cazurile purificarea izomerică s-a făcut prin reprecipitare cu apă din HCOOH 98-100% [26]. Teoretic, prin nitrozarea acestui tip de derivați de uree pot rezulta cel puțin trei N-nitroizomeri diferiți (58, 59 și 60) sau amestecuri ale acestora. Studiul spectrelor rmn



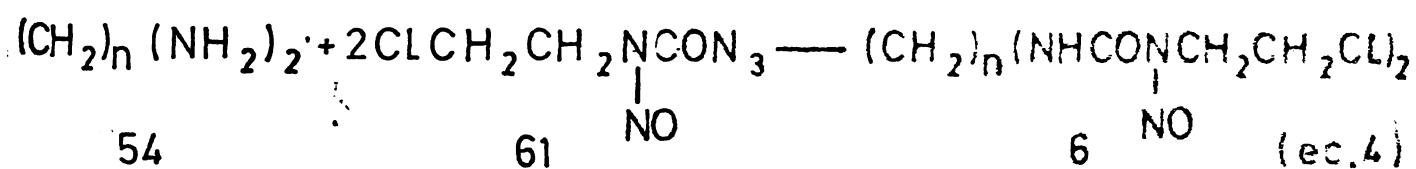
le compuşilor purificaţi (4 si 5) indică existenţa, în exclusivitate, a zomerilor 3-nitrozo de tip 58.

Datele analitice ale noilor compuşii sînt prezentate în tabelul 12, structura şi puritatea izomerică au fost determinate prin spectroscopie infraredă, în special, rmn şi sînt discutate în cap.XIV, tabel 18,19 şi cap.XVIII. 5.1. tabel 36,38.

- tabel 12 -

XIII.3.2. Derivaţi alifatici mono şi bis /1-(2-cloretil)-1-nitrozouree/

Sinteza nitrozoureeilor 6 (n=7,8), izomeri 1-nitrozo (de tip 60), se realizează în mod neechivoc, prin cuplarea diaminelor corespunzătoare, 4, cu 2-cloretil-nitrozo-carbamoi azida, 61 (cap.XVII3.2.). Sinteza acestor compuşii ni s-a părut interesantă atît datorită faptului că ei ar trebui



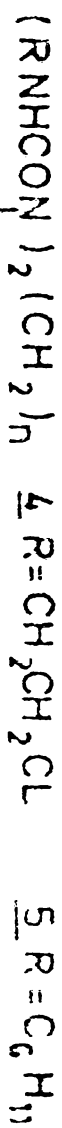
să fie - conform teoriei - considerabil mai activi decît omologii lor, 3-nitrozo 4 (n=7,8), cît şi ca un mijloc, suplimentar, de control al atribuirii corecte a structurii izomerilor 3-nitrozo.

Compusul 66 se obţine, conform schemei 5, atît prin cuplarea azidului 64 cu reactivul de nitrozare 61, cît şi prin nitrozarea directă a ureii precursoră 65 (cap.XVIII3.2.3.4.).

Sinteza reactivului de nitrozare utilizat, 61, a fost descrisă foarte recent /47,168/. Obţinerea 2-cloretil-carbamoi-azidei precursoră, 68, a pus probleme deoarece încercările noastre de a reproduce metoda propusă de Eisenbrand şi colab. (care constă în obţinerea acestui compuşii din 2-cloretil-izocianat şi acid azothidric, HN₃-produs in situ - din HCl şi NaN₃), au eşuat. Studiile efectuate de noi au evidenţiat că această

Tabol 12

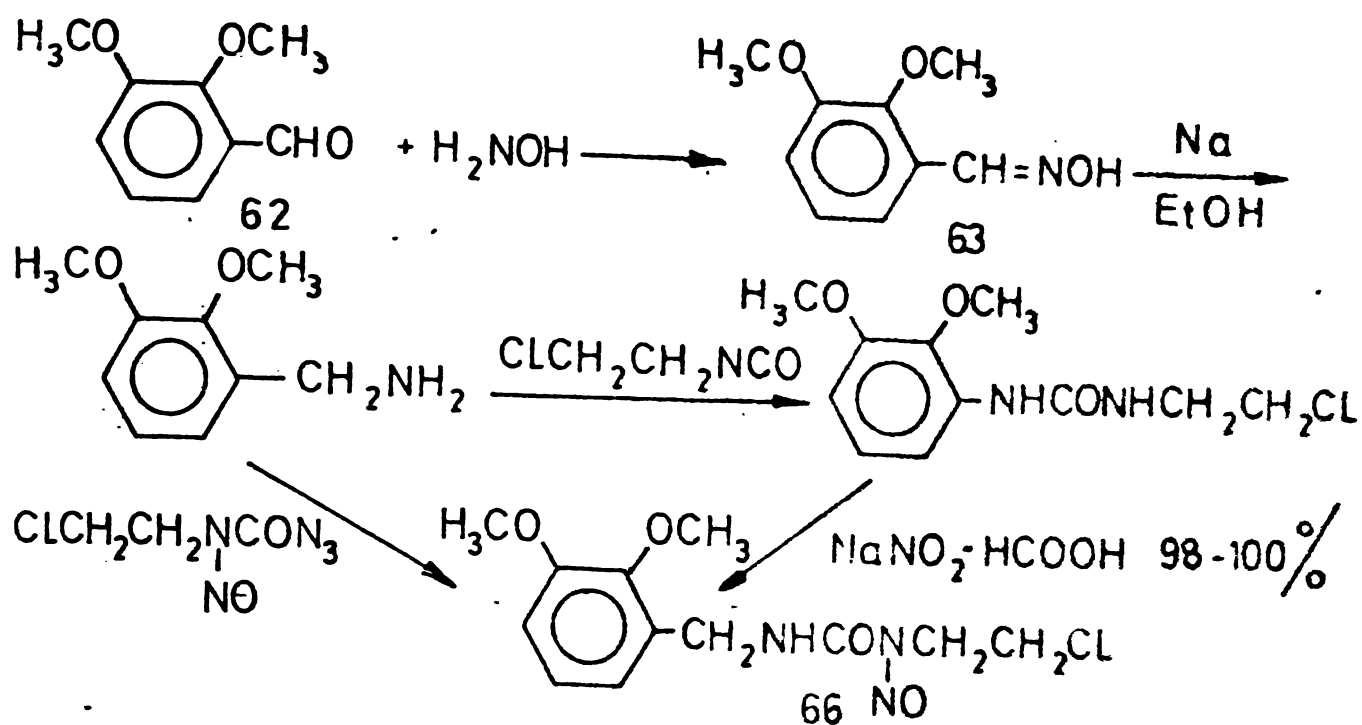
Caractéristici analitice ale derivațiilor de polimerizări ale nitrozouree



NO

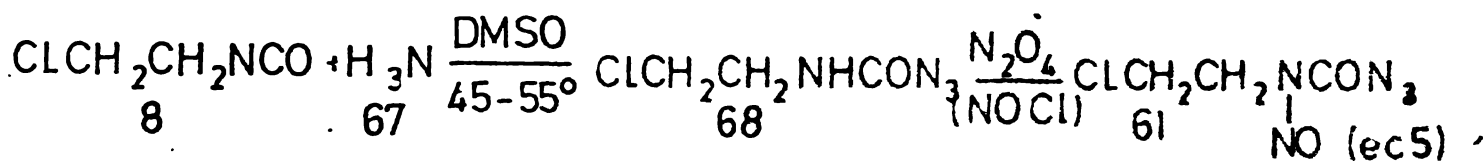
Nr.	n	Formula	pt °C	Procedeu (a)	Analiza elementară %							ng	
					calculat		găsit						
					C	H	N	Cl	C	H	N	Cl	
4a	2	C ₈ H ₁₄ N ₆ O ₄ Cl ₂	145-6	A	29,19	4,30	25,54	21,54	29,65	3,96	25,42	21,67	85
4b	3	C ₉ H ₁₆ N ₆ O ₄ Cl ₂	68-70	B	31,49	4,71	24,49	20,66	31,73	4,88	24,19	20,50	70
4c	4	C ₁₀ H ₁₈ N ₆ O ₄ Cl ₂	137	A	33,64	5,09	23,53	19,86	34,00	5,50	23,64	20,33	95
4d	5	C ₁₁ H ₂₀ N ₆ O ₄ Cl ₂	55-7	B	35,59	5,41	22,64	19,10	35,59	5,30	22,82	19,31	75
4e	6	C ₁₂ H ₂₂ N ₆ O ₄ Cl ₂	92	A	37,41	5,77	21,82	18,40	36,95	5,90	21,78	18,26	90
4f	7	C ₁₃ H ₂₄ N ₆ O ₄ Cl ₂	48	B	39,09	6,01	21,05	17,79	39,15	6,20	20,99	17,60	85
4g	8	C ₁₄ H ₂₆ N ₆ O ₄ Cl ₂	82	B	40,68	6,35	20,34	17,15	41,11	6,62	20,70	17,01	92
5a	2	C ₁₆ H ₂₈ N ₆ O ₄	135	A	52,15	7,81	22,81	-	52,54	7,68	23,22	-	58
5b	3	C ₁₇ H ₃₀ N ₆ O ₄	137	A	53,33	7,92	21,98	-	52,96	7,93	21,95	-	74
5c	4	C ₁₈ H ₃₂ N ₆ O ₄	112	A	54,52	8,15	21,20	-	54,56	8,05	21,24	-	96
5d	5	C ₁₉ H ₃₄ N ₆ O ₄	100-102	A	55,58	8,36	20,47	-	55,73	8,64	20,80	-	97
5e	6	C ₂₀ H ₃₆ N ₆ O ₄	103-105	A	56,57	8,56	19,79	-	57,00	8,90	20,11	-	90
5f	7	C ₂₁ H ₃₈ N ₆ O ₄	57-60	C	57,50	8,85	19,19	-	57,25	8,90	19,40	-	87
5g	8	C ₂₂ H ₄₀ N ₆ O ₄	93-94,5	B	58,37	8,93	18,57	-	58,78	9,35	18,24	-	80

a) Procedee de nitrozare: A) HCOOH 98-100%/NaNO₂; B) HCl d 1,19/NaNO₂; C) HCOOH 98-100%:HCl d 1,19/NaNO₂



Schema 5

reactie este catalizată de dimetil-sulfoxid (DMSO) (ec.5) /22c/.



Astfel, dacă la o soluție cloroformică de 2-cloretil-izocianat se adaugă o soluție de HN_3 în CHCl_3 (preparată din NaN_3 și H_2SO_4 /221/) în absența DMSO nu are loc nici o reacție. Adăugarea DMSO la mediul de reacție, conduce printr-un proces energetic exoterm la produsul dorit. Reacția poate fi ușor urmărită spectrofotometric în ir prin dispariția absorbției de la 2270 cm^{-1} (ν_{NCO}) și apariția vibrației $\nu_{\text{N}_3} \sim 2150 \text{ cm}^{-1}$. După îndepărtarea solventului, uleiul rămas se triturează cu eter de petrol, din care azida 68 cristalizează în timp și la rece. S-a obținut astfel un procedeu eficient și reproductibil de obținere a 2-cloretil-carbamoil azidei, superior celor descrise în literatură; cap.XVIII.2.1.

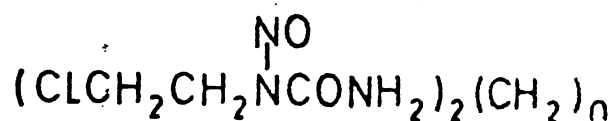
Nitrozarea carbamoil azidei s-a făcut prin procedeele cunoscute cu NOCl sau N_2O_4 /47,168/, ultimul fiind preferat deoarece, în acord cu datele de literatură, decurge cantitativ. Îndepărtarea acidului acetic și anhidridei acetice, proveniți din mediul de reacție și care impurifică produsul final, se face utilizând schimbători de ioni. 2-Cloretil-nitro-

zo-carbamoil azida, 61, este un compus instabil, care nu se izolează, ci se folosește imediat în reacția de cuplare cu aminele. Reacția este controlată prin TLC, ir și rmn.

Datele analitice ale nitrozoureelelor astfel obținute, 6 (n=7,8), și 66 sînt prezentate în tabelul 13. Structura lor este confirmată de datele spectrale în ir și rmn (cap.XIV, tabel 17,39).

Tabel 13

Caracteristici analitice ale derivaților de bis 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree 6



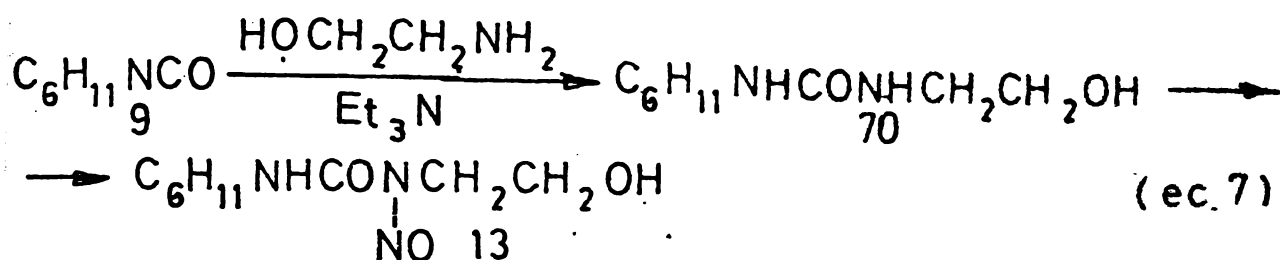
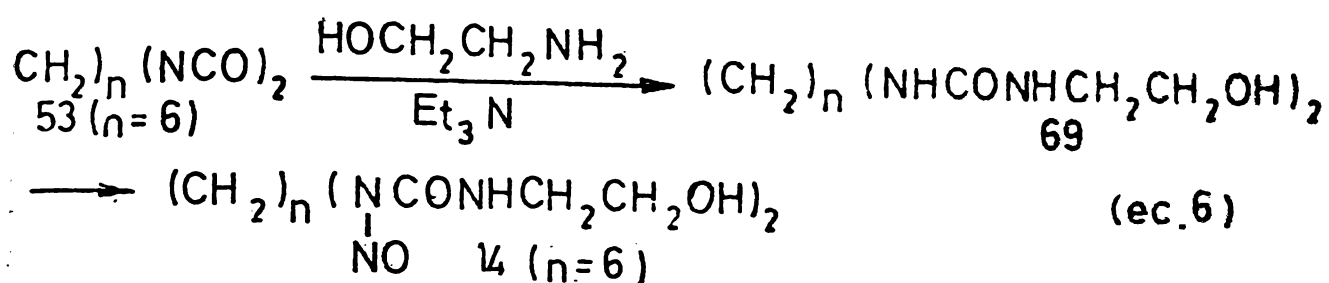
Nr.	n	pt ^o C	η _D ²⁰	analiză elementară							
				calculat				găsit			
				C	H	N	Cl	C	H	N	Cl
<u>6a</u>	7	77-77,5	43	39,10	6,02	21,05	17,79	35,79	6,38	21,23	18,7
<u>6b</u>	8	71-71,5	60	40,68	6,30	20,34	17,19	40,57	6,66	20,11	17,

XIII.4. Derivați de 1-(2-hidroxietil)-1(3)-nitrozouree

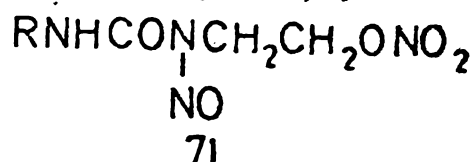
Proiectarea derivaților de acest tip, 13 și 14, s-a făcut în vederea completării seriei de derivați mențiți să clarifice unele aspecte ale mecanismului de acțiune al N-nitrozoureelelor.

Sinteza noilor compuși s-a realizat prin cuplarea izocianatilor 53,9, cu 2-hidroxietil amină și nitrozarea derivaților de uree astfel obținuți, 69,70, cu NaNO₂ în HCOOH 98-loc% (ec.6,7); cap.XVII.4.

În cursul reacției de nitrozare a 2-hidroxietil ureelor se produce și esterificarea simultană a grupărilor OH, cu formare de nitriți de tipul 71. Descompunerea acestora se face prin metodele cunoscute, adică încălzire în metanol (metanoliză). După această etapă, urmează purificarea



izomerică a N-nitrozo derivaților, prin dizolvarea acestora în HCOOH



88-100%, la rece 0-5° și precipitarea, după un timp cu apă /26/

Datele analitice privind compuşii sintetizați sînt prezentate în tabelele 14 și 15. Atribuirile structurale sînt discutate în cap. XIV, cap.XVIII.4., tabel 4o.

Tabel 14

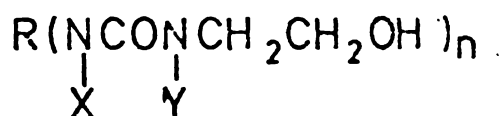
Caracteristici analitice ale derivaților de 1-(2-hidroxi-
etil)-uree



Nr.	R	n	pt ^o C	η%	analiză elementară					
					calculat			găsit		
					C	H	N	C	H	N
<u>69</u>	C ₆ H ₁₁	1	98-101	65	58,06	9,68	15,05	58,00	9,22	14,99
<u>70</u>	(CH ₂) ₆	2	180	95	49,69	8,96	19,31	49,66	9,36	19,21

Tabel 15

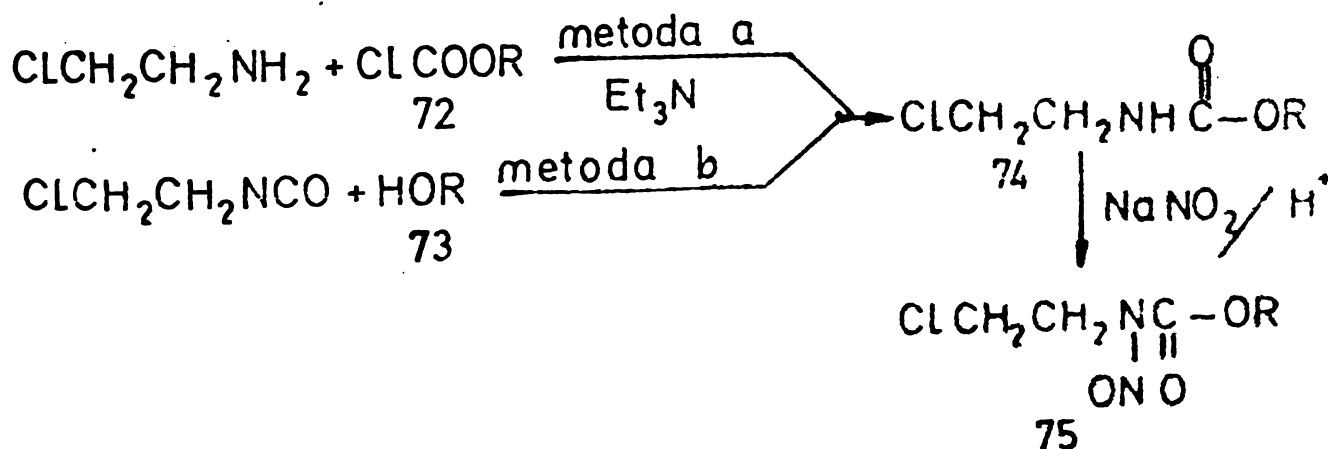
Caracteristici analitice ale 2-hidroxietil-nitrozourelor



Nr.	R	n	X	Y	p.t.	η%	analiză elementară					
							calculat			găsit		
							C	H	N	C	H	N
13	C ₆ H ₁₁	1	H	NO	57-8	60	50,23	7,91	19,53	50,03	7,99	19,03
14	(CH ₂) ₆	2	NO	H	74-6	80	41,30	6,90	24,14	41,20	7,04	23,85

XIII.5. Derivați de N-(2-cloretil)-N-nitrozouretani

N-(2-cloretil)-N-nitrozouretanii, 75, se obțin conform schemei 6 prin cuplarea 2-cloretil aminei cu cloroformiați, 72, sau din 2-cloretil-izocianat și alcooli, 73, și nitrozarea cu NaNO₂ în mediu acid a uretanilor rezultați, 74 (schema 6).



Schema 6.

Uretanii, 75, în care R este un hormon (derivați de acid colic, deoxicolic, etc.) se obțin prin metoda a (80,81,82,84). Cloroformiații respectivi, 72, se obțin prin fosgenare directă și au fost descriși anterior /222/. Derivatul de estradiol, 81 (tabel 15), se poate obține și direct din 2-cloretil izocianat și estradiol (metoda b), condiții în care, așa cum s-a arătat, grupările OH din poziția 17 nu reacționează /223/; cap.XVIII.5.

Nitrozarea uretanilor 75 a ridicat probleme deosebite, datorită instabilității foarte pronunțate a unora dintre N-nitrozo derivații din această serie, care se descompun în cursul manipulărilor și nu se pot obține în stare pură.

Datele analitice ale noilor compusi au fost sumarizate în tabelul 16.

- tabel 16 -

XIII.6. Procedeu de obținere a 2-cloretil izocianatului.

2-Cloretil izocianatul, 8, reprezintă un intermediar cheie în sintezele care fac obiectul prezentei lucrări. Din acest motiv s-a acordat o atenție specială elaborării unor metode eficiente și reproductibile de obținere a sa, cu atât mai mult cu cât procedeele descrise în literatură s-au dovedit nesatisfăcătoare.

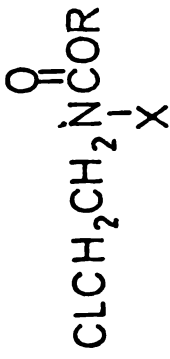
2-Cloretil izocianatul este dificil de obținut și manipulat atât din cauza mării sale reactivități cât și a faptului că este foarte toxic și lacrimogen. Evident, într-o fază inițială, s-a urmărit evaluarea eficienței și accesibilității metodelor descrise în literatură, care, așa cum s-a mai arătat, constau în: a) fosgenarea 2-cloretil-aminei (metoda Siefken) /131,132/; b) tratarea 2-hidroxi-etil uretanului cu PCl_5 , (metoda Wenker) /133,134/; c) fosgenarea aziridinei (metoda Johnston) /135/ și d) descompunerea 2-oxazolidonei cu clorură de tosil /137/. Aceste metode au fost comentate anterior (vezi cap. IX).

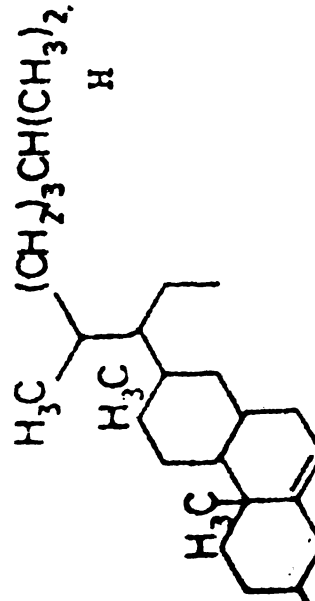
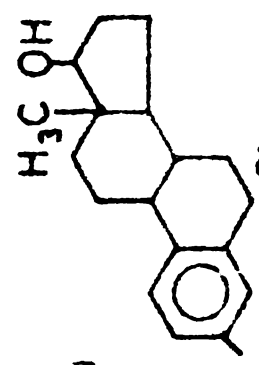
Incercările noastre de obținere a 2-cloretil izocianatului prin metoda Wenker (cu PCl_5), s-au materializat printr-o îmbunătățire a acesteia, mai ales în ceea ce privește sinteza 2-hidroxi-etil uretanului, 87, care s-a obținut cu randamente de 90-95% din etanol-amină și carbonat de etil (în loc de cloroformiat de etil așa cum este descris în procedeul original). Metoda este simplă, comodă, reacția decurând conform ecuației 8 (cap. XVIII 6.1.).



Tabel 16

Caracteristici analitice ale 2-cloretii uretanilor și nitrozouretanilor



Nr.	R	X	pt°C	η%	Analiza elementară %							
					calculat			găsit				
					C	H	N	Cl	C	H	N	Cl
76	C ₆ H ₁₁	H	36-40	99,2	52,55	7,78	6,81	17,27	52,96	8,17	6,54	17,54
77	C ₆ H ₁₁	NO	ulei	62,30	46,05	6,40	11,94	15,14	46,54	6,84	11,86	15,46
78	4-CH ₃ C ₆ H ₁₀	H	61-4	91,10	54,92	7,78	6,40	16,24	54,68	7,28	6,04	16,11
79	4-CH ₃ C ₆ H ₁₀	NO	49-50	77,00	48,48	6,46	11,31	14,34	48,62	6,80	11,08	13,92
80	 $(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	H	126-9	86,00	73,25	10,17	2,85	7,22	73,28	10,49	2,86	7,68
		A	93-95	14,00	66,93	7,17	3,72	9,43	66,40	7,27	3,91	10,01
81	 $\text{H}_3\text{C OH}$	A	93-95	14,00	66,93	7,17	3,72	9,43	66,40	7,27	3,91	10,01

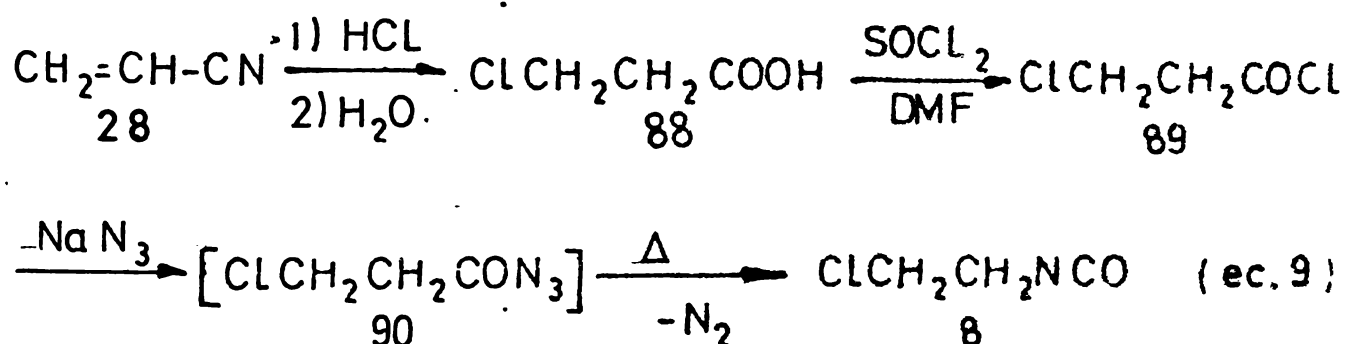
CONTINUARE TABEL 16

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
82													
	H 132-4 60,20 62,85 8,54 2,72 6,89 62,81 8,45 2,85 7,30												
82													
	NO 180-2 53,60 60,38 8,09 5,03 6,38 59,93 8,39 4,86 6,65												
84													
	H 75-77 55,00 65,69 8,99 2,75 6,94 65,49 9,36 2,75 7,36												
85													
	NO 145-9 51,00 62,16 8,33 5,18 6,57 61,80 8,32 4,85 6,72												

Din păcate, metoda Wenker nu este convenabilă, deoarece izocianatul rezultă impurificat cu clorură de carbamoil. Pentru purificare sînt necesare operații suplimentare de distilare, care îngreunează foarte mult procedeul și micșorează randamentul și așa destul de scăzut.

Procedeul Johnston a fost reprodus conform condițiilor revendicate de autori /135/, dar materia primă, etilen-imina, este un produs toxic, scump și relativ greu accesibil.

Rezultatele cele mai bune, în sinteza 2-cloretii izocianatului, le-am obținut prin utilizarea în acest scop a metodei Curtius de degradare uscată a azidelor /217/. Este curios că, cel puțin în literatura consultată de noi, nu se găsește nici o indicație de sinteză a 2-cloretii izocianatului, prin această metodă, care conform rezultatelor noastre este simplă, sigură, folosește materii prime accesibile și ceea ce este mai important permite obținerea unui produs pur, cu randamente mari (η 70%). Sinteza se realizează conform schemei de mai jos (ec.9).



Materia primă folosită este acrilonitrilul, 28, din care prin adiție de HCl, în mediu apos, se obține acidul 3-cloropropionic, 80. Acesta în prezența clorurii de tionil, într-o reacție catalizată de DMF, conduce, la temperatura camerei, la clorura acidă corespunzătoare, 89, care se izolează prin distilare. La soluția în tetralină a clorurii acide, 89, proaspăt distilate, se adaugă încet, cu încălzire ușoară (30-40°), NaN₃ (activată) /217/ și apoi se ridică temperatura la 60-80°. Reacția este, practic, terminată când degajarea de N₂ încetează. Sfîrșitul ei este determinat spectrofotometric (în ir) prin dispariția absorbției caracteristice clorurii acide ($\nu_{\text{CO}} \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$) și azidei ($\nu_{\text{N}_3} \sim 2150 \text{ cm}^{-1}$).

Izocianatul format este separat prin distilare la vid ($41^{\circ}/16\text{mmHg}$); cap. XVIII 6.2.

Conform datelor noastre, rezultatele cele mai bune (atât din punct de vedere al randamentului cât și al purității compusului), se obțin când se folosesc solvenți aprotici cu punct de fierbere ridicat (de ex. tetralina sau decalina), care permit separarea la distilare întâi a izocianatului, evitându-se astfel încălzirile de lungă durată, care produc degradări ale acestuia.

Etapa cea mai dificil de controlat și care necesită o tehnică îngrijită, constă în degradarea termică a azidei, unde există pericolul producerii unor reacții violente. Din acest motiv s-a încercat o îmbunătățire, prin varianta Weinstock a metodei Curtius [201], care separând azida intermediară, ar permite o degradare controlată a acesteia. Rezultatele obținute nu au fost satisfăcătoare deoarece, se obține un amestec de cel puțin două azide, din care la degradare termică rezultă 2-cloretil izocianat impur și cu randamente mici.

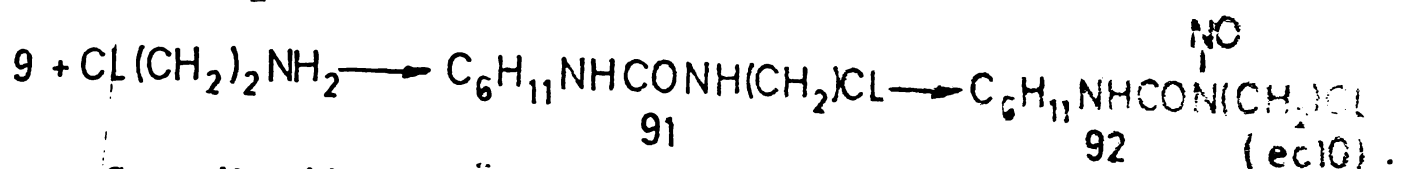
XIII.7. Procedeu tehnologic de preparare a 1-(2-cloretil)-3-ciclohexil-1-nitrozoureei (CCNU, NIPA KIN).

Obiectivele studiului întreprins în clasa 1-(2-cloretil)-nitrozoureeilor au fost atât sinteza de noi compusi potențial antileucemici, cât și valorificarea experienței obținute, în asimilarea unor compusi cu utilizare clinică. Ca urmare, s-a realizat, pe baza unui brevet original, un proces tehnologic de fabricație a CCNU și este în curs de asimilare un alt produs din această clasă și anume: MeCCNU /224,225/.

Procedeu de sinteză pentru obținerea CCNU, 92, a urmărit utilizarea unor materii prime accesibile, pe cât posibil indigene, în cadrul unor scheme care să permită realizarea, în condiții de laborator, a unor randamente bune.

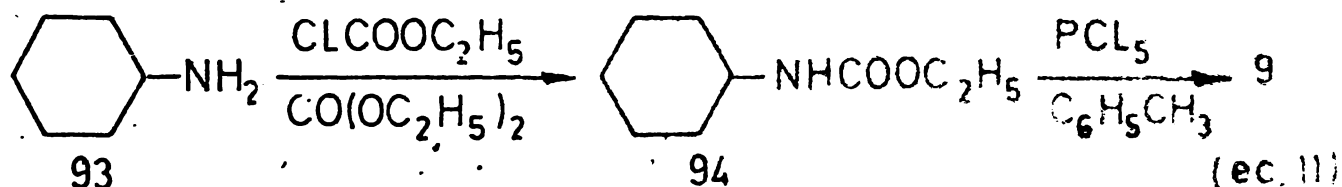
Schema generală de sinteză este, în general, aceeași cu cea cunoscută și constă în cuplarea ciclonexil izocianatului 9 cu 2-cloretil

amina și nitrozarea derivatului de uree rezultat, 91 (cu NaNO_2 în EtOH 98-100%) (ec.10).



Contribuțiile originale aduse de noi la această sinteză se referă la: a) sinteza ciclohexil izocianatului; b) modificări ale reacției de cuplare; c) metodă nouă de purificare a produsului final.

a) ciclohexil izocianatul se obține conform procedurii brevetat de noi, în două etape: 1) sinteza ciclohexil uretanului, 94, din ciclohexil amină și cloroformiat (sau carbonat) de etil și 2) transformarea acestuia, 94, în produsul dorit, 9, prin tratare cu PCl_5 (ec.11) /294/.

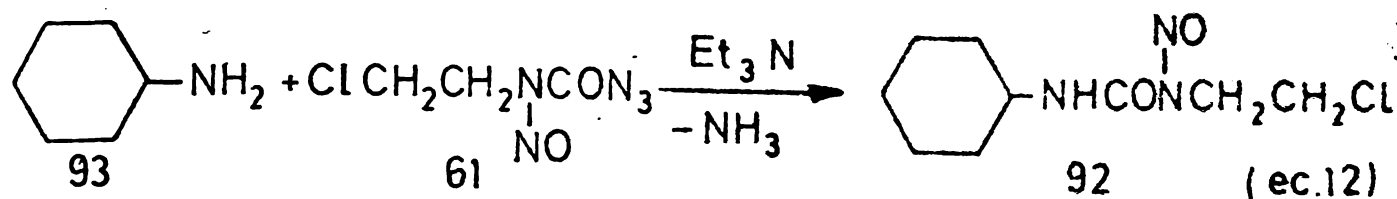


b) 1-(2-cloretil)-3-ciclohexil ureea, 91 se obține într-o singură fază din ciclohexil izocianat, 2-cloretil amină și trietil amină. Izocianatul se adaugă în porțiuni, la rece ($0-5^\circ$). Amestecul de reacție se lasă apoi la temperatura camerei pentru perfectare. Stadiul reacției se verifică spectrofotometric în ir urmărind dispariția benzii $\nu_{\text{NCO}} = 2270 \text{ cm}^{-1}$ (cap.XVIII.7.1.).

c) conform datelor de literatură purificarea produsului final se face prin reprecipitare din acid formic 98-100% /294/. Din nefericire, această parte HCOOH 98-100% este un produs de import, în această etapă consumându-se cantități mari fără posibilitate de recuperare, iar pe de altă parte urmele de acid înglobate în produsul final îl fac necorespunzător din punct de vedere biologic, fiind necesare prelucrări suplimentare pentru îndepărtarea acestuia, am căutat alte posibilități de purificare izomerică.

Rezultatele obținute fac obiectul unei recente cereri de brevet.

Tot cu privire la sinteza CCNU s-a brevetat și un al doilea procedeu, care constă în cuplarea 2-cloretil-nitrozo-carbamoil-azidei, 61, cu ciclohexil amina, în prezență de trietil amină, procedeu ce elimină etapa de purificare izomerică, din reacție rezultând exclusiv izomerul 1-nitrozo (ec.12) /225/. Așa cum am mai arătat (cap.XIII.3.2.) sinteza reactivului de nitrozare se realizează prin modificări ale procedeelor



din literatură, mai ales în ceea ce privește sinteza 2-cloretil-carbamoil-azidei.

Folosind aceste tehnologii îmbunătățite, produsul CCNU a fost asimilat la noi în țară, fiind realizat în cadrul laboratorului de Sinteze și Microproducție de Medicamente anticancerose al Institutului Oncologic București.

XIV. Determinări de structură și proprietăți fizico-chimice

XIV.1. Caracterizarea în infra-roșu a noilor derivați de uree și nitrozouree.

Utilitatea informațiilor obținute din spectrele ir este de primă importanță pentru sinteza și studiul compusilor de N-nitrozouree, servind atât la urmărirea mersului unor reacții cât și la caracterizarea compusilor obținuți.

Deoarece, așa cum am văzut, literatura este destul de bogată în ceea ce privește interpretarea spectrelor ir ale ureelor și nitrozoureele (cap.XI.1.2. și XI.2.2), în capitolul de față nu s-au prezentat decât aspectele specifice compusilor abordați, utilizate atât în monitorizarea reacțiilor de sinteză cât și în stabilirea structurii și puri-

tății compușilor rezultați.

XIV.1.1. Utilizarea spectrometriei ir în monitorizarea reacțiilor.

Spectrofotometria de infra-roșu a fost utilizată ca mijloc curent și comod în urmărirea mersului reacțiilor de obținere a izocianatilor, ureelor și nitrozoureeilor și la sinteza 2-cloretil-nitroso-carbamil azidei.

- Sinteza izocianatilor prin metoda Curtius, a fost urmărită prin dispariția benzilor ν_{COCl} , ν_{N_3} de la 1800 și respectiv 2150 cm^{-1} și apariția unei absorbții puternice, caracteristice vibrației de grup NCO de la 2270 cm^{-1} . Despre importanța deosebită a aprecierii exacte a sfârșitului acestei reacții s-a discutat anterior (cap.XIII.3.1.). Etapa cheie a acestei sinteze este, evident, formarea azidei, care se descompune relativ ușor în izocianatul corespunzător. Totuși, odată cu creșterea masei moleculare a azidelor, crește și stabilitatea lor termică, ceea ce necesită atât prelungirea timpului de reacție cât și ridicarea temperaturii. Astfel, în cazul clorurii acidului glutaric, 51 (n=3), azida formată, 52 (n=3) se descompune, în condițiile de reacție utilizate, practic instantaneu în izocianat, 53 (n=3). De aceea, în diversele probe luate din mediul de reacție, înainte de definitivarea acestuia, se identifică numai clorură acidă și izocianat. Dimpotrivă, în cazul clorurilor acizilor pimelic, 51 (n=5), azelaic, 51 (n=7) și sebacic, 51 (n=8), probele luate la diverse intervale de timp evidențiază, un timp, un amestec din cei trei componenți (clorură acidă, azidă și izocianat) sau către sfârșitul reacției un amestec de azidă și izocianat (fig.2).

Sinteza 1,5-ditiaspiro 5,5 -undecanil izocianatilor, 21(a-c), folosind varianta Weinstock a reacției Curtius, este urmărită în mod asemănător în ir. Se evidențiază astfel existența unei impurități la 1700 cm^{-1} (probabil acid nereacționat), care îngreunează mult purificarea derivaților de uree.

- Sinteza 2-cloretil carbamoil azidei, 68 și nitrozozidei, 61.

Deoarece concentrația de acid azotidric nu poate fi exact deter-

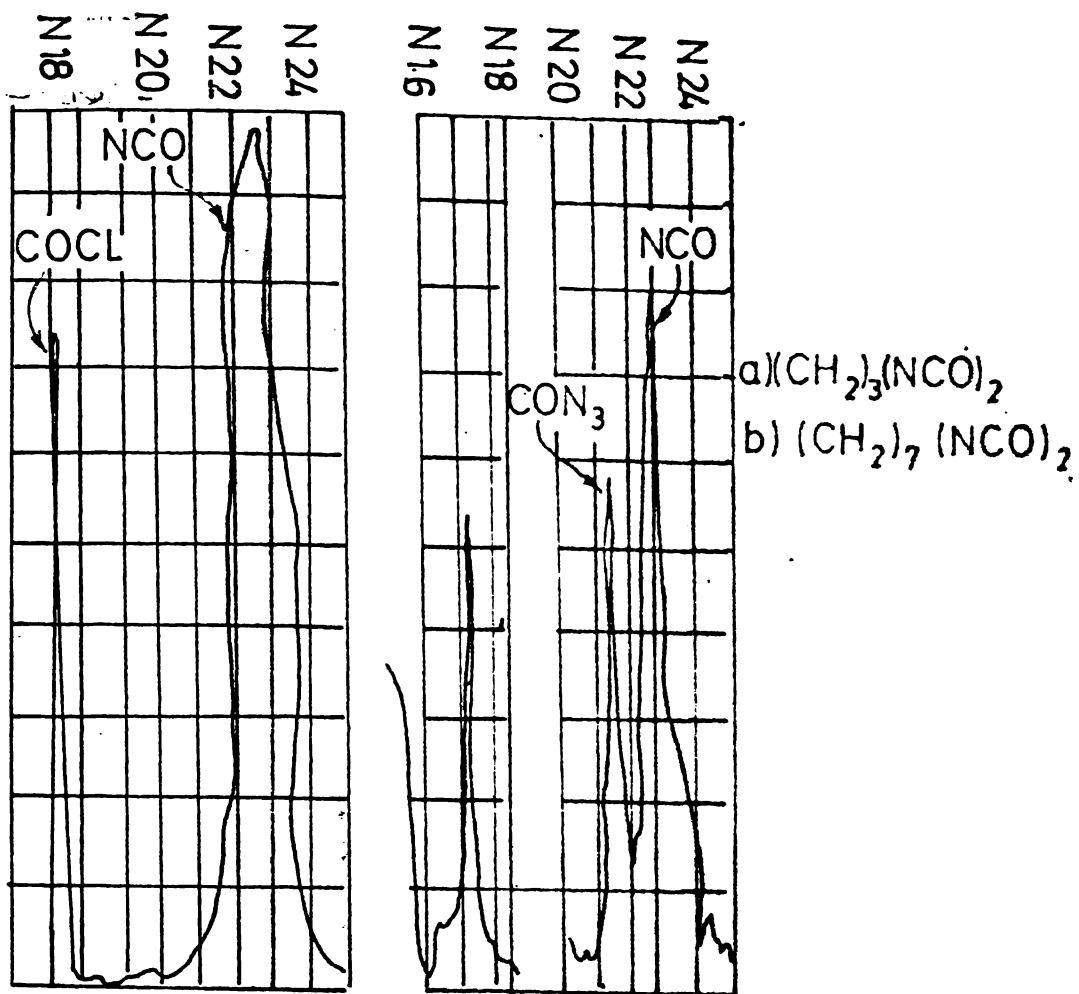


Fig 2

minată, o parte pierzându-se în timpul manipulărilor, controlul spectrofotometric al reacției de sinteză a 2-cloretil carbamoil azidei, 68, se poate realiza ușor urmărind dispariția benzii ν_{NCO} din spectru. Dacă după timpul prestabilit de reacție se mai constată spectrofotometric existența izocianatului în mediul de reacție, se mai adaugă o cantitate de soluție de acid azotidric (eliminarea excesului final de HN_3 făcându-se la vid fără încălzire).

În cazul reacției de nitrozare a 2-cloretil-carbamoil-azidei, 69, controlul spectrofotometric se urmărește: a) definitivarea nitrozării, detectabilă datorită deplasării benzii ν_{CO} de la 1650 cm^{-1} la 1710 cm^{-1} și dispariția ν_{NH} de la 3400 cm^{-1} și b) purificarea produsului, 61, de acid urmele de acetic și anhidridă acetică (ν_{CO} acid 1720 , ν_{CO} anhidridă 1825 cm^{-1}). Îndepărtarea acestor impurități cu ajutorul schimbătorilor de ioni poate fi, de asemenea, ușor urmărită pe această cale.

- Sinteza derivaților de uree. Deoarece de cele mai multe ori derivații de uree sînt insolubili în mediul de reacție, reacția se con-

sideră terminată când, din spectrul ir. al supernatantului, dispare absorbția caracteristică grupării NCO;

- sinteza nitrozoureeilor. Reacția de nitrozare este controlată spectrofotometric în ir prin deplasarea caracteristică, cu un $\Delta\nu=50-100$ cm^{-1} a benzii amidă I, către frecvențe mai înalte.

Poziția diferită a benzii amidă I din uree față de nitrozouree servește la determinarea definitivării reacției de nitrozare. Prezența unei absorbții (sub formă de umăr sau maxim slab) în regiunea $1610-1630$ cm^{-1} este un indiciu al unei nitrozări incomplete (fig.1). Puritatea și structura izomerică, așa cum era de așteptat, nu poate fi determinată pe această cale.

1.2. Absorbții în ir caracteristice compusilor noi sintetizați.

Spectrele ir obținute pentru noii derivați de uree și nitrozouree sintetizați în cadrul acestei lucrări, precum și atribuiri de benzi sunt concordante cu datele de literatură pentru acest tip de compusi.

Grupările funcționale din uree respectiv nitrozouree sunt evidențiate în ir prin următoarele absorbții :

- banda amidă I, ν_{CO} , se situează în derivații de uree în domeniul $1600-1640$ cm^{-1} . Nitrozarea acestora produce o puternică deplasare a acestei benzi la frecvențele $1700-1735$ cm^{-1} . Așa cum era de așteptat la derivații aromatici de uree, $\underline{17}$ (a-d), ν_{CO} apare la frecvențe mai mari decât în derivații alifatici, dar mai scăzute decât în arilamide. În soluții banda amidă I atât din uree cât și din nitrozouree este ușor deplasată la frecvențe mai mari.

- banda amidă II, apare în spectrul derivaților studiați în domeniul $1535-1595$ cm^{-1} . Este mai puțin intensă decât banda amidă I și nu-și modifică semnificativ poziția după nitrozarea derivaților de uree. În soluții suferă o deplasare slabă spre frecvențe mai mici.

- banda ν_{NH} . În spectrul derivaților de uree apar de obicei două absorbții în regiunea vibrațiilor de valență NH $3300-3400$ cm^{-1} .

În N-nitrozouree apare, de obicei, o singură absorbție în această regiune.

~~banda~~ ν N-NO, este o bandă de intensitate medie care apare în spectrul nitrozoureeilor în regiunea $1460-1505 \text{ cm}^{-1}$.

În cap. XVII sînt caracterizați, din acest punct de vedere, principalii compuși noi sintetizați (derivați de uree și nitrozouree).

XIV.2. Caracterizarea în RMN a noilor derivați de uree și nitrozouree.

Datele obținute din spectrele RMN ale ureelor și nitrozoureeilor, permit elucidarea a două categorii importante de probleme privind structura compușilor sintetizați și studiați în această lucrare, și anume:

a) natura izomerului rezultat în cursul nitrozării ureelor precursore. Rezonanța magnetică nucleară permite o discriminare clară între cele două tipuri de izomeri (1 sau 3), chiar și în cazul în care situația este complicată de posibilități suplimentare de nitrozare, cum este de pildă, cazul derivaților de triacetonamină (12);

b) structura și eventual conformația restului R de care este legată gruparea N-nitrozouree, obținându-se de fapt, confirmări ale structurilor propuse pentru acești radicali.

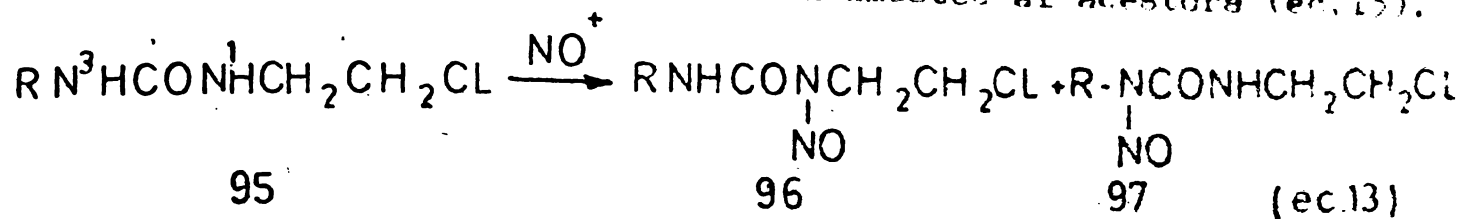
XIV.2.1. Studiul izomeriei 1-3 a N-nitrozoureeilor.

În general semnalele RMN ale 2-cloretile-ureelor ar trebui să se prezinte sub forma unor spectre A_2B_2X . /26/ Practic însă datorită caracteristicilor protonilor grupării 2-cloretile, ele se prezintă ca pseudo-singlete centrate în jurul valorii $\delta = 3,54 \pm 0,05 \text{ ppm}$. Această valoare poate fi dedusă din deplasarea chimică obținută pentru protonii ureelor cuprinse în tabelul 17.

- tabel 17 -

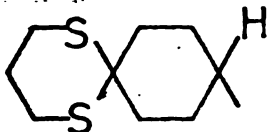
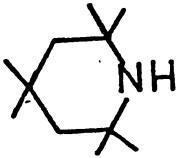
La nitrozarea 2-cloretileureelor, 25, atacul electrofili al grupării NO^+ se produce, în funcție de caracteristicile sterice sau electronice ale atomilor de azot din moleculă, fie la N1 fie la N3, obținându-se

nitrozo izomerii c orespunz atori sau un amestec al acestora (ec.13).

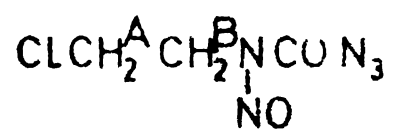


Tabel 17

Deplasările chimice ale protonilor grupării ClCH₂CH₂
  n 2-cloretiluree
 R-NH-CONHCH₂CH₂Cl

R	� (ppm)
C ₆ H ₅	3,68 - 3,75
C ₆ H ₁₁	3,56
N ₃ CO-	3,40 - 3,55
	3,58 - 3,60
	3,54

Teoretic, spectrele RMN ale celor două tipuri de izomeri sînt ușor de deosebit, deoarece în cazul compusilor 96 (izomeri 1-NO) ar trebui să se ob in  spectre de tip A₂B₂ caracteristice, constituite din două triplete ($\Delta\nu/J > 10$), pe c nd în cazul derivaților 97 (izomeri 3-NO) ar trebui să se ob in  pseudosinglete de tipul celor care se obțin în cazul ureelor precursorare, eventual ușor deplasate. Totuși, acest argument teoretic nu este concludent deoarece, pe de o parte trebuie menționat că  i în cazul azotiperitelor aromatice sau de tip uretanic, 98, unde de asemenea ar trebui să rezulte spectre A₂B₂, se obțin practic spectre reprezentate prin pseudosinglete (centrate în cazul steroizilor purtători de azotiperite de tip uretanic, în jurul valorii $\delta = 3,74 - 3,98$ ppm/8H, -/, deci la c mpuri ceva mai joase) /226/, iar pe de altă parte în unele



H_B 4.05
 H_A 3.42 ($J_{AB} = 6.0$)

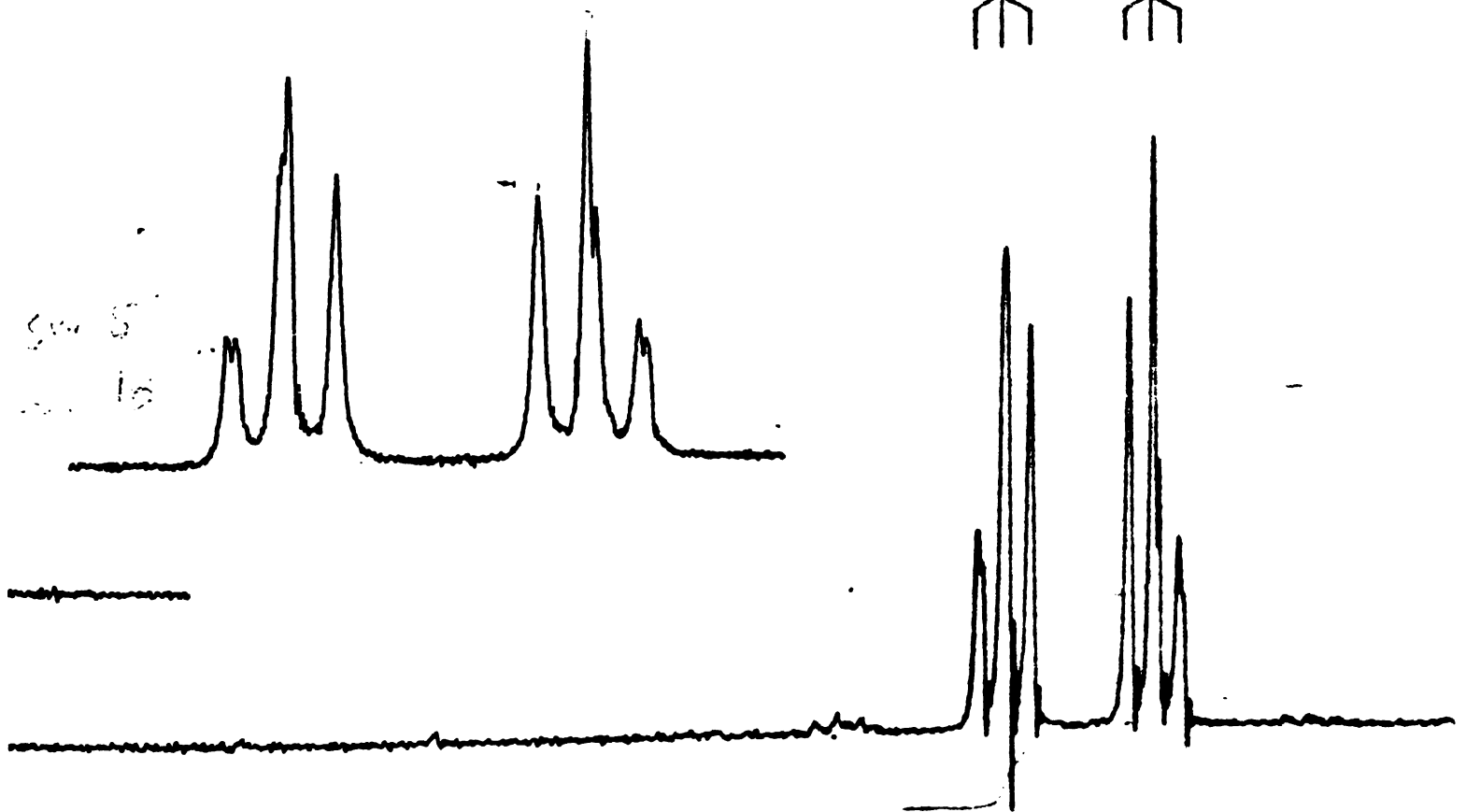
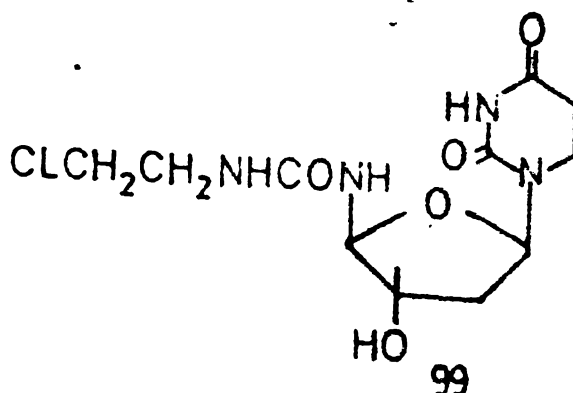
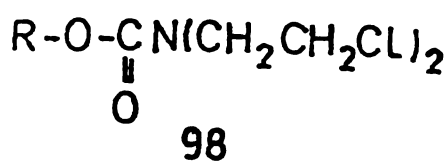


Fig 3

cazuri, de ex. 2-cloretil ureele, derivați de timidină, 99, prezintă doi multiplete $\delta = 3,57$ (m, 2H, CH₂N) și 3,26 (m, 2H, CH₂Cl) /56/.



Din analiza datelor obținute de noi în cazul derivaților noi sintetizați - date sumarizate în tabelul 18, coroborate și comparate cu cele din literatură, rezultă că :

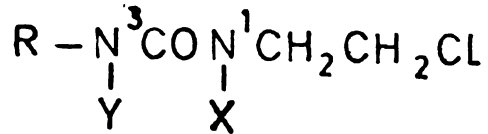
- tabel 18 -

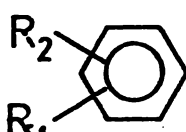
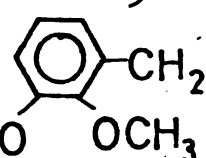
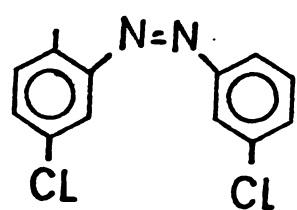
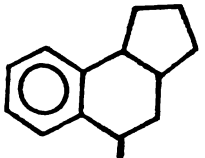
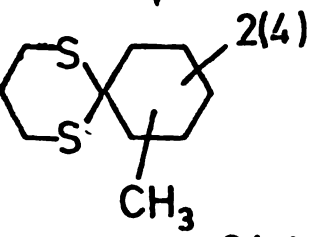
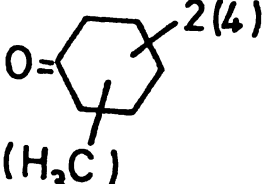
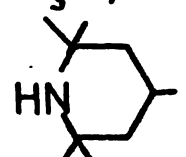
a) în cazul izomerilor 1-NO, 96, se obțin într-adevăr două triplete caracteristice unui spectru A₂B₂ /26/. Acest fapt apare clar atât în spectrul 2-cloretil-nitrozo carbamoil azidei, 61 (fig.3), unde nu există posibilitate de izomerie 1-3 (ClCH₂, 3,42, t, 2H; -CH₂N(NO), 4,05, t, 2H, J=6.0 Hz) cât și în cazul derivaților 6(a,b) care sînt în mod neechivoc izomeri 1-NO, fiind obținuți prin tratarea diaminelor respective cu reactivul 61.

În ceea ce privește atribuirea celor două triplete protonilor aparținînd celor două grupări metilen din restul 2-cloretil, datele de literatură sînt contradictorii. Astfel, Imbach /36/ atribuie tripletul de la cîmpuri mai joase protonilor grupării metilen adiacente halogenului, pe cînd Johnston îl atribuie grupării metilenice legată la N(NO) /195/. Logic, tripletul situat la cîmpuri mai joase (4,05-4,27 ppm) trebuie atribuit protonilor adiacenți grupării N(NO), deoarece scindarea pseudosingletului din ureidă ($\delta = 3,54$ ppm) în două triplete, apare consecutiv nitrozării la atomul de azot N1 al acesteia. Precizăm că în derivații de 2-cloretil uree, conform datelor noastre cât și a celor din literatură, deplasările chimice ale protonilor celor două grupări metilenice din restul 2-cloretil amino se suprapun. Acest rațio-

Tabel 12

Deplasările chimice ale protonilor grupării ClCH₂CH₂ în noii derivați de 2-cloretil nitrozouree sintetizați.



R	X	Y	ClCH ₂	CH ₂ -N ¹	J (Hz)
(CH ₂) _n n=2 - 8	H	NO	3,74 - 3,78		-
(CH ₂) _n n=7,8	NO	H	3,43	4,12	-
 R ₁ = NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl, COOCH ₃ R ₂ = 4(6)CH ₃	NO	H	3,56-3,60	4,15-4,20	6,0
	NO	H	3,50-3,56	4,20-4,27	6,0
	NO	H	3,50	3,42	10,0
	NO	H	3,53	4,20	6,0
	NO	H	3,50	4,20	-
	NO	H	3,48	4,22	6,0
	NO	H	3,42	4,12	6,0

nament nă constituie însă un argument absolut, deoarece pot avea loc inversări. Totuși se pot aduce argumente suplimentare în acest sens, și anume :

- poziția benzii corespunzătoare protonilor de la C₁ (fig.4) se

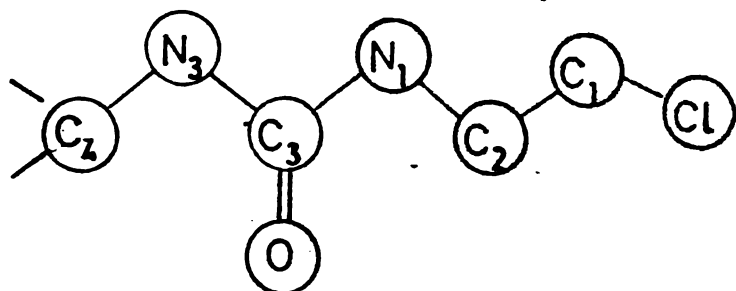
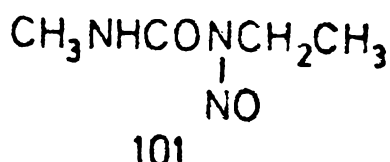
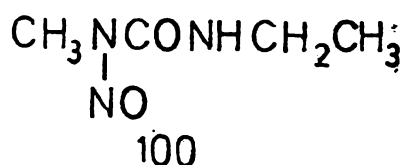


Fig. 4

situează, conform calculelor de deplasare chimică la $\delta = 3,47$ în ClCH₂CH₃. În cazul protonilor de la C₂, adiacenți atomului de azot N₁, această bandă



se situează la $\delta = 3,53$ în compusul 100 /65/. Rezultă deci că practic în cazul derivaților de uree discutați, aceste benzi se suprapun în mod întâmplător, ducând la efectul descris. La nitrozouree banda corespunzătoare protonilor de la C₂ suferă o deplasare, datorită efectului inductiv al grupării NO asupra atomului N₁. Astfel în compusul 101 această bandă poate fi identificată fără echivoc la $\delta = 3,89$ apărind sub forma unui cuartet caracteristic, pe când cea corespunzătoare protonilor grupării metil suferă o deplasare către câmpuri mai înalte ($\delta = 1,29$ ppm în ureidă, $\delta = 1,03$ în nitrozouree) /65/.

Rezultă deci că prin nitrozare, banda protonilor de la C₁ se deplasează către câmpuri mai înalte, pe când cea corespunzătoare protonilor de la C₂ suferă o deplasare contrară. Aceasta corespunde interpretării lui Johnston /195/.

- în cazul compusului 13, banda atribuibilă protonilor de la C₁ poate fi de asemenea recunoscută fără echivoc, deoarece datorită protonului grupării OH adiacente, aceasta se prezintă ca un cuartet situat la $\delta = 3,60$ ppm, $J = 6,0$ Hz cuartet ce se transformă în triplet în cazul

tratării cu D_2O (fig.5,a,b).

b) în cazul izomerilor 3-NO, 97, care ar trebui să dea un spectru A_2B_2X , se obține un pseudosinglet, centrat în jurul valorii $\delta = 3,74 - 3,78$ ppm. Această atribuire se poate face analizând spectrul BCNU care ne dă o imagine fidelă a ambelor situații. Față de ureidă absorbția protonilor grupării 2-cloretil suferă o deplasare către câmpuri mai joase cea $0,22-0,24$ ppm.

O complicație suplimentară intervine în cazul compusilor 5, în care atribuirea poziției grupării nitrozice este mai dificilă. Totuși există argumente ce permit atribuirea cu destulă certitudine a poziției 3-NO în acest caz și anume :

- împiedicarea sterică a nitrozării în poziția adiacentă ciclului ciclohexanic ;

- obținerea unui dublet pentru semnalul N-H ($\delta = 6,74 - 6,80, d, m$, $J = 7,0$ Hz). Acest fapt nu concordă cu poziția grupării NO la N_1 , deoarece în acest caz ar trebui să rezulte un triplet, ce apare de obicei ca o bandă largă. În cazul izomerilor 1-NO și derivaților alifatici, 6, semnalul corespunzător apare la $\delta = 6,74-6,80$ pe când în izomerii 3-NO, 4, acesta este larg și situat la $\delta = 7,30 - 7,60$ ppm.

Trebuie menționat faptul că prin nitrozarea random a derivaților de uree 55 și 56 se pot forma, teoretic, atât izomeri 1 și 3-NO cât și amestecuri complexe ale acestora. Practic din analiza compusilor sintetizați în cadrul acestei lucrări reiese că, în raport cu procedeul de lucru, rezultă doar unul dintre izomerii posibili, fapt confirmat de datele de RMN discutate în capitolul de față.

În cazul în care halogenul grupării 2-cloretil este substituit cu o funcțiune hidroxi, ca în compusul 13, deși atunci generală a spectrului nu se modifică considerabil, apar câteva aspecte caracteristice și anume: CH_2-N , $\delta = 4,09, t$ și CH_2-O , $\delta = 3,60, q, J_{DP} = 6$ Hz, precum și un

triplet suplimentar $\delta = 2,91$, $J_{FG} = 6\text{Hz}$, atribuibil protonului legat de oxigen, deoarece la deuterare acesta dispare, împreună cu semnalul atribuibil protonului legat de atomul de azot adiacent ciclului ($\delta = 7,0$, $J_{AB} = 6,0\text{ Hz}$) (fig. 5a,b).

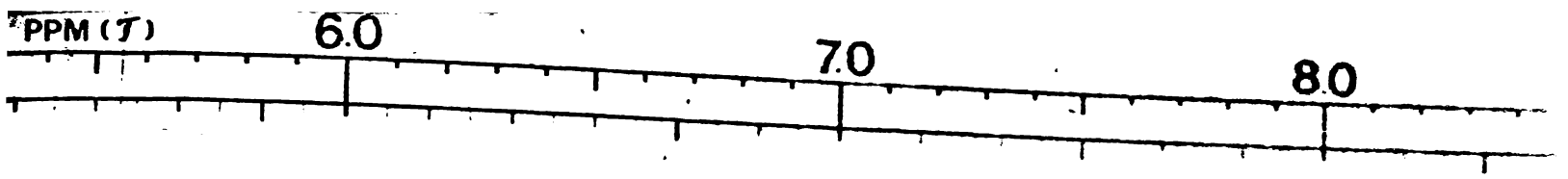
În sfârșit, în cazul compusului 38a nitrozarea în poziția 1 se poate pune în evidență ușor deoarece în acest caz semnalul dat de protonul grupei metil, care în ureidă se prezintă ca un dublet ($\delta = 2,83$, d, $J = 4,2\text{ Hz}$, lit. $\delta = 2,62 - 3,78$, d, $J = 5,0\text{ Hz}$ /65/) se transformă într-un singlet bine definit situat la cîmpuri mai joase ($\delta = 3,13$, s, lit. $3,20$ /65/).

Trebuie semnalat faptul că, spre deosebire de mono sau bis ureele discutate anterior, nitrozarea derivaților de triaceton-amină (12) poate duce, datorită existenței unui al treilea centru bazic, la amestecuri de mono și dinitrozo derivați (schema 3). Dacă nitrozarea la N_3 este împiedicată steric (similar derivaților de dîclohexan) totuși atomul de azot din ciclu poate suferi atacul electrofil al cationului NO^+ . Această posibilitate complică atribuirile structurale din această serie, deoarece spectrele RMN nu mai sînt concludente pentru deosebirea compusului 38 de 40 (schema 3).

În ceea ce privește poziția, axială sau ecuatorială, a grupării ureidice pe inelul ciclohexanic sau respectiv N-nitrozoureidice, din datele de literatură, privind studiul configurației acestui tip de molecule prin difracție de raze X, rezultă că în MeCONH ea ocupă o poziție ecuatorială. Aceasta concordă cu deplasarea chimică a protonului H găsit la $\delta = 4,00 - 4,35\text{ ppm}$.

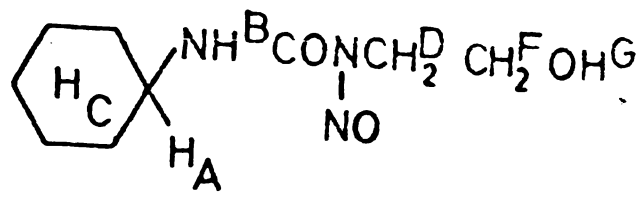
XIV.2.2. Structura resturilor legate de funcțiunea N-nitrozoureie.

1. În cazul derivaților aromatici, aceștia apar în limitele normale, avînd, în funcție de gradul de substituire al nucleului, aspecte-



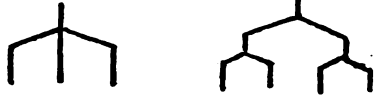
200

100



$\text{H}_D + \text{H}_A + \text{H}_F$

4.09 (J=60) 3.60 (J=60)



H_G

2.91 (J=60)



H_C

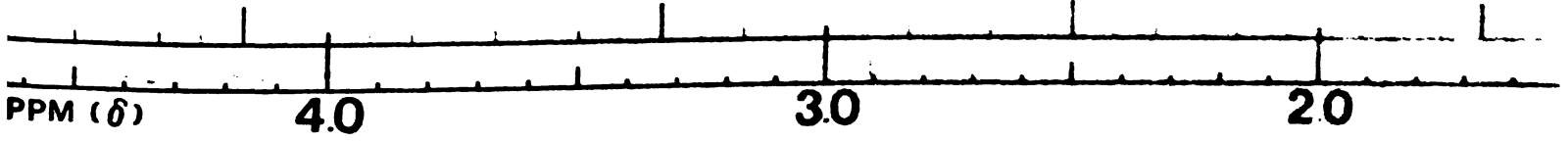
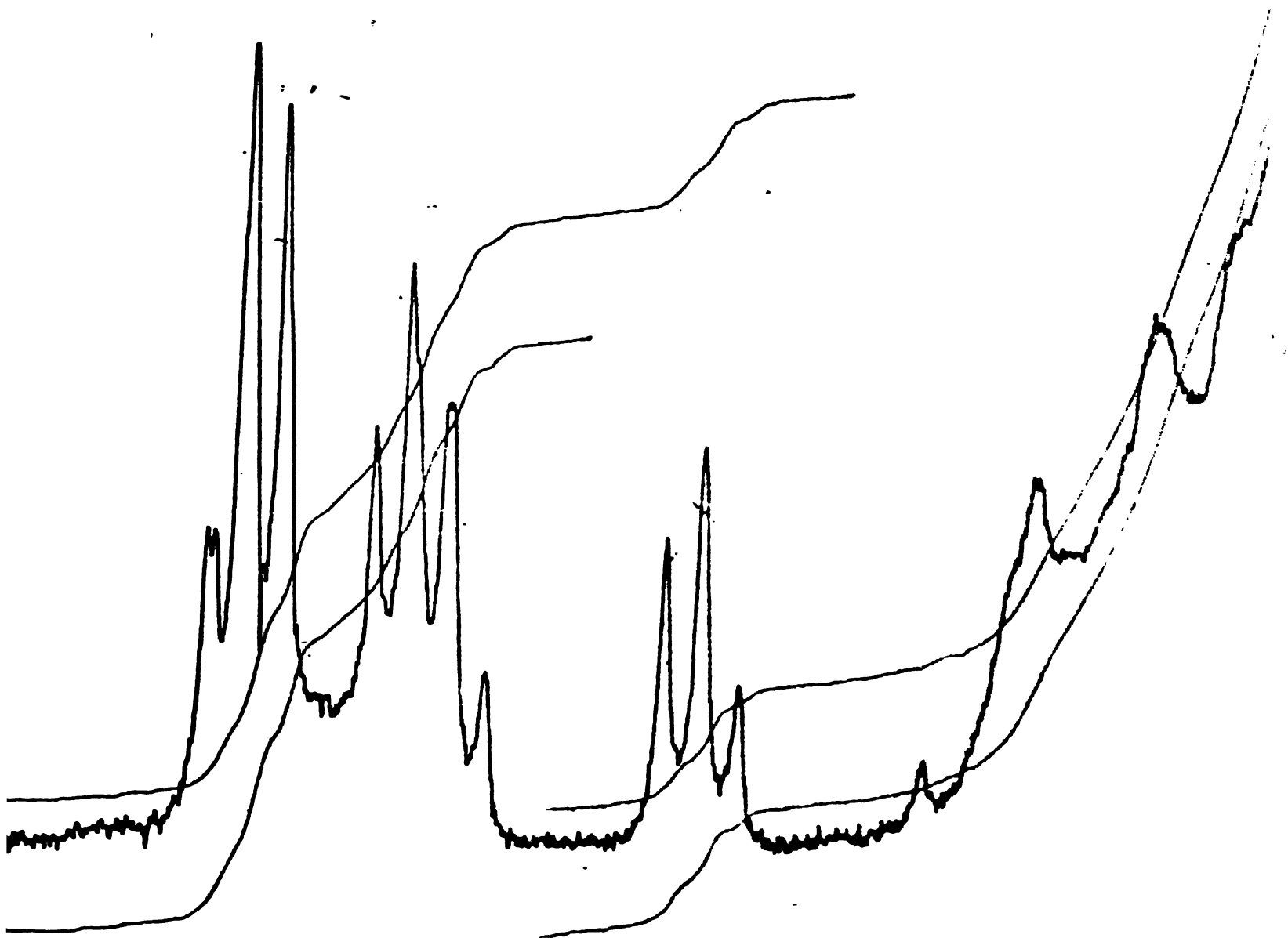


Fig 5a

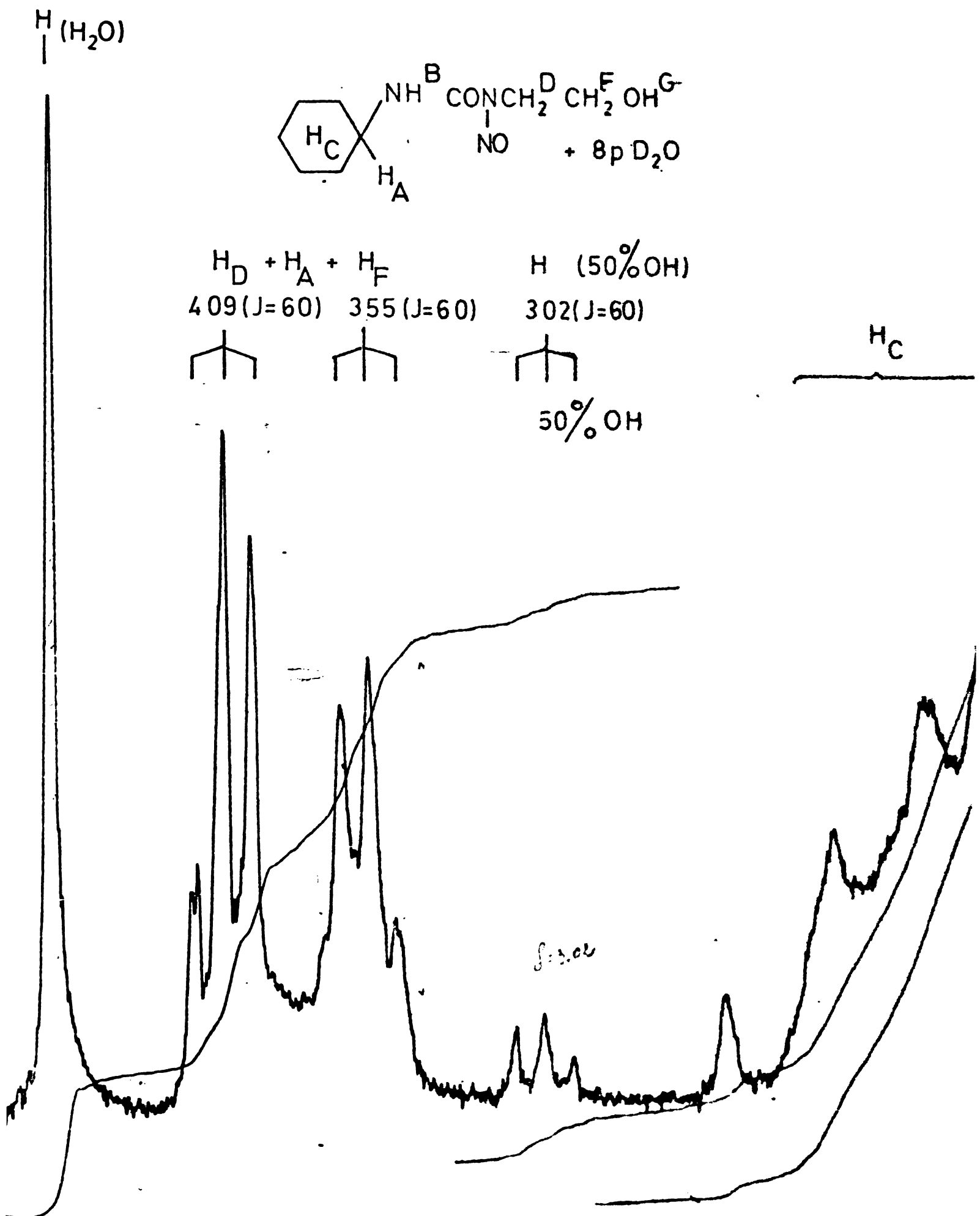


Fig 5b

le caracteristice în concordanță cu datele de literatură.

2. În cazul derivaților alifatici, 4 și 5 se remarcă apariția a două grăpuri de benzi și anume: (tabel 19)

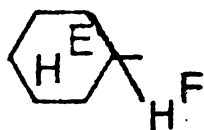
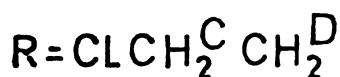
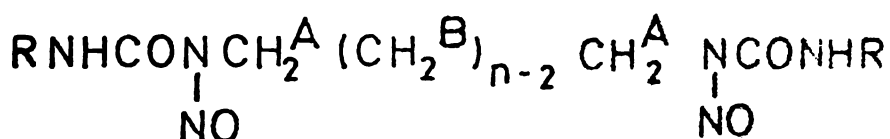
- benzile protonilor de tip A, adiacenți funcției N-NO, situate la $\delta = 3,92$ în compuşii 4 și respectiv $\delta = 3,73 - 3,90$ ppm în compuşii 5, sub formă unor multiplete nerezolvate;

- benzile protonilor de tip B, la $\delta = 1,25 - 1,55$ în compuşii 4 și $\delta = 1,27 - 2,11$ în compuşii 5, ce apar de asemenea ca multiplete nerezolvate.

Benzile caracteristice protonilor ciclonexanici, în compuşii 5 apar în regiunea 1,27-2,11. Protonul H_F apare ca un multiplet în regiunea 3,84, ceea ce sugerează un proton de tip axial (tabel 19).

Tabel 19

Analiza spectrelor RMN ale derivaților de bis nitrozouree alifatici și cicloalifatici (4 și 5)



Deplasare chimică δ (ppm) ^(a)	Compuşii	
	<u>4</u>	<u>5</u>
H^A	3,92 ^(b) (4H)	3,73 - 3,90 ^(c) (4H)
H^B	1,25-1,55 (4-12H)	suprapusi peste semnalele protonilor H^B ^(d)
H^C, H^D	3,74 - 3,78 (8H)	-
H^E	-	1,27 - 2,11 (22H)
H^F	-	3,84 (2H) ^(e)
<u>N-H</u>	7,30 - 7,60 (2H)	6,74-6,80(2H, J_{F-H} = 7,0 Hz)

a) semnal intern TMS; solvent CCl_3 ; b) determinat în compuşii 4 și 5. În ceilalți derivați de acest tip ($n = 3-3$) absorbțiile apar în domeniul protonilor H^C și H^D ; c) în compuşii 5 ($n=2$) banda apare ca un triplet, în 5b ($n=3$) ca un triplet ($J_{AB} = 7,0$ Hz) și în compuşii cu $n > 3$ ca un multiplet; d) absorbția este în domeniul protonilor H^B probabil 1,27-1,30(m, 2-12H); e) picul corespunzător protonului H^F se suprapune peste cele ale de protonii H^A .

3. In cazul derivaților de triaceton-amină există relativ puține date în literatură privind spectrele de RMN /209,227,228/. Se pot deosebi două situații :

a) atunci când în poziția 4 avem o dublă legătură (ex. 102-105 fig.6). In această situație toate cele patru grupări metil sînt practic echivalente, apărînd la $\delta = 1,20$ ppm, cu excepția compusului 105, unde acilarea la atomul de azot din ciclu determină o deplasare a acestora către cîmpuri mai joase ($\delta = 1,40$ ppm).

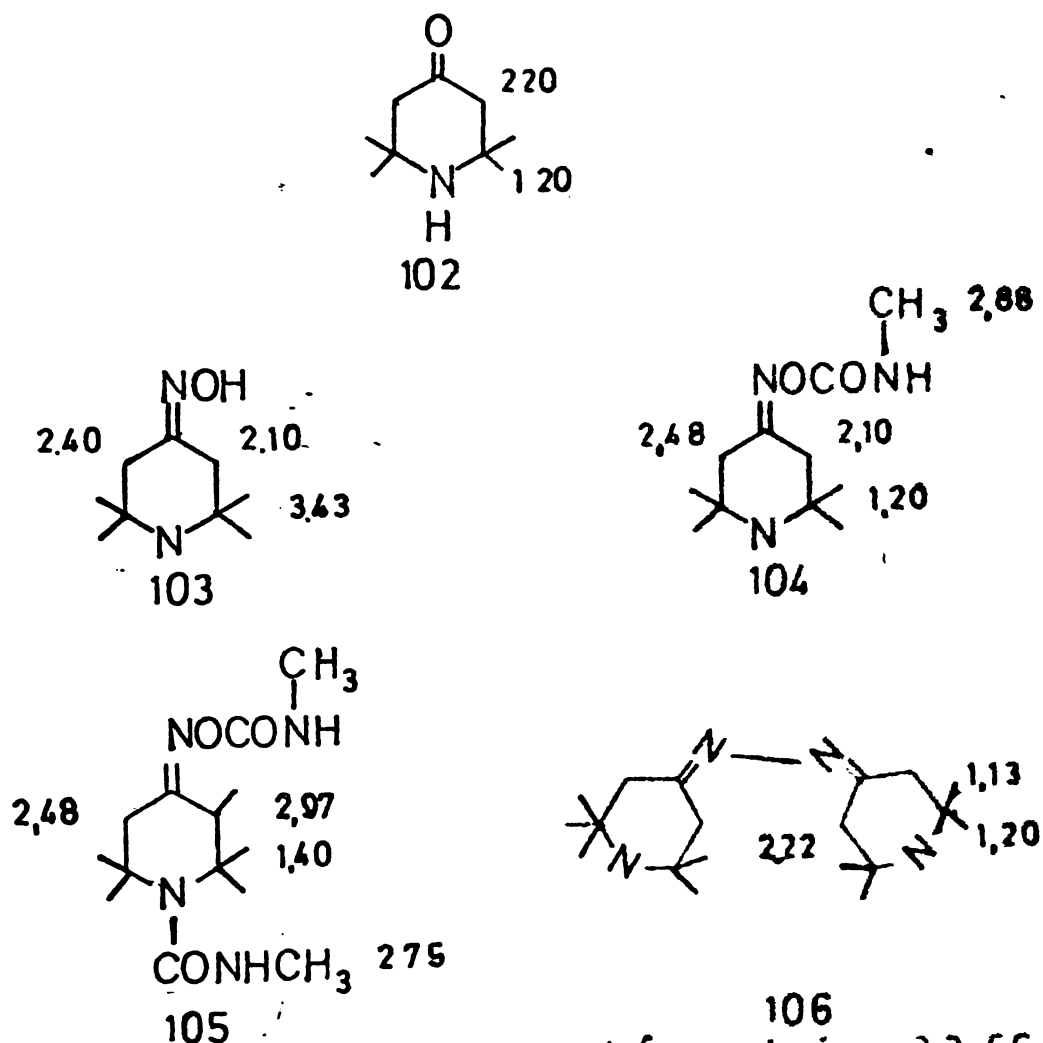


Fig 6 Deplasari chimice (δ , ppm) in 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-onă și derivați cu dublă legătură în poziția 4.

Cele două grupări metilenice din pozițiile 3 și 5, care în cetonă, 102, apar sub forma unui singlet la $\delta = 2,20$ ppm, sînt scindate în două singlete distincte în moleculele în care apar asimetrii de substituție a dublei legături ca de ex. în oxima 105 (vezi fig.6). Aceste atribuiri concordă cu datele de literatură găsite de exemplu pentru structura 106 (fig.6), cu mențiunea că aici grupările metil apar neechivalente, pro-

tabil din cauză interacțiunii între cele două cicluri hexanice.

b) în cazul derivaților 4-substituiți, fără dublă legătură în această poziție, situația devine mai complicată. Este probabil că, așa cum rezultă din studiul spectrelor RMN de C^{13} , ciclul de 6 atomi are forma unui scaun deformat. Această interpretare este menționată în literatură pentru 1-2,2,6,6-piperidinel-4-oxidului 106, fig.7 /209/. Existența unei astfel de conformații (construită cu ajutorul modelelor dreiding pentru compuşii noştri) face spectrele RMN mai greu de interpretat, în special datorită neechivalenței protonilor metilenici din 3 și 5, ce apar ca doi dubleți. Literatura atribuie acestor protoni, în cazul 1-2,2,6,6-tetrametil piperidinel-4-oxidului, benzile ce apar la $\delta = 1,83$ ($J = 3,6$ Hz) și $\delta = 2,03$ ($J = 3,6$ Hz). De asemenea nici cele patru grupări metil nu sînt echivalente (δ 1,13 și 1,20). În 2,2,6,6-tetrametil piperidinel-4-amina (104, fig.7) structura spectrului este asemănătoare apărînd două dublete la δ 1,74 și 1,86 ($J = 4,2$ Hz) iar deplasările chimice ale grupărilor metil apar la δ 1,07 și 1,17. Aceste caracteristici se mențin în toată seria de compuşii. Trebuie menționat totuși că atribuirea protonilor grupărilor metilen din pozițiile 3 și 5 nu sînt absolut sigure, deoarece conform integralelor, una din aceste grupe poate apărea cu un cuartet la 1,84 ppm, cealaltă fiind acoperită de semnalul grupărilor metil. În acest caz are loc o primă scindare datorită cuplajului cu protonul din poziția 4 ($J = 12,0$ Hz) și apoi o a doua datorită neechivalenței celor doi protoni geminali (cuplaj geminal $J = 4,8$ Hz). În derivații 109, 110, situația este similară (fig.7).

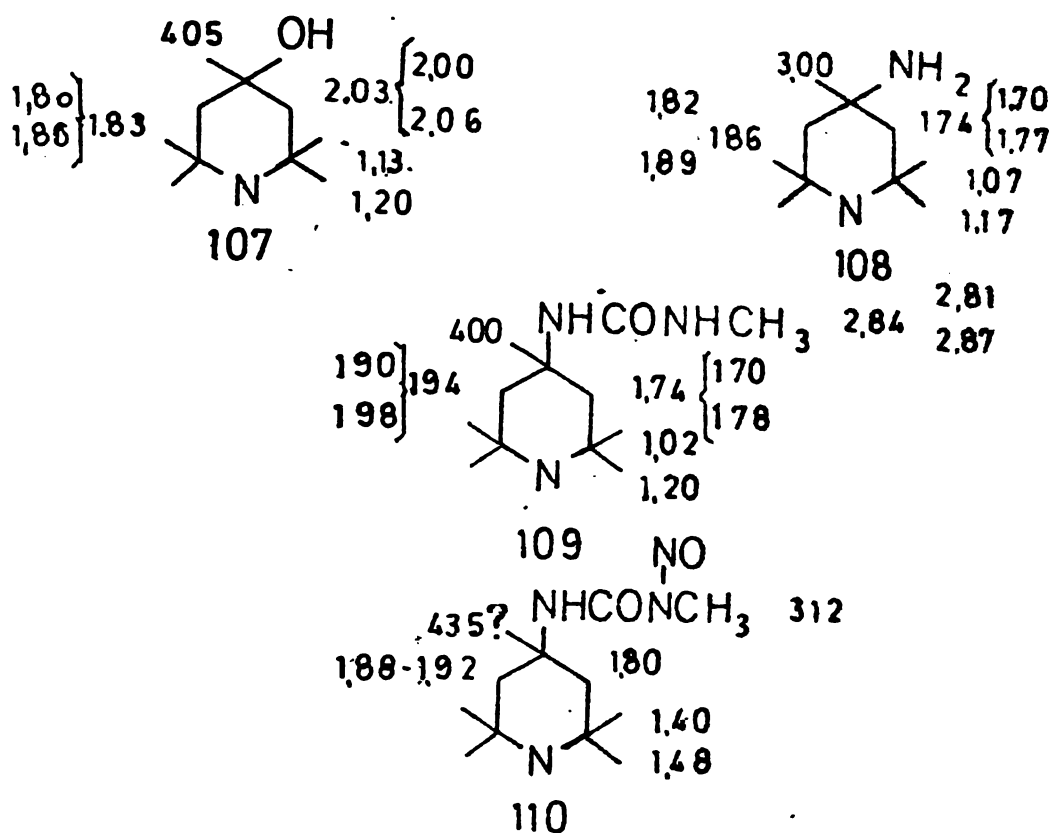


Fig 7 Deplasări chimice (δ , ppm) în 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ol și derivați.

XIV.3. Elemente caracteristice ale spectrelor de masă ale nitrozourelor.

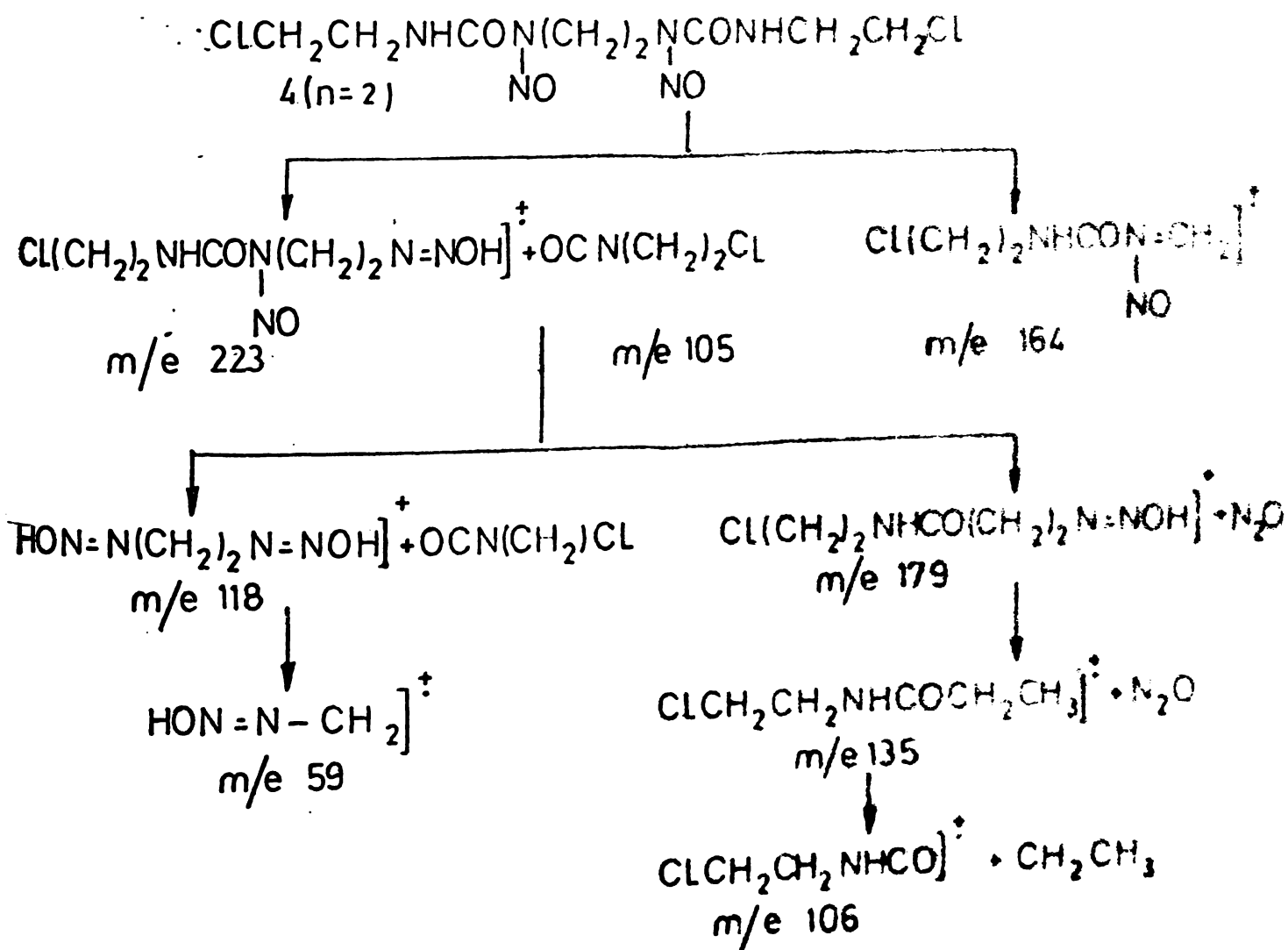
În literatura de specialitate studiul 1-(2-cloretil)-1-nitrozourelor cu ajutorul spectrometriei de masă, este abordat mai ales pentru determinarea naturii produșilor lor de metabolizare in vitro sau in vivo. Uneși studii exhaustive, care să evidențieze modul și mecanismele de rupere, în vederea unor atribuiri structurale, nu s-au întreprins, datele de literatură de care dispunem evidențiază următoarele : /57-60,65,76/

- picurile de masă sînt relativ slabe și de mică utilitate în cazul acestor compuși;
- izomerii 1-(2-cloretil)-1-nitrozo sînt caracterizați prin picul $M^+ - ClCH_2CH_2N = NOH$;
- izomerii 1-(2-cloretil)-3-nitrozo sînt caracterizați prin pi-

Sursele $M-ClCH_2CH_2^+$, $M-ClCH_2CH_2NHCO+H^+$ și $M-ClCH_2CH_2NHCO+n-H^+$.

În cadrul lucrării de față s-au efectuat și analizat spectrele de masă pentru unii dintre compușii studiați în vederea aducerii unor probe suplimentare în favoarea atribuirilor structurale făcute. Datele obținute confirmă structurile propuse, evidențiindu-se următoarele:

a) deoarece în cazul derivaților alifatici de bis 1-(2-cloretii)-2-nitrozouree, 4, obținerea izomerilor 3-nitrozo prin nitrozarea directă a ureelor precursore este mai mult sau mai puțin surprinzătoare, s-a considerat necesară efectuarea spectrelor de masă, cel puțin pentru câțiva reprezentanți, ca o dovadă suplimentară care să susțină atribuțiile structurale. Rezultatele obținute în cazul compusilor 4 ($n=2-4$) sunt consistente cu structura propusă. Nu se obțin ioni moleculari și nici vreun fragment care să conțină ambii ioni de clor. Principalele fragmente se obțin prin transpoziție McLafferty (m/e 223, 118), scindare cu pierdere



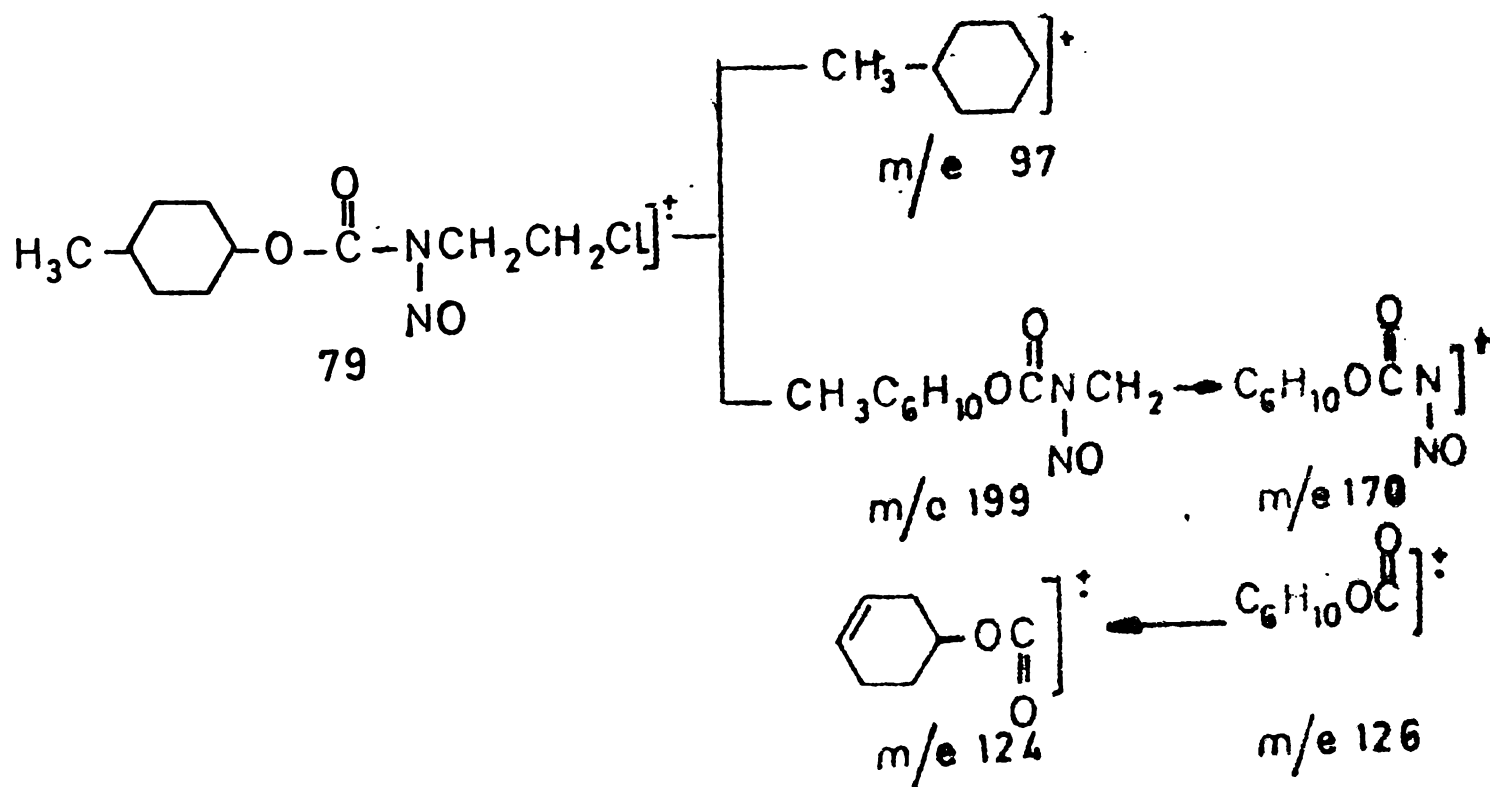
Schema 7

de 44 unități (N_2O) și alipirea extremelor (m/e 179, 135) sau fragmentare simplă (m/e 164, 106, 59). Pentru ambii compusi se identifică picurile caracteristice structurii 3-nitrozo N-ClCH₂CH₂NHCO+H⁺ (m/e 223 respectiv 237) (schema 7);

b) 1-(2-hidroxietyl)-1-nitrozo-3-ciclohexilureea, 13, analogul CCNU hidroxilat în catena laterală, are un spectru de masă asemănător cu cel obținut de noi pentru CCNU. Si în acest caz, principalele fragmente provin prin rearanjări de tip McLafferty (fig.8).

- fig.8 -

c) N-(2-cloretil)-N-nitroso-O-4-metil-ciclohexil-uretanul, 79, are un spectru de masă în care preponderente sînt picurile provenind din fragmentarea simplă a moleculei, consecutive eliminării fragmentului CH₂Cl (schema 8).



Schema 8

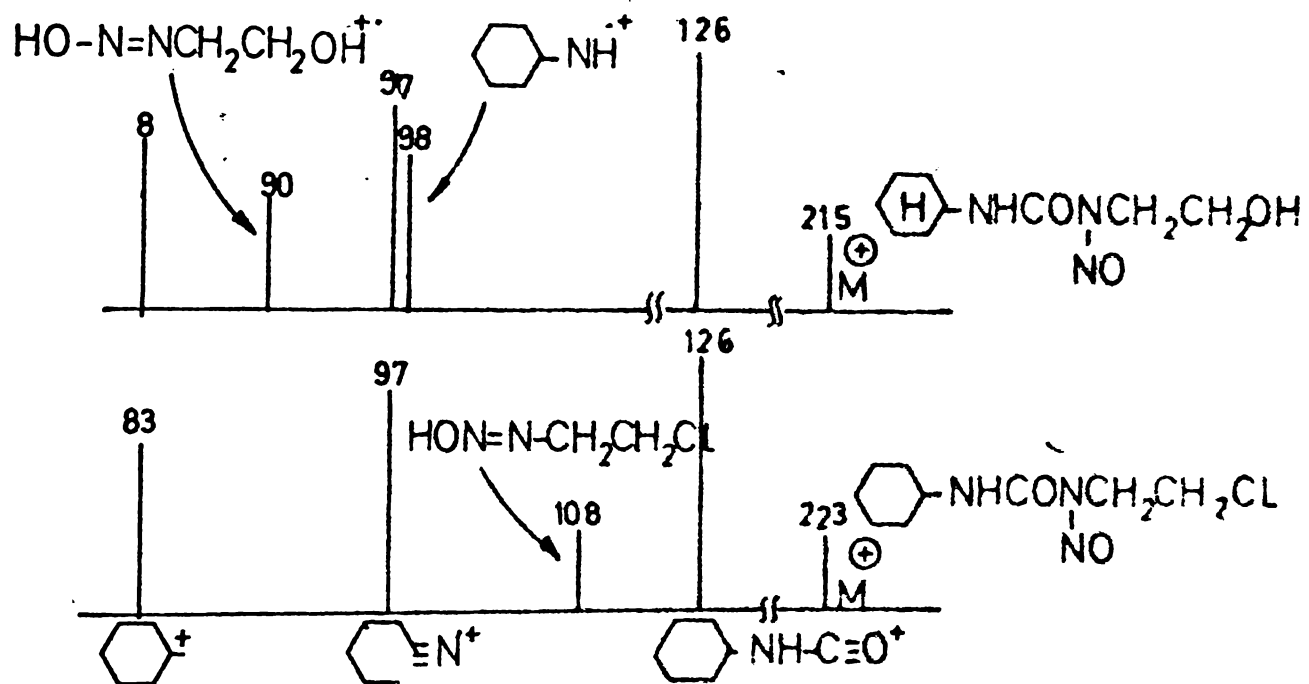


Fig 8 Spectrul de masă de joasă rezoluție a CCNU și HO-CCNU

XIV.4. Caracterizarea RES a derivaților de uree și nitrozouree nitroxidici.

Derivații de uree și nitrozouree 4-piperidinil-1-oxi, fac parte din clasa radicalilor liberi stabili, al căror moment magnetic de spin este datorat electronului nepereche din orbitalul π localizat la legătura nitroxidică (N = O).

Sinteza și studiul acestor derivați, primii de acest tip din literatura de specialitate, a fost realizată în vederea posibilității elucidării prin tehnica RES a unor aspecte privind descompunerea, metabolizarea și farmacocinetica derivaților de N-nitrozouree.

Intr-o primă etapă s-a urmărit efectuarea și caracterizarea spectrelor RES ale noilor compuși în raport cu cel al N-oxizilor piperidinici "clasici" (ex. 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinon-1-oxi, TEMPO, 2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxipiperidinil-1-oxi, TEMPOL) urmărind modul în care structura fină și hiperfină a spectrului este influențată de natura substituentului din poziția 4 (fig.9).

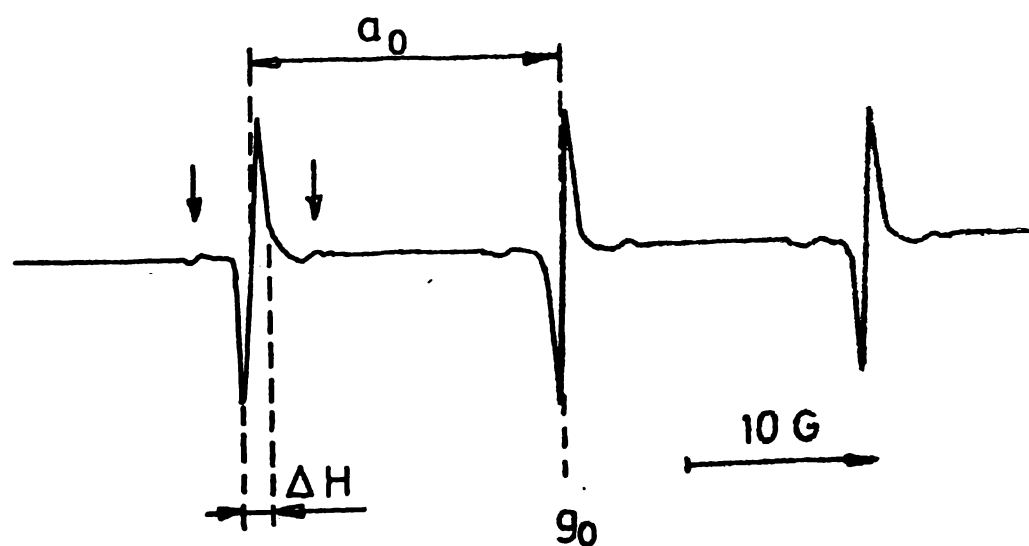


Fig 9 Spectru RES TEMPO

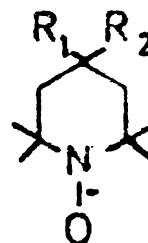
Analiza spectrelor RES ale noilor compuși sintetizați (tabel 20) evidențiază că /229/ :

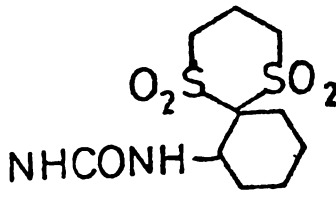
- lărgimea de linie pentru toți compuşii este mai mare decât în cazul TEMPO sau TEMPOL, ceea ce îngreunează evidențierea cuplării hiperfine cu C^{13} ;

- este o slabă dependență a parametrilor RES de natura substituentului din poziția 4, ceea ce îi recomandă ca markeri de spini.

Tabel 20

Caracterizarea RES a derivaților de uree și nitrozouree nitroxidici



Nr. compusului	R ₁	R ₂	g ⁽¹⁾	H ⁽²⁾ (G)	A _N ⁽³⁾ (G)	A _{C₁} ⁽⁴⁾ (G)	Solvent
TEMPO	H	H	2,0057	0,46	15,87	6,05	H ₂ O
TEMPOL		C=O	2,0058	0,60	16,05	6,05	H ₂ O
41a	H	NHCONHCH ₃	2,0059	1,57	16,83	-	MeOH
32a	H	NHCON(NO)CH ₃	2,0059	1,61	16,93	-	MeOH
41b	H	NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	2,0057	1,81	16,70	-	MeOH
32b	H	NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl	2,0057	1,81	16,90	-	MeOH
41c	H	NHCONHC ₆ H ₁₁	2,0057	1,81	17,04	-	MeOH
41d	H		2,0057	1,71	16,90	-	MeOH

1) g-factor de desplicare spectroscopică. (În cazul compuşilor studiați banda de rezonanță a electronului impar este desplicată de câmpul magnetic al N^{14} (I=1) în trei componente egal distanțate. Spectrometrele RES înregistrează de fapt derivate I^a a acestor curbe); 2) H - semilărgimea liniei de rezonanță; 3) A_N (G) - constanta de cuplare cu N^{14} ; 4) A_{C₁} (G) - constanta de cuplare cu C^{13} .

XV. Proprietăți fizico-chimice ale derivaților de nitrozouree.

Dintre proprietățile fizico-chimice considerate responsabile pentru activitatea biologică a noilor derivați de N-nitrozouree au fost investigate următoarele :

- liposolubilitatea ($\log P$)
- viteza de descompunere ($T_{0,5}$)
- activitatea alchilantă (A)

Acestea pe lângă indicațiile generale ce le furnizează asupra comportării in vivo a acestor substanțe, vor servi și la calcularea relațiilor cantitative structură-activitate.

XV.1. Liposolubilitatea ($\log P$) este un parametru cu proprietăți aditive definit de Hansch, /31/, și care reflectă distribuția între octanol: apă a substanței investigate conform relației :

$$\log \frac{1}{c} = - k_1 \pi^2 + k_2 \pi + k_3 \quad (\text{ec.13})$$

În cazul derivaților de N-nitrozouree valorile lui $\log P$ (π) au fost atât determinate spectrofotometric folosind metoda lui Hansch /31/ cât și calculate folosind proprietățile aditive ale parametrului pe baza datelor din literatură /31,46,108/ (vezi și cap. VII).

Constantele de lipofilie ($\log P$) astfel obținute sînt prezentate în tabelul 21.

- tabel 21 -

Studiul variației acestora în funcție de structura compuşilor evidențiază următoarele /230/ :

- în seria bis-[1-(2-cloretil)-3-nitrozoureeelor] serie a,4 (7-8), există o bună concordanță între valorile teoretice și cele experimentale ale $\log P$ pentru derivații în care $n \leq 4$. Odată cu creșterea numărului de grupări metilenice din moleculă concordanța dintre cele două seturi de valori scade, probabil datorită plierii moleculei. În această serie se constată o variație lineară a valorilor experimentale ale $\log P$ în raport

Table 21


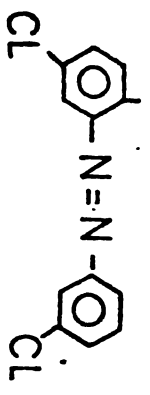
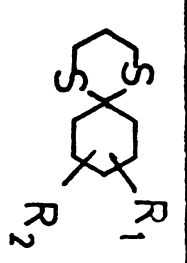
Valori experimentale ale parametrilor fizico-chimici obținute
pentru noii derivați de N-nitrozouree (a)

Nr. comp.	Formula	Log P	Log P _{rel} (CCNU=1)	K' ₆₀₀ ^{NBP} min ⁻¹	K _{rel} (CCNU=1)	T _{0,5} min	T _{0,5} rel (CCNU=1)
4a	C10H ₂ CH ₂ NHCOH(NO) 2(CH ₂) ₂	1,36±0,04	0,48	24,4	7,77	144	2,56
b	- (CH ₂) ₃ -	1,74±0,03	0,61	15,1	4,81	148	1,60
c	- (CH ₂) ₄ -	2,12±0,01	0,75	28,6	9,10	154	1,66
d	- (CH ₂) ₅ -	2,47±0,01	0,87	13,5	4,30	167	1,80
e	- (CH ₂) ₆ -	2,61±0,05	0,92	10,0	3,18	172	1,86
f	- (CH ₂) ₇ -	2,79±0,01	0,99	19,4	6,18	151	1,63
g	- (CH ₂) ₈ -	2,97±0,01	1,05	2,0	0,64	251	2,71
2a	C ₆ H ₁₁ NHCON(NO) 2(CH ₂) ₂	2,05±0,05	0,72	2,3	0,73	152	1,64
b	- (CH ₂) ₃ -	2,66±0,01	0,94	-	-	190	2,05
c	- (CH ₂) ₄ -	3,00±0,04	1,06	2,5	0,80	206	2,22
d	- (CH ₂) ₅ -	3,21±0,09	1,13	1,5	0,48	216	2,33
e	- (CH ₂) ₆ -	3,11±0,08	1,10	4,3	1,37	278	3,00
f	- (CH ₂) ₇ -	3,02±0,06	1,07	5,2	1,66	214	2,31
g	- (CH ₂) ₈ -	3,26±0,02	1,15	1,0	0,32	407	4,40

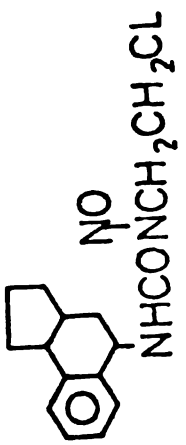
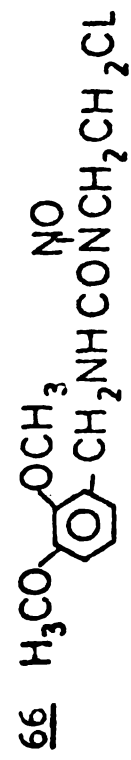
continue tabel 21

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	R_1						
	R_2						
23b	8-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl		H	3,80	1,21	123,3	1,33
c	8-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl	2,60±0,02	6-CH ₃	4,83	1,54	132,0	1,42
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_{10} \\ \\ \text{NHCON(NO)CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \end{array} $							
25b	H	0,90±0,04		1,94	0,62	58,5	0,63
c	4-CH ₃	1,52±0,02		3,12	0,99	58,5	0,63
$ \begin{array}{c} \text{X-N} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_{10} \\ \\ \text{NHCON(NO)R} \end{array} $							
29a	R		X				
	CH ₃	0,2±0,05	H	-	-	223,5	2,41
b	-CH ₂ CH ₂ Cl	3,20±0,03	H	2,36	0,75	126	1,36
30	CH ₃	1,86±0,02	NO	-	-	230	2,48
22a	CH ₃	1,30±0,01	O	-	-	243	2,62
b	-CH ₂ CH ₂ Cl	1,92±0,01	O	5,97	1,90	77,7	0,84

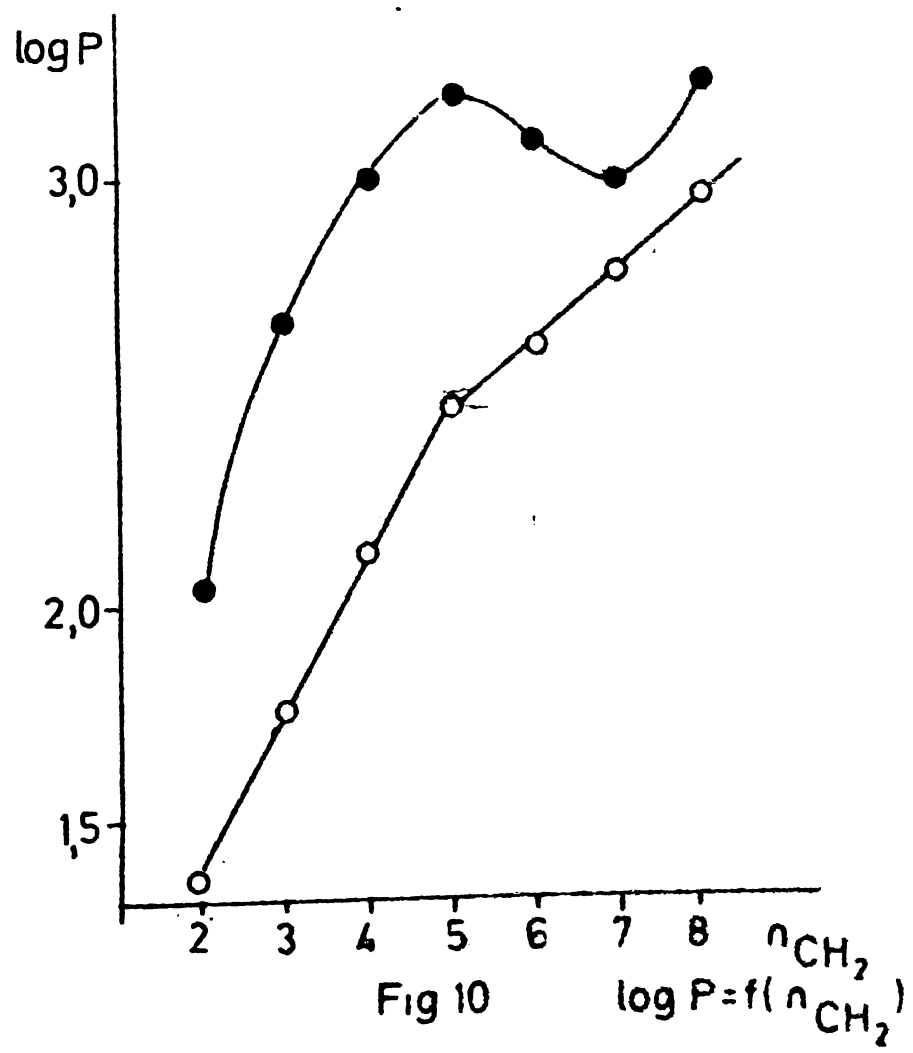
kontinyuare tabel 21

Nr. comp.	Formula	log P	log P _{rel} (CCNU=1)	k' ₆₀₀ ^{NBP} mln	k _{rel} (CCNU=1)	T _{0,5} min.	T _{0,5} rel (CCNU=1)
6a	ClCH ₂ CH ₂ N(NO)CONH 2(CH ₂) ₇	2,54±0,04	0,90	6,80	2,16	173,6	1,87
b	- (CH ₂) _n -	2,76±0,04	0,96	7,13	2,27	151	1,63
							
18a	3-COOCH ₃	2,03	0,72	5,45	1,74	-	-
b	2-COOCH ₃	2,07	0,73	1,23	0,39	-	-
c	2-COOCH ₃	2,05	0,72	3,35	1,07	-	-
d	3-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl	2,80	0,99	14,20	4,52	-	-
e							
							
23a	6-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl	2,41±0,03	0,85	2,04	0,65	86,5	0,93

continuare tabel 21

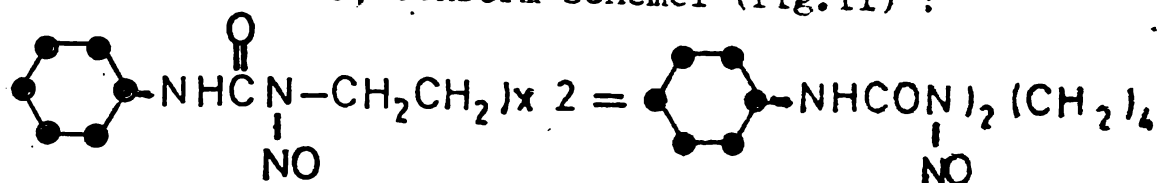
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
48	 <chem>CC1(CCN1)C(=O)NCC2=CC=C(C=C2)[N+](=O)[O-].[Cl-]</chem>	2,89±0,03	1,02	-	-	-	-
66	 <chem>COc1ccc(cc1)CC2(CCN2)C(=O)N.[Cl-]</chem>	2,29±0,02	0,81	9,68	3,08	-	-
12	<chem>C6H11NHCOR(NO)CH2CH2OH</chem>	1,46±0,02	0,52	2,53	0,81	-	-
14	<chem>HOCH2CH2NHCOR(NO)2(CH2)6</chem>	0,77±0,01	0,27	0,99	0,32	-	-

a) Valori experimentale ale parametrilor fizico-chimici, obtinute in cazul CCNU: log P = 2,83±0,04; k' 600 = 3,14 min⁻¹; T_{0,5} = 92,7 min.



cu numărul grupărilor metilen (fig.10).

- în seria bis-(1-ciclonexil-3-nitrozouree)lor seria b, 5(a-g), diferențele între valorile teoretice și cele experimentale ale log P sînt mult mai mari și nu se poate stabili nici o corelație între valorile experimentale ale acestui parametru și numărul grupărilor metilen (fig.10). Valorile teoretice ale log P au fost calculate pornind de la structura CCNU, conform schemei (fig.11) :



$$(2.83 - 0.39) \times 2 = 4.88 \quad \text{Fig 11}$$

Este interesant de observat că valoarea log P = 2,79 găsită pentru compusul 4e (n=6), care este cel mai activ față de L₁₂₁₀, este foarte apropiată de cea obținută pentru CCNU (log P_{CCNU} = 2,83).

XV.2. Viteza de descompunere (T_{0,5}) determinată în condiții fiziologice, exprimă fracția din substanța inițială care s-a degradat. În anumite limite acest parametru poate fi corelat cu vitezele de formare ale intermediarilor reactivi.

Valorile T_{0,5} obținute pentru noii compusi sintetizați sînt summarize în tabelul 21. Pentru a minimaliza erorile experimentale, aceste valori sînt exprimate în raport cu valoarea T_{0,5} obținută de noi pentru CCNU. Deoarece datele de literatură evidențiază o dependență a valorii T_{0,5} a CCNU atât de valorile pH-ului (în domeniul 7,0-8,0) cît și de tăria ionică și natura mediilor folosite, am considerat necesară determinarea acestui parametru în condițiile noastre de lucru (tabel 22).

- tabel 22 -

Analiza valorilor T_{0,5} pentru cele două serii de N-nitrozouree omoloage seria a, 4(a-g) și seria b, 5(a-g), conduce la următoarele observații /230/ :

- în seria a, 4(a-g), există o dependență aproape liniară a valorilor T_{0,5} de numărul grupărilor metilen, spre deosebire de situa-

Tabel 22

Variația reactivității chimice ($T_{0,5}$) a CCNU
în funcție de pH, tăria ionică și natura mediului
de incubare la 37°

Nr. crt.	Mediu	pH	$T_{0,5}$ (min)	Lit.
1	Tampon Tris	7,2	64	12
2	Tampon fosfat	7,2	208	12
3	Etanol/Tampon fosfat	7,4	53	5
4	Tampon fosfat 10mM+ NaCl 145 mM	7,4	117	105
5	Tampon fosfat	7,4	53	81
6	Tampon fosfat	7,4	48	68
7	Tampon fosfat ($\mu = 0,06$)	7,4	92,7	-

ția existentă în seria b, 5(a-g) (fig.12);

- în ambele serii de compusi, valoarea $T_{0,5}$ maximă se obține pentru derivații cu n=7 (4f și 5f). Deși compusul 4f a prezentat și activitate alchilantă maximă, nu se poate stabili nici o corelație între $T_{0,5}$ și A (fig.12).

- fig.12 -

XV.3. Activitatea alchilantă (A) a derivaților de N-nitrozouree a fost studiată în această lucrare folosind metoda Epstein /231/ (vezi cap.XVIII). Valorile obținute (tabel 21) reprezintă în principiu concentrația de intermediar alchilant pus în libertate de N-NU în condițiile de efectuare ale testului. În general însă, situația reală (in vivo) este mult mai complexă, atât datorită condițiilor diferite în care se produce descompunerea (ser, plasmă, 37°, pH 7,00 etc.), cât și posibilității

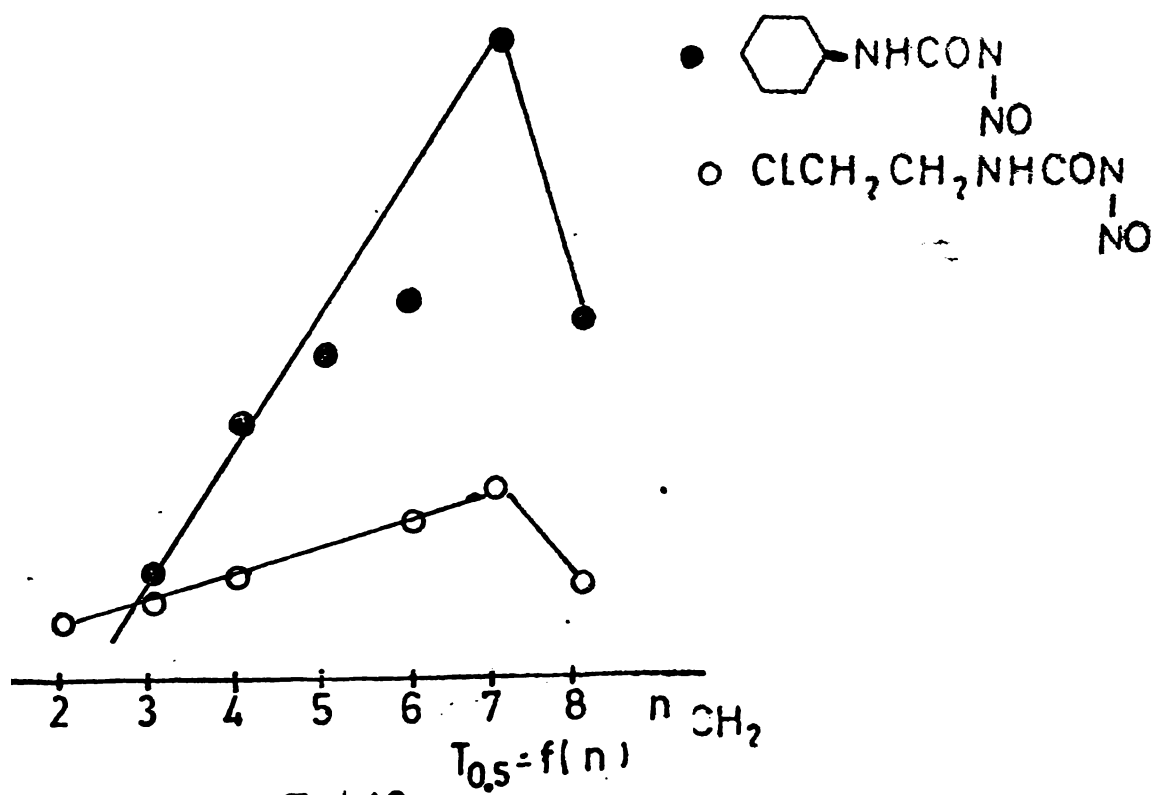


Fig 12

intervenției unor sisteme enzimatică /76/. Din acest motiv, utilitatea valorii absolute a acestui parametru este destul de discutabilă. Totuși, el permite o comparație din acest punct de vedere între diversele N-NU sintetizate (vezi și cap. XVI).

Din analiza datelor obținute privind compuşii 4(a-g) și 5(n-g), (tabel 24), rezultă o capacitate netă de alchilare (per funcție nitrozouree) a derivaților de bis-[1-(2-cloretil)-3-nitrozouree], seria a, 4(a-g), mai mare cu 150-450% decât cea a CCNU. Trebuie menționat însă că numai unui din acești compuşii prezintă activitate față de leucemia L₁₂₁₀, deși ele rămân eficiente la limită față de carcinosarcomul W₂₅₆.

XVI. Proprietățile farmacologice ale noilor derivați de N-nitrozouree.

Proprietățile farmacologice ale noilor substanțe reprezintă parametrii de o deosebită valoare pentru cercetările noastre deoarece, ei permit atât aprecierea cantitativă a rezultatelor obținute cât și stabilirea, prin relații structură - activitate, a unor direcții de investigație în domeniul N-nitrozoureeilor (cap. XVI).

Parametrii utilizați pentru estimarea proprietăților farmacologice ale noilor substanțe au fost:

- toxicitatea acută, exprimată ca doză letală 50% (DL₅₀). Aceasta reprezintă doza la care 50% din animalele tratate mor în răstimp de 14 zile de la administrare (cap. XVIII);
- activitatea antitumorală.
 - a) față de leucemia L₁₂₁₀, exprimată sub forma caracterii timpului de supraviețuire (CTS%). Acesta se calculează conform relației (ec. 14)

$$CTS\% = \left(\frac{T}{C} - 1 \right) 100 \quad (\text{ec. 14})$$

în care: T = timpul de supraviețuire, în zile, al animalelor purtătoare de L₁₂₁₀ și tratate ;

C = timpul de supraviețuire, în zile, al lotului de control purtător de L_{1210} .

b) față de tumora solidă #256, exprimată sub forma inițialii creșterii tumorale (ICT%), care se calculează conform relației (ec.15)

$$ICT\% = \left(1 - \frac{T}{C}\right) 100 \quad (\text{ec.15})$$

unde : T = greutatea, în grame, a tumorilor lotului tratat;

C = greutatea, în grame, a tumorilor lotului martor.

- activitatea mutagenă. Acest parametru ne dă o imagine asupra eventualului risc cancerigen pe care-l prezintă administrarea, la om, a unor astfel de derivați, deoarece se consideră că, în linii mari, activitatea mutagenă a unei substanțe este paralelă cu cea cancerigenă. Valoarea activității mutagene s-a determinat, conform testului Ames, pe bacterii (*Salmonella typhimurum* nis-1 TA 100) și se exprimă sub forma numărului de revertanți produși per nanomol de substanță (cap. XVIII).

În tabelul 23 sînt sumarizate valorile parametrilor biologici ai noilor derivați de N-nitrozouree.

- tabel 23 -

Sistematizarea datelor obținute în legătură cu toxicitatea (DI_{50}), activitatea antitumorală (CTS%, ICT%) și potențialul mutagen în cazul derivaților polimetilenici de bis-nitrozouree (4a-g, 5a-g, 6a, b), ne permite să evidențiem următoarele (tabel 23) :


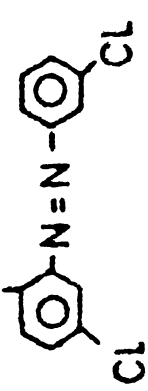
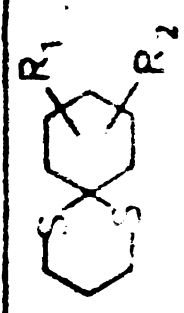
- derivații de 1-(2-cloretil)-3-nitrozouree 4 a-g, prezintă activitate față de leucemia L_{1210} . Este interesant de subliniat că derivatul 4e (n=6) are eficacitate comparabilă cu cea a CCNU, cu atât mai mult cu cît acesta este izomer 3-nitrozo. Este pentru prima dată cînd în această clasă de compuși se evidențiază potențialul antileucemic al izomerilor 3-nitrozo, ceea ce dovedește că cel puțin în cazul anumitor structuri, afirmația din literatură conform căreia acești izomeri nu prezintă interes biologic, nu este valabilă. Izomerii 1-nitrozo, sintetizați de Eisenbrand /47/ sînt și ei activi și puternic mutageni;

Valori experimentale ale parametrilor biologici obținute în cazul unor noi N-nitrozoderivați (a)

Tabela 23

Nr. comp.	Formula	Toxicitate mg/kg	DL ₅₀ mmol/kg	Activitate ICT ₅₀	Activitate antitumorală CTC ₅₀	Activitate mutagenă nr. revertanți/μmol
4a	$C_{12}H_{22}N_2O_4$	409,5	1,28	37	0	0,21
b	$-(CH_2)_3-$	125	0,37	16	16	7,04
c	$-(CH_2)_4-$	1000	2,88	30	0	0,31
d	$-(CH_2)_5-$	500	1,38	-	16	2,08
e	$-(CH_2)_6-$	416,6	1,11	37	63	0,13
f	$-(CH_2)_7-$	800	2,05	-	93	8,08
g	$-(CH_2)_8-$	1300	3,21	-	47	1,28
2a	$C_6H_{11}N_2O_4$	500	1,39	16	0	1,00
b	$-(CH_2)_3-$	750	2,00	0	0	0,09
c	$-(CH_2)_4-$	500	1,29	0	0	0,05
d	$-(CH_2)_5-$	1000	2,49	50	0	0,04
e	$-(CH_2)_6-$	384	0,92	57	0	0,24
f	$-(CH_2)_7-$	660	1,53	-	0	0,18
g	$-(CH_2)_8-$	1000	2,25	-	0	1,10

continue tabel 23

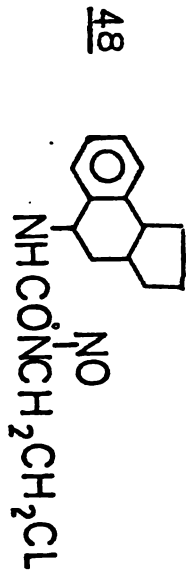
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
6a	$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{NO})\text{CONH} \cdot 2(\text{CH}_2)_7$	69,9	0,16	44	166	-
b	$-(\text{CH}_2)_8-$	93,5	0,21	-	200	-
						
18a	R_1 3-COOCH ₃	34,3	0,12	0	-	-
b	2-COOCH ₃	12,5	0,04	-	0	-
c	2-COOCH ₃	40	0,14	-	0	-
d	R_2 4-CH ₃	346,6	1,06	-	26	-
•		34,0	0,09	0	29	-
						

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
	R ₁		R ₂				
23a	6-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl	H	H				
b	8-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl	H	100	0,30	0	-	-
c	8-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl	6-CH ₃	83	0,24	0	-	-



128

29a	R CH ₃	X H					
b	CH ₂ CH ₂ Cl	H	200	0,68	0	-	-
30	CH ₃	NO	307	1,12	0	0	-
32a	CH ₃	0	197	0,76	21	0	-
b	CH ₂ CH ₂ Cl	0	99	0,32	-	19	-



48	750	2,33	-	-	0,35
66	1500	4,91	-	-	-

continuare tabel 23

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
13	$\begin{array}{c} \text{NO} \\ \\ \text{H} \text{---} \text{NHCONCH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	514	2,40	43	0	2,58
14	$\begin{array}{c} \text{NO} \\ \\ (\text{CH}_2)_6(\text{N CONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2 \end{array}$	302	0,89	33	0	-
12	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \text{---} \text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \\ \\ \text{NO} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_{10} \end{array}$	85	0,36	45	-	-
12	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C} \text{---} \text{OCNCH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \\ \\ \text{NO} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_9 \text{---} \text{H}_3\text{C} \end{array}$	50	0,20	0	19	-

a) Valorile experimentale ale parametrilor biologici, obținute în cazul CCNU.
 DL_{50} mg/kg 75 mmol/kg 0,32; ICT = 46% ; CTS = 113% ; nr.rev./nmol/ 6,42.

- activitate biologică deosebit de interesantă prezintă derivații de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree 6a,b, mai ales 6a (n=8) care a și fost propus pentru testare clinică;

- derivații de 1-ciclohexil-3-nitrozouree, 5a-g, sînt lipsiți de activitate față de leucemia L_{1210} , dar unii prezintă o inhibiție moderată a creșterii carcinosarcomului W_{256} .

Înlocuirea funcțiunii 2-cloretilnitrozouree cu 2-cloretil nitrozouree determină o creștere considerabilă a toxicității și o pierdere parțială a activității biologice (de ex. compusii 72,74).

Așa cum era de așteptat înlocuirea atomului de halogen cu o funcțiune hidroxi (13,14), conduce la compusi lipsiți de activitate față de leucemia L_{1210} , dar surprinzător, activi, la limită, față de carcinosarcomul W_{256} și mutageni.

Toate nitrozoureele testate conform testului Ames s-au dovedit a fi mutagene.

XVII. Relații cantitative structură chimică - activitate biologică determinate pentru o serie de noi N-nitrozouree.

Atît parametri fizico-chimici ($\log P, A, T_{0,5}$) cît și cei farmacologici (DL_{50} , CTS, etc.) obținuți anterior au servit la calculul unor relații cantitative structură-activitate folosind ecuația lui Hansch (ec.16),

$$\log \frac{1}{C} = f(\log P, A, T_{0,5}, \text{ etc.}) \quad (\text{ec.16})$$

în care inversul logaritmului concentrației C ce produce un efect biologic standard poate fi exprimat printr-o funcție lineară sau nelineară în raport cu o serie de parametri fizico-chimici.

În cazul nostru, în locul concentrației C din ec.16, s-au utilizat valorile parametrilor biologici standard determinați anterior (cap.XVI), aceștia fiind în toate cazurile direct proporționali cu C.

Relațiile lineare sau multiliniare s-au calculat folosind un calculator Felix 512.

S-au calculat relații cantitative structură-activitate (CSAR) pentru următoarele trei serii de N-nitrozouree sintetizate în cadrul prezentei lucrări :

- seria a: derivați de polimetilen bis- 1-(2-cloretil)-3-nitrozouree 4(a-g), tabel 24

- tabel 24 -

- seria b: derivați de polimetilen bis-(1-ciclonexil)-3-nitrozouree 5(a-g), tabel 25

- tabel 25 -

- seria c: compuși aparținând seriilor a și b plus compuși 13,14,48,66,72 și 74 (tabel 26)

- tabel 26 -

Ecuatiile liniare și multiliniare astfel obținute au fost sumarizate în tabelele 24-26.

Corelații bune au rezultat în cazul compușilor aparținând seriei a,4a-g. Toxicitatea ($\log 1/DL_{50}$) prezintă o dependență semnificativă de activitatea alchilantă, liposolubilitate și $T_{0,5}$ ($F = 7,158$; varianță explicată 83%, ec.11, tabel 24). Corelarea toxicității numai cu activitatea alchilantă și liposolubilitate poate explica numai 66% din varianță (ec.6, tabel 24). Rezultatele cele mai semnificative, în această serie, sînt cele care se referă la corelarea activității antileucemice cu liposolubilitatea și activitatea alchilantă ($F = 41,43$; varianță explicată 97%, ec.21, tabel 24).

Aceste rezultate concordă cu presupunerea că alchilarea ADN-ului este cauza activității antitumorale a acestor agenți. Totuși, ele trebuie interpretate cu precauție, dat fiind numărul mic de compuși utilizați în dezvoltarea ecuațiilor de regresie.

Corelarea activității antileucemice cu activitatea mutagenă (1)

este slabă. Corelații ne semnificative se obțin și în cazul seriei c (care include toți compușii care au făcut obiectul acestor studii QSAR), ceea ce este explicabil dacă admitem că diversele tipuri de N-nitrozouree sintetizate de noi se descompun, in vitro și în special in vivo, conform unor mecanisme diferite.

Așa cum am arătat (Cap. XII) proiectarea și sinteza acestor noi tipuri de N-nitrozouree a urmărit obținerea unor date suplimentare privitoare la mecanismul lor de acțiune. Dacă schema general admisă de descompunere a nitrozoderivaților de uree (vezi cap. V.2.2. schema 2) este valabilă, atunci produșii primari de descompunere vor fi: $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{NCO}$ și $(\text{CH}_2)_n^{2+}$ pentru compușii 4(a-g); $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NCO}$ și $(\text{CH}_2)_n^{2+}$ pentru compușii 5(a-g); și $\text{ClCH}_2\text{CH}_2^+$ și $(\text{CH}_2)_n(\text{NCO})_2$ în cazul compușilor 6(a,b).

Dacă activitatea antileucemică deosebită a compușilor 6(a,b) este explicabilă prin mecanismul propus de Kohn /90-95/ - ce constă într-o alchilare în două trepte a ADN, cap. VII, schema 4 - activitatea biologică prezentată de compușii 4(a-b), izomeri 3-NC, și mai ales de compusul 4e(n=6), este surprinzătoare și nu concordă cu acest punct de vedere.

Pe de altă parte trebuie ținut cont că deși atât compușii 4(a-g) cât și analogii lor ciclohexilici 5(a-g), conduc la aceleași funcțiuni alchilante, dicarbocationi polimetilenici, activitatea lor antitumorală este net diferită, ceea ce ridică unele semne de întrebare asupra rolului biologic al acestor carbocationi (dacă ei se formează?).

În schimb agenții carbomolanți eliberați de aceste tipuri de N-nitrozouree (4a-g și 5a-g) în cursul descompunerii lor diferite (clor-etilizocianat și respectiv ciclohexil izocianat) și acest fapt ar putea fi coroborat cu proprietățile antileucemice, manifestate exclusiv în seria compușilor 4(a-g). Este deci plauzibil să admitem că în acest caz activitatea biologică se datorește 2-cloretii izocianatului. În această ipoteză, leziunea biochimică letală ar putea fi cauzată de inducerea

unor crosslinking-uri ADN-proteine după următorul mecanism: 2-cloretil izocianatul, care reacționează ușor cu grupările NH_2 , poate carbamoil-grupările NH_2 din histonele celulare H_1 , bogate în lizină, compusul astfel format ar putea apoi, într-o a doua etapă, să alchileze ADN-ul, printr-o reacție SN_2 (de exemplu prin reacția cu o grupare OH din ADN, cum ar fi O^6 -guanină).

Mecanismul propus de noi nu contravine celui expus de Kohn /90-95/. El reprezintă o alternativă valabilă în cazul unor N-nitrozouree capabile să elibereze in vivo, în cursul descompunerii lor 2-cloretil izocianat.

Această ipoteză, ce necesită desigur verificări ulterioare, ar putea constitui o explicație pentru activitatea antileucemică surprinzătoare a unor N-nitrozouree sintetizate de noi (de ex. compuși 4(a-g) care sînt izomeri 3-NO).

De asemenea, nu este imposibil ca 2-cloretil izocianatul (eliberat de derivații de tip 4) să carbamoileze enzimele implicate în mecanismele celulare de reparare (ADN polimeraza I), contribuind astfel la amplificarea efectului antitumoral indus de alchilarea ADN-ului.

În final, trebuie menționat că toți derivații testați conform testului Ames /233,234/, chiar și aceia lipsiți de activitate biologică sau conțin grupări 2-hidroxietil în loc de 2-cloretil, sînt mutageni. Aceste rezultate sugerează că activitatea mutagenă, deși localizată tot la nivelul ADN, este mai nespecifică și ea se datorește eventual, numai unor reacții de monoalchilare la acest nivel.

Aceste fapte lasă să se întrevadă posibilitatea separării efectelor mutagene (cancerigene) de cele antitumorale în această clasă, dîndu-ne speranța posibilității de realizare a unor N-nitrozouree mai active și mai puțin toxice.

Tabel 24

Ecuații QSAR dezvoltate pentru derivații de 1-(2-cloretill)-3-nitrozourae, A(a-g)

No. Parametru biologic	Intercept	A	T _{0,5}	Log P	(Log P) ²	n	r	s	F	Varianță explicată
1	0,17(±0,45)	-0,06(±0,07)				6	0,355	0,36	0,58	0,13
2	0,90(±2,39)		-0,01(±0,02)			6	0,217	0,38	0,20	-0,19
3	0,53(±0,53)			-0,30(±0,23)		6	0,551	0,32	1,74	-0,09
4	-0,59(±2,75)			0,80(±2,67)	-0,25(±0,61)	6	0,584	0,36	0,78	-0,10
5	log 1/LD ₅₀	4,66(±3,05)	-0,67(±0,09)	-0,03(±0,02)		6	0,705	0,32	1,48	0,16
6	1,73(±0,56)	-0,51(±0,16)		-0,12(±0,05)		6	0,891	0,20	5,79	0,66
7	0,49(±1,71)	0,72(±1,61)		-0,28(±0,37)	-0,12(±0,05)	6	0,917	0,22	3,53	0,60
8	-1,09(±3,82)		0,01(±0,03)	0,31(±3,71)	-0,16(±0,82)	6	0,602	0,44	0,38	-0,59
9	3,12(±2,32)	-0,14(±0,06)	-0,01(±0,01)	-0,43(±0,22)		6	0,910	0,23	3,20	0,57
10	-0,68(±2,64)		0,01(±0,02)	0,41(±0,35)		6	0,592	0,36	0,81	-0,09
11	2,41(±1,49)	-0,17(±0,04)	-0,02(±0,01)	0,16(±1,29)	-0,57(±0,28)	6	0,983	0,14	7,15	0,83
12	-3,15(±0,51)	0,34(±0,08)				6	0,901	0,41	17,16	0,76
13	6,98(±4,36)		-0,05(±0,03)			6	0,683	0,69	3,49	0,33
14	1,23(±0,97)			-1,04(±0,41)		6	0,783	0,59	6,35	0,52

continue tabel 24

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
15	$\log \frac{1}{IIS_{opt}}$	0,16(+5,09)			0,01(+4,95)	-0,24(+1,13)	6	0,787	0,67	2,44	0,57
16		-1,18(+4,41)	0,30(+0,12)	-0,01(+0,02)			6	0,907	0,46	6,97	0,70
17		-1,27(+0,49)	0,26(+0,04)		-0,48(+0,14)		6	0,987	0,18	55,79	0,96
18		3,94(+4,70)		-0,02(+0,04)	-0,79(+0,62)		6	0,809	0,64	2,84	0,42
19		-2,07(+1,58)	0,26(+0,05)		0,18(+1,49)	-0,18(+0,34)	6	0,988	0,20	28,45	0,94
20		2,30(+6,53)		-0,03(+0,05)	2,11(+6,35)	-0,64(+1,39)	6	0,829	0,75	1,46	0,22
21		-3,79(+1,54)	0,30(+0,04)	0,02(+0,01)	-1,11(+1,32)	0,08(+0,29)	6	0,997	0,14	41,43	0,97
22		1,11(+0,90)	-0,19(+0,14)				6	0,560	0,72	1,83	0,14
23		-1,73(+5,42)		0,01(+0,03)			6	0,156	0,86	0,10	-0,22
24		-0,58(+1,21)			0,24(+0,60)		6	0,199	0,85	0,16	-0,20
25		-0,26(+7,44)			-0,07(+7,23)	0,07(+1,65)	6	0,200	0,98	0,06	-0,60
26		5,97(+7,46)	-0,29(+0,21)	-0,03(+0,04)			6	0,632	0,78	1,00	0,00
27	$\log M$	1,45(+2,28)	-0,21(+0,19)		-0,11(+0,66)		6	0,565	0,83	0,70	-0,13
28		-0,92(+7,20)		0,03(+0,05)	0,21(+0,95)		6	0,200	0,98	0,06	-0,60
29		1,55(+7,93)	-0,21(+0,23)		-0,21(+7,45)	0,02(+1,71)	6	0,565	1,01	0,31	-0,70
30		-0,58(+10,51)		0,04(+0,07)	-0,38(+10,22)	0,13(+2,25)	6	0,204	1,20	0,03	-1,39
31		5,83(+13,60)	-0,32(+0,37)	-0,05(+0,10)	3,00(+11,71)	-0,65(+2,58)	6	0,666	1,30	0,19	-1,78

Tabel 25

Ecuații QSAR dezvoltate pentru derivații de 1-ciclohexil-3-nitrozourae, 5(a-g)

No.	Parametru biologic	Intercept	A	T _{0,5}	log P	(log P) ²	n	r	s	P	Vastant
32		0,04(±0,49)			-0,09(±0,16)		6	0,251	0,17	0,27	-0,11
33		-0,44(±0,34)	-0,23(±0,15)	0,002(±0,002)			6	0,107	0,15	1,50	0,17
34		-0,02(±0,52)	-0,16(±0,20)		-0,01(±0,20)		6	0,489	0,18	0,47	-0,22
35	log $\frac{1}{ED_{50}}$	-0,77(±4,28)			0,54(±3,31)	-0,12(±0,62)	6	0,272	0,20	0,12	-0,54
36		-0,58(±0,74)	-0,25(±0,21)	0,002(±0,002)	0,05(±0,20)		6	0,716	0,18	0,70	-0,22
37		-0,02(±0,06)	-0,24(±0,29)	0,002(±0,003)	0,01(±0,04)	-0,24(±0,82)	6	0,743	0,24	0,30	-0,12
38		-0,93(±0,66)	0,31(±0,63)				6	0,236	0,66	0,24	-0,18
39		-0,02(±0,01)		0,004(±0,007)			6	0,311	0,64	0,43	-0,12
40		0,35(±0,02)			-0,52(±0,60)		6	0,395	0,62	0,74	-0,05
41		0,01(±0,02)	0,68(±0,67)		-0,82(±0,67)		6	0,608	0,62	0,88	-0,05
42	log M	-0,10(±0,02)	0,21(±0,74)	0,004(±0,008)			6	0,346	0,73	0,20	-0,47
43		0,002(±0,001)			-0,001(±0,09)	0,02(±0,02)	6	0,709	0,55	1,52	0,17
44		0,002(±0,001)	0,50(±0,66)		-0,001(±0,10)	0,02(±0,02)	6	0,784	0,59	1,07	0,04
45		0,002(±0,002)		0,001(±0,01)	-0,001(±0,001)	0,02(±0,02)	6	0,710	0,67	0,68	-0,23
46		0,002(±0,002)	0,54(±0,98)	-0,001(±0,01)	-0,001(±0,001)	0,02(±0,03)	6	0,788	0,83	0,41	-0,89

Tabel 26

Ecuatii QSAR dezvoltate pentru toti derivatii de uree disponibili (seria c)

Nr.	Parametru biologic	Intercept	A	T _{0,5}	log P	(log P) ²	n	r	s	F	Variant explicat
47		-0,07(+0,11)	-0,02(+0,03)				14 ⁽¹⁾	0,207	0,29	0,54	-0,04
48		0,23(+0,26)			-0,15(+0,10)		14	0,385	0,28	2,09	0,07
49		-0,44(+0,24)			0,12(+0,09)		20 ⁽²⁾	0,324	0,35	2,11	0,06
50		0,05(+0,63)			0,05(+0,64)	-0,05(+0,15)	14	0,395	0,28	1,02	0,00
51		0,63(+0,39)			-0,75(+0,29)	0,16(+0,05)	20	0,659	0,29	6,54	0,37
52	log 1/LD ₅₀	0,09(+0,31)	-0,03(+0,03)	-0,001(+0,001)			14	0,265	0,30	0,42	-0,20
53		0,41(+0,29)	-0,03(+0,03)		-0,18(+0,10)		14	0,502	0,27	1,85	0,12
54		0,01(+0,49)	-0,08(+0,03)	-0,003(+0,001)	-0,32(+0,10)		14	0,724	0,22	3,68	0,36
55		-0,15(+0,60)	-0,05(+0,03)		0,51(+0,66)	-0,17(+0,16)	14	0,571	0,27	1,61	0,12
56		0,74(+1,20)		-0,001(+0,002)	-0,41(+0,94)	0,05(+0,21)	14	0,441	0,29	0,80	-0,05
57		0,02(+1,02)	-0,08(+0,03)	-0,003(+0,001)	-0,44(+0,76)	0,03(+0,17)	14	0,725	0,24	2,50	0,32
58		-0,02(+0,58)	0,11(+0,11)				8 ⁽³⁾	0,385	0,88	1,05	0,01
59		-0,02(+0,67)		0,004(+0,003)			8	0,483	0,84	1,82	0,10
60		0,88(+0,55)			-0,95(+0,25)		8	0,810	0,52	14,42	0,66
61		0,37(+0,41)	0,12(+0,04)		-0,95(+0,16)		8	0,946	0,34	21,12	0,85
62	log ILS _{opt}	-0,03(+0,74)	0,21(+0,08)	0,007(+0,003)			8	0,830	0,58	5,52	0,56
63		0,01(+0,01)		-0,002(+0,003)	-0,01(+0,36)		8	0,891	0,55	6,55	0,61
64		-0,19(+0,01)			0,36(+0,01)	-0,34(+0,43)	8	0,860	0,53	7,11	0,64
65		0,01(+0,01)	0,16(+0,05)		-0,02(+0,01)	0,37(+0,37)	8	0,957	0,34	14,51	0,85

continued tabel 26

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
66		-0,44(+0,04)		-0,003(+0,005)	0,57(+0,03)	-0,38(+0,76)	8	0,860,0,60	3,80	0,55	
67		0,57(+0,03)	0,16(+0,06)	0,001(+0,003)	-0,02(+0,02)	0,25(+0,55)	8	0,959 0,38	8,50	0,81	
68		-0,02(+0,10)	-0,01(+0,02)				8 ⁽⁵⁾	0,135 0,19	0,11	-0,15	
69		-0,02(+0,19)		-0,001(+0,001)			8	0,254 0,19	0,41	-0,10	
70		-0,02(+0,17)			0,11(+0,07)		8	0,499 0,17	1,98	0,12	
71		-0,02(+0,16)			0,06(+0,07)		11 ⁽⁶⁾	0,262 0,17	0,66	-0,03	
72		-0,01(+0,31)	-0,02(+0,03)	-0,001(+0,001)			8	0,472 0,19	0,72	-0,09	
73	log $\frac{1}{100-100}$	-0,02(+0,22)	-0,002(+0,02)		0,10(+0,08)		8	0,500 0,18	0,83	-0,05	
74		-0,02(+0,42)			-0,16(+0,45)	0,07(+0,11)	8	0,546 0,18	1,06	0,02	
75		-0,02(+0,42)	0,01(+0,03)		-0,03(+0,43)	0,02(+0,10)	11	0,270 0,18	0,32	-0,15	
76		-0,02(+0,50)	0,01(+0,03)		-0,28(+0,62)	0,10(+0,16)	8	0,504 0,20	0,62	-0,19	
77		-0,01(+0,99)		-0,001(+0,001)	-0,45(+0,74)	0,13(+0,17)	8	0,586 0,19	0,69	-0,15	
78		-0,01(+0,02)	-0,01(+0,06)	-0,001(+0,003)	-0,49(+0,88)	0,13(+0,19)	8	0,591 0,22	0,40	-0,52	
79		0,66(+0,84)			-0,34(+0,32)		17 ⁽⁶⁾	0,262 0,77	1,10	0,01	
80		-0,02(+0,03)			0,02(+0,03)	-0,53(+0,64)	17	0,335 0,78	0,88	-0,15	
81	log π	0,80(+0,80)		-0,006(+0,004)			13	0,382 0,77	1,88	0,07	
82		0,92(+1,14)		-0,006(+0,005)	0,06(+0,40)		13	0,385 0,78	0,87	-0,02	
83		1,02(+1,07)	-0,03(+0,08)	-0,007(+0,005)			13	0,393 0,78	0,72	-0,02	
84		-1,04(+4,24)		-0,005(+0,005)	1,67(+3,61)	-0,36(+0,76)	13	0,412 0,81	0,61	-0,10	
85		0,29(+4,82)	-0,04(+0,11)	-0,006(+0,006)	1,40(+3,86)	-0,33(+0,81)	13	0,431 0,85	0,40	-0,22	

XVIII. PARTEA EXPERIMENTALA

Punctele de topire s-au efectuat la un aparat Franz Kustner-Dresden și sînt necorectate.

Spectrele în infraroșu s-au determinat în pastilă (KBr) sau soluție (CHCl_3 , CCl_4 , C_6H_6) folosind un aparat de tip UR10 (Carl Zeiss, Yena) sau Specord IR 75 (Carl Zeiss, Yena).

Spectrele de rezonanță magnetică nucleară s-au efectuat la un spectrofotometru de tip Varian A-60 EM360L, în CDCl_3 , CCl_4 , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ folosind ca standard intern tetrametil silanul (TMS).

Spectrele de rezonanță electronică de spin s-au efectuat la un spectrometru de tip JEOL (Institutul de fizică atomică București).

Spectrele de masă s-au determinat pe un spectrometru Varian MAT (la Institutul de Fizică, Cluj-Napoca).

Cromatografia în strat subțire, plăci sau folii Merck (silica gel F_{254} , celuloză, oxid de aluminiu). S-au utilizat următoarele sisteme de solvenți: benzen/etanol: cloroform/9:1:1; benzen:etanol/5:1; benzen: metanol; butanol:acid acetic:apă/4:1:1.

Coeficientul de liposolubilitate ($\log P$) s-a determinat spectrofotometric în uv, în sistemul octanol:apă /31/. Valorile teoretice pentru au fost luate din literatură /31,46,108/. Acolo unde a fost posibil, valorile experimentale au fost comparate cu cele teoretice.

Activitatea alchilantă (A) s-a determinat după metoda Epstein modificată /231/, astfel: se incubează la 80° , pentru durate prestabilite (5,10...60 min.), un amestec format din 1 ml soluție metanolică de nitrozouree ($8 \cdot 10^{-3} \text{M}$), 2 ml tampon acetat (pH 6,0) și 1 ml soluție 5% 4-(p-nitrobenzil)-piridină în acetonă. La sfîrșitul perioadei de incubare amestecul se răcește pe baie de gheață și se alcalinizează cu 1,5 ml soluție NaOH 0,1 N. Se obține o soluție de culoare albastră a cărei absorbantă se măsoară la 600 nm. Din panta curbei absorbantă/timp de incubare,

se obțin valorile k'_{600} . Activitatea alchilantă se exprimă atât ca k'_{600} cât și prin raportul acesteia față de valoarea k'_{600} pentru CCNU, determinată în aceleași condiții.

Timpul de înjumătățire ($T_{0,5}$) a fost măsurat folosind variația absorbanței de la 235 nm a soluțiilor de nitrozouree în sistem tampon, incubate la 37° , pentru perioade de timp prestabilite. Soluțiile de nitrozouree se obțin prin dizolvarea compusilor corespunzători în metanol absolut și adăugare de tampon fosfat (pH 7,2: = 0,06) până la obținerea unei concentrații finale de cca 10^{-4} M (nitrozouree).

Toxicitatea (DL_{50} , mmoli/kg corp) a fost determinată pe soareci, conform metodei Cornfield și Mantel /232/.

Activitatea antitumorală s-a apreciat folosind două sisteme tumorale: leucemia L_{1210} și carcinosarcomul W_{256} . Pentru primul sistem tumoral 10^{-6} celule de L_{1210} au fost inoculate intraperitoneal la soareci BDF_1 . Tratamentul a început la 24 ore de la inoculare și a continuat după o schemă zilnică timp de 7-10 zile. Datele au fost exprimate prin creșterea timpului de supraviețuire $CTS\% = \left(\frac{T}{C} - 1 \right) 100$ (T - timpul de supraviețuire la animalele tratate, C - idem la martori). Pentru al doilea sistem tumoral, tratamentul începe la 7 zile de la data transplantării tumorii și constă în inocularea zilnică a unei doze de 0,1-0,2 DL_{50} timp de 14 zile. Rezultatele se apreciază sub forma inhibiției creșterii tumorale-ICT, ce se calculează după formula $ICT\% = \left(1 - \frac{T}{C} \right) 100$.

Activitatea mutagenă a fost estimată folosind testul Ames /233,234/ pe *Salmonella typhimurium* His-1, TA100 și se exprimă prin numărul maxim de revertanți/nmol compus.

În continuare se dau exemple tipice de sinteză pentru compuşii noi sintetizați (nitrosouree și precursori). Prezentarea s-a făcut ținând cont de ordinea în care s-a discutat sinteza acestora (cap.XIII).

XVIII.1. Derivați de 1-(2-cloretil)uree și nitrozouree aromatice

Schema generală de sinteză a acestor compusi a fost descrisă în capitolul XIII.1. Datele analitice sînt prezentate în tabelele 1 și 2, cele spectrale în ir în tabelul 27 iar cele în rnm în tabelul 18. În continuare se dau cîteva exemple tipice de sinteză din care au rezultat compusi nedescrși în literatura de specialitate.

1.1. 1-(2-cloretil)-3-1'-(3'-carboximetil-4'-metil)-fenil-uree, 17a, (metoda A).

La o soluție conținînd 0,012 moli (3,0g) ester metilic al acidului 4-amino-2-metil benzoic, 50 ml benzen și 7 ml DMF, răcită la 0-5°, se adaugă încet cu agitare și răcire 0,012 moli (1,2g) cloretil izocianat. După terminarea adăugării se continuă agitarea timp de 1 oră la 0-5°, 2 ore la 5-10° și 3 ore la temperatura camerei. Amestecul de reacție se concentrează la sec, sub vacuum, iar reziduul obținut se titruează cu eter de petrol, sol. HCl 10%, apă. Precipitatul alb amorf rezultat se separă prin filtrare, se usucă (P₂O₅), cînd se obțin 4 g (η 97%) uree 17a

1.2. 1,3 bis 3-1-(2-cloretil)-ureido-4-metilbenzen, 17i, (metoda B).

La o soluție răcită (0-5°) de 0,07 moli (11,5 g) toliil-2,4-diazocianat în 25 ml benzen anhidrizat, se adaugă încet cu agitare o soluție benzenică, conținînd 0,14 moli (11,13g) 2-cloretilamină. După terminarea adăugării agitarea se continuă 1 oră la 5-0° și 24 ore la temperatura camerei. Precipitatul format se separă prin filtrare, se spală pe pîlnie cu sol.HCl 10%, apă și eter de petrol. Se usucă la vid/P₂O₅ obținîndu-se în final 14,14 g, (η = 62%) uree 17d.

1.3. 1,3 bis 3-1-(2-cloretil)-1-nitrozoureido-4-metilbenzen, 18d (metoda A).

La o soluție preparată din 0,01 moli (3,33 g) uree 17b în 50 ml HCOOH 98-100% rece (0-5°), se adaugă în porțiuni mici și sub agitare (astfel încît temperatura mediului de reacție să nu depășească 0-5°)

0,04 moli (2,76g) NaNO_2 uscat. Se continuă agitarea la aceeași temperatură încă 1 oră. Se adaugă foarte încet 100 ml apă rece ($0-5^\circ$), continuându-se agitarea încă 1 oră la rece. Amestecul de reacție se aduce apoi la temperatura camerei menținându-se sub agitare încă 2 ore în aceste condiții. Precipitatul format în decursul acestor operații se filtrează, se spală bine cu apă și se usucă la vid/ P_2O_5 când rezultă (3,03g, $\eta = 77\%$, 18d).

1.4. 1-(2-cloretil)-3-1'-(3'-carboximetil-4'-metil)-fenil-1-nitrozouree, 18a (metoda B).

La o soluție preparată din 0,02 moli (6,13 g) uree 17a în 50 ml soluție $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}/1:1$ și adusă la $0-5^\circ$, se adaugă încet, cu agitare și răcire 0,04 moli (2,76g) NaNO_2 . După terminarea adăugării, amestecul de reacție se mai agită încă 2 ore la rece, apoi se diluează cu 100 ml apă. Precipitatul format se filtrează, se spală bine cu apă și se usucă la vid/ P_2O_5 . Se obțin 3,61g, $\eta = 50\%$, 18a.

- tabel 27 -

1.5. 1-(2-cloretil)-3-[2-(3,3'-diclor)-azobenzen]-uree, 17e

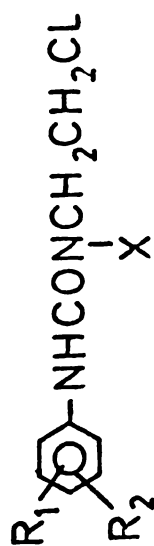
La o soluție preparată din 0,05 moli (13,3g) 1-amino-2-(3,3'-diclor)-azobenzen, se adaugă încet sub agitare, 0,052 moli (5,5g) 2-cloretil izocianat, menținându-se temperatura între $10-15^\circ$. După terminarea adăugării agitarea se continuă încă o oră la temperatura camerei și apoi 2 ore la $70-75^\circ$. Precipitatul format prin răcirea amestecului de reacție se filtrează și se spală pe frită cu eter de petrol. Se recristalizează din benzen. Se obțin 11,65 g ($\eta = 63\%$) uree 17e.

1.6. 1-(2-cloretil)-3-[2-(3,3'-diclor)-azobenzen]-1-nitrozouree, 18e.

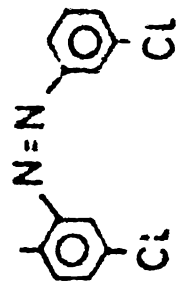
Se dizolvă 0,008 moli (3,4g) uree 17e în 75 ml HCOOH 98-100%. Soluția se răcește (la $0-5^\circ$) și se adaugă în porțiuni 0,028 moli (1,8g) NaNO_2 solid (în circa 1,5 ore), menținându-se mediul de reacție la $0-5^\circ$. După terminarea adăugării se continuă agitarea, la $0-5^\circ$, încă o oră și

Tabel 27

Caracteristici spectrale în ir ale 2-cloretilelor și nitrozurelor aromatice (KBr, cm^{-1})



Nr. comp.	R ₁	R ₂	X	$\nu_{\text{C=O}}$ amida I	ester	δ_{CN} amida II	$\nu_{\text{N-NO}}$	ν_{NH}
17a	3-COOCH ₃	6-CH ₃	H	1643	1720	1578	-	3300, 3320
18a	3-COOCH ₃	6-CH ₃	NO	1735	1715	1580	1500	3400
17b	2-COOCH ₃	6-CH ₃	H	1660	1710	1560	-	3300, 3320
18b	2-COOCH ₃	6-CH ₃	NO	1735	1715	1550	1505	3410
17c	2-COOCH ₃	4-CH ₃	H	1645	1725	1580	-	3320-3340
18c	2-COOCH ₃	4-CH ₃	NO	1738	1725	1580	1505	3410
17d	3-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	4-CH ₃	H	1640	-	1585	-	3300, 3320
18d	3-NHCON(NO)CH ₂ CH ₂ Cl	4-CH ₃	NO	1740	-	1550	1495	3385
17e			H	1630	-	1565	-	3300
18e			NO	1710	-	1560	1505	3410



apoi se diluează amestecul de reacție, încet, cu 50 ml apă rece. Se continuă agitarea încă 1,5 ore. Precipitatul, galben pai, format, se filtrează, se spală cu apă rece (0-5°) și se usucă la vid/P₂O₅. Se obțin 3,11 g (η 85%), nitrozouree 18e.

XVIII.2. Derivați homo și hetero-cicloalifatici de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree.

XVIII.2.1. Analogi de CCNU și MeCCNU substituiți la inelul ciclohexanic.

În cap.XIII.2. se discută schema de sinteză a derivaților aparținând acestei subclase precum și a precursorilor lor, nedescrși în literatura de specialitate. Caracteristicile analitice ale noilor compuși sînt prezentate în tabelele 4,5 și 6, iar cele spectrale în tabelele 28-30 (ir), 17 și 18 (rmn). Se dau mai jos exemple tipice de sinteză privind obținerea acizilor 1,5-ditiaspiro [5,5]-undecan carboxilici, 20(a-c), derivaților 1-(2-cloretil)-3-(1,5-ditiaspiro-[5,5]-8(10)-undecanil)-uree, 22(a-c), a nitrozoureeelor corespunzătoare, 23(a-c) și a 1-(2-cloretil)-3 2(4)-ciclonexan -1-nitrozoureeelor, 25(a-c).

2.1.1. Acidul 1,5-ditiaspiro[5,5]-undecan-6-carboxilic, 20a.

Se agită 1 ora, la temperatura camerei, amestecul conținând : 15 g (0,10 moli) ester etilic al acidului 2-ciclohexanon carboxilic, 19, 320 ml CHCl₃ anhidru și 0,1 moli (10ml) 1,3-propan ditiol. Se răcește apoi amestecul la 0° și se adaugă încet cu agitare și răcire 4ml soluție eterică de trifluorură de bor, după care agitarea se mai continuă încă 1,5 ore la aceeași temperatură. Amestecul de reacție se lasă apoi peste noapte la temperatura camerei. Soluția cloroformică se spală de două ori cu câte 50 ml sol.KOH 7% și de două ori cu câte 50 ml apă, se usucă pe MgSO₄ și solventul se îndepărtează la vid. Rezidiul obținut se distilă fracționat sub vacuum, culegîndu-se fracțiunea pf 175-177°/4-5 mmHg. Rezultă 16,13 g (η 73,5%) ester etilic al acidului 1,5-ditiaspiro [5,5]undecan-6-carboxilic, test negativ la

sol. alcoolică de FeCl_3 , 0,23 moli (60g) din acest ester se refluxează cu 480 g sol. KOH 20%, pînă la dizolvare completă (circa 16 ore). După răcirea amestecului de reacție acesta se diluează cu un volum egal de apă, se spală cu benzen (3x100 ml) și apoi se neutralizează atent (cu răcire exterioară) cu HCl conc. pînă la $\text{pH} = 1$. Acidul liber precipită și se separă prin filtrare. Soluția apoasă saturată cu NaCl sau NH_4Cl și extrasă cu acetat de etil mai furnizează o cantitate suplimentară de acid. Produsul brut se recristalizează din etanol rezultînd finalmente 30,26g ($\eta = 80,4\%$) 20a.

2.1.2. 1-(2-cloretil)-3-(1,5-ditiiaspiro 5,5 -6-undecanil)-uree, 22a.

La o soluție preparată prin agitarea timp de 1 oră la 0° a 0,05 moli (11,6g) 20a, 8,1 ml Et_3N , 140 ml acetonă, se adaugă în circa 20 min. și menținînd temperatura între $0-5^\circ$ o soluție de 0,068 moli (6,6 ml) cloroformiat de etil în 30 ml acetonă. După terminarea adăugării se continuă agitarea la rece încă 1,5 ore. După acest interval se picură atent o soluție 0,084 moli (5,5g) NaN_3 în 20 ml apă și se continuă agitarea la 0° încă 2 ore, după care amestecul de reacție se toarnă peste 700 ml apă și 200 g gheață. Precipitatul de azidă separat se filtrează, se spală cu apă rece, se esorează bine, apoi se dizolvă în 150 ml CHCl_3 , și se usucă (pe MgSO_4) circa 2 ore.

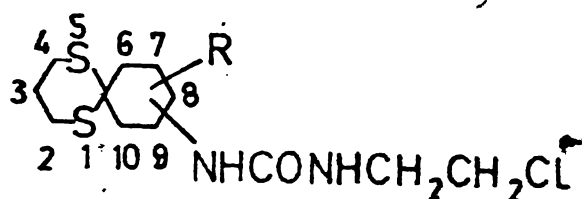
După uscare, soluția se încălzește treptat, urmărindu-se degajarea de N_2 . Cînd aceasta diminuează ca intensitate se aduce la reflux timp de o oră. Sfirșitul reacției se determină spectrofotometric (în ir, prin urmărirea dispariției benzii $\nu_{\text{CON}_3} = 2150 \text{ cm}^{-1}$). Soluția cloroformică de izocianat astfel obținută se concentrează la 1/2 din volum și se adaugă sub agitare și la temperatura camerei peste o soluție conținînd 4,37 g (0,055 moli) 2-cloretil amină în 100 ml CHCl_3 . Sfirșitul reacției se determină spectrofotometric (în ir, prin dispariția vibrației $\nu_{\text{NCO}} = 2250 \text{ cm}^{-1}$), după care soluția cloroformică se spală succesiv cu HCl 0,1 N (250 ml) și apă (250 ml). După uscarea soluției (MgSO_4) solventul se în-

depărtează la vid. Se obține un ulei, care se dizolvă într-o cantitate minimă de cloroform, se cromatografiază pe colcană de Kieselgel, coloana se spală cu CHCl_3 iar apoi cu metanol. Prin concentrarea soluției metanolice se obține produsul dorit, 22a, 5,37g, $\eta = 35\%$.

- tabel 28 -

Tabel 28

Analiza spectrelor ir ale 1-(2-cloretil)-3-(1,5-ditiaspiro 5,5 -undecanil)-uree, CHCl_3 , cm^{-1}



Nr. comp.	R	δ_{CN} amida II	ν_{CO} amida I	ν_{NH}
<u>22a</u> , 1o-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	H	1525	163o	335o, 341o
<u>22b</u> , 8-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	H	153o	166o	336o, 341o
<u>22c</u> , 8-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	1o-CH ₃	153o	163o	335o, 341o

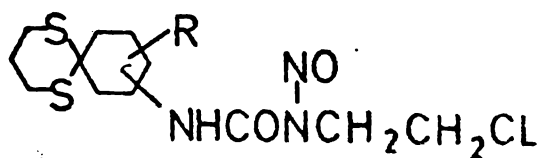
2.1.3. 1-(2-cloretil)-3-(1,5-ditiaspiro [5,5]-8-undecanil)-1-nitrozouree, 23b

La o soluție conținând 0,006 moli (1,80g) uree, 22b, dizolvate în 2o ml acid acetic glacial și răcită la 1o°, se adaugă treptat, cu agitare și răcire (8-1o°C) 0,0185 moli (1,26g) NaNO_2 solid. După terminarea adăugării se continuă agitarea la rece, pentru încă o oră, după care amestecul de reacție se diluează cu 2o ml apă, și se mai agită încă 3o min. Se extrage soluția apoasă cu eter etilic (4x25 ml), extractele eterice se reunesc, se spală cu apă (2x2o ml), se usucă (Na_2SO_4) și solventul se îndepărtează la vid. Uleiul rămas se purifică prin cromatografie pe Kieselgur, folosind drept eluent cloroform. Se obțin 1,78 (79%) 23b.

- tabel 29 -

Tabel 29

Analiza spectrelor ir ale 1-(2-cloretil)-3-(1,5-ditiaspiro[5,5]-undecanil)-1-nitrozoureeilor, CHCl_3 , cm^{-1} .



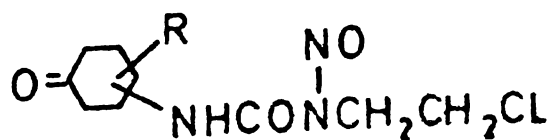
Nr. comp.	R	ν_{NO}	δ_{CN}	ν_{CO}	ν_{NH}
<u>23a</u> , 6-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	H	1490	1510	1710	3380
<u>23b</u> , 8-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	H	1490	1515	1710	3380
<u>23c</u> , 8-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	6-CH ₃	1490	1515	1705	3380

2.1.4. 1-(2-cloretil)-3-(1-ciclohexil-4-onă)-1-nitrozouree, 25b

Se dizolvă 0,003 moli (0,88 g) uree 22b în 10 ml HCOOH 98-100%. Se răcește soluția astfel obținută la 0-5° și se adaugă în porțiuni 0,014 moli (0,99g) NaNO_2 . După terminarea adăugării se continuă agitarea încă 2 ore la 0-5°. Precipitatul format se îndepărtează prin filtrare, filtratul se extrage cu 3x10 ml CHCl_3 . Extracțiile cloroformice reunite se spală cu 2x10 ml H_2O , se usucă (Na_2SO_4) și solventul se evaporă sub vacuum. Uleiul obținut se titruează cu eter de petrol, se obțin 0,5 g (η 70%) 25b. (tabel 30)

Tabel 30

Analiza spectrelor ir ale 1-(2-cloretil)-3-(ciclohexan-2(4)onă)-1-nitrozoureeilor .



Nr. comp.	R	ν_{NO}	δ_{CN}	ν_{CO}	ν_{NH}
<u>25a</u> , 2-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	H	1485	1530	1705	3410
<u>25b</u> , 4-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	H	1490	1530	1710	3400
<u>25c</u> , 4-NHCONHCH ₂ CH ₂ Cl	2-CH ₃	1490	1510	1705	3400

XVIII.2.2. Derivați de 4-(2,2,6,6-tetrametil-piperidil)uree și nitrozouree.

Sinteza și caracterizarea lor analitică este prezentată în cap. III.2.2., tabelele 7-9. Spectrele de R.M.N. ale acestor compuși sînt discutate în cap.XV.2. iar absorbțiile caracteristice în infraroșu sînt prezentate în tabelele 31-33. Au fost de asemenea efectuate și analizate spectrele RES ale nitroxizilor din această clasă (cap.XV.4, tabel 20).

2.2.1. 4-Amino-2,2,6,6-tetrametil-piperidină, 36.

La o suspensie preparată din 0,035 moli (6g) oximă 35 în 100 ml alcool n-propilic și adusă la reflux, se adaugă 0,52 atomi gram (12g) Na, în așa fel încît să se mențină un reflux slab fără încălzire din afară. După terminarea adăugării se continuă refluxul încă circa o oră, pînă ce tot sodiul reacționează complet. Se răcește apoi soluția și se adaugă cu atenție 250 ml eter și 100 ml apă. Se agită amestecul de reacție încă 0,5 ore și apoi se separă stratul eteric, care se spală cu 5x30 ml apă, și se usucă pe Na_2SO_4 . Se concentrează și se distilă amina pînă la 52°/mmHg. Se obțin astfel 3,5 g, $\eta = 64.0\%$ amină 36.

2.2.2. 1-(2-Cloretil)-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-uree,

37b. 0,032 moli (4,9g) amină 36 se dizolvă în 20 ml benzen și 250 ml eter de petrol. Soluția obținută se răcește ($5-10^\circ$) și peste ea se adaugă încet cu agitare și răcire, 0,032 moli (3,37g) 2-cloretil izocianat în 10 ml benzen anhidru. Se continuă agitarea la $5-10^\circ$ încă 0,5 ore și apoi încă 2 ore la temperatura camerei. Precipitatul alb format se separă prin filtrare. Se obțin astfel 7,2g, η 87% uree 37b.

2.2.3. 1-Metil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-uree, 41a.

Se agită 48 ore la temperatura camerei un amestec conținînd : 0,09 moli (2,0g) uree 37a, 0,0006 moli (0,2g) wolfram de sodiu, 0,0006 moli (0,2g) EDTA, 25 ml apă și 3 ml H_2O_2 30%. Soluția roz-portocaliu obținută în final se acidulează (HCl), apoi se concentrează la 1/2 din

volum și se extrage cu eter (4x30ml). Extractele eterice reunite se usucă și se purifică prin decolorare cu cărbune și cromatografiere pe Al_2O_3 neutru folosind drept eluent eterul. Din fracțiunea ce conține produsul dorit se îndepărtează eterul la vid și precipitatul cristalin roșu rezultat se titruează cu eter de petrol. Se obțin 2,5 g, η 70% produs 41a.

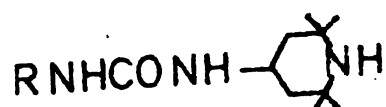
2.2.4. 1-[1,5-ditiaspiro[5,5]-s,s',s',s'-tetroxid-6-undecil]-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil-1-oxi)-uree, 41d.

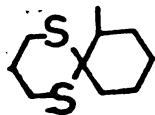
Se agită 48 ore la temperatura camerei un amestec conținând 0,0022 moli (0,8g) uree 37d, 0,0015 moli (0,5g) wolfram de sodiu, 0,0015 moli (0,5g) EDTA, 25 ml alcool etilic, 3ml apă și 3 ml H_2O_2 . După acest interval pH-ul se aduce la 3-4 folosind HCl conc., soluția se filtrează de urmele de precipitat formate iar filtratul se concentrează la sec. Precipitatul obținut se titruează cu eter etilic, cloroform și se filtrează când rezultă 0,25 g ($\eta = 30\%$) uree 41d.

- tabel 31, 32 -

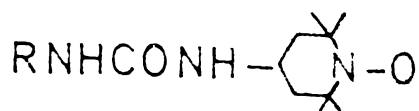
Tabel 31

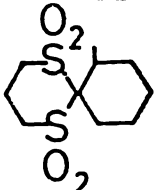
Analiza spectrelor ir ale derivaților 3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)uree, $CHCl_3$, cm^{-1}



Nr. comp.	R	ν_{CO} amidă I	δ_{CN} amidă II	ν_{NH}
<u>37a</u>	CH_3	1620	1530	3300-3400
<u>37b</u>	CH_2CH_2Cl	1620	1530	3300-3400
<u>37c</u>	C_6H_{11}	1660	1530	3390
<u>37d</u>		1630	1520	3390

Analiza spectrelor ir ale derivaților 1-(2,2,6,6-tetracetil-4-piperidinil-1-oxi)-ureelor, metil-4-piperidinil-1-oxi)-ureelor,



Nr. comp.	R	ν_{CO} amida I	δ_{ox} amida II	ν_{NH}
1a	CH ₃	1640	1530	3410
1b	CH ₂ CH ₂ Cl	1650	1520	3410
1c	C ₆ H ₁₁	1630	1520	3430
1d		1650	1540	3400-3450

1) KBr.

2.2.5. 1-Metil-3-(2,2,6,6-tetracetil-4-piperidin-1-oxi)-1-nitrozoureea, 42a.

La o soluție conținând 0,005 moli (1,2g) uree 1a, în 10 ml în 40 ml acid acetic 50% și răcită la 0-5° se adaugă în porții și răcire 0,03 moli (2,1g) NaNO₂ solid. După terminarea reacției continuă agitarea, la 0-5°, încă o oră, apoi se toarnă în 100 ml și se mai agită încă 30 min. Stratul clorofornic se separă și se spală succesiv în apă (2x25 ml), sol. NaHCO₃ 10% (2x25 ml), apă și soluție usucă (Na₂SO₄), se decolorează cu cărbune și se distilază. Se obține un ulei care la titrurare cu eter la 20°C are un rezultat următor: rezultând 1,2g (η = 89%) nitrozouree 42a.

2.2.6. 1-(2-Cloretil)-3-(2,2,6,6-tetracetil-4-piperidin-1-oxi)-1-nitrozoureea, 38b.

Se dizolvă 0,009 moli (2,35g) uree 1a în 10 ml acid acetic și după răcirea soluției la 0-5°, se adaugă în porții și răcire

cire, 0,02 moli (1,33g) NaNO_2 . După această operație agitarea se continuă la rece încă o oră, se adaugă 30 ml eter etilic și după 10 min. se lasă să se separe straturile. Stratul apos se concentrează la sec sub vacuum (astfel încât temperatura băii să nu depășească 45°) iar precipitatul rezultat se extrage cu cloroform, soluția cloroformică se concentrează, operația se mai repetă de încă două ori. În final precipitatul se dizolvă în MeOH și se agită 2 ore, la rece, cu schimbători de ioni (Amberlite IR 45). Schimbătorii de ioni se îndepărtează prin filtrare iar soluția după purificare cu cărbune, se concentrează sub vacuum. Se obține astfel 1g ($\eta = 75\%$) precipitat galben pai de 38b.

2.2.7. 1-Metil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidil-1-nitrozo)-1-nitrozouree, 40a.

La 0,016 moli (3,45 g) uree 37a dizolvate în 50 ml CH_3COOH 50% și răciți la $0-5^\circ$ se adaugă treptat, cu agitare și menținând răcirea, 0,16 moli (11g) NaNO_2 . După terminarea adăugării agitarea se continuă ($0-5^\circ$) încă o oră și apoi se extrage soluția cu 4x50 ml eter etilic. Extractele eterice reunite se spală succesiv cu apă, sol. NaHCO_3 10% apă ($0-5^\circ$), se usucă (Na_2SO_4), se purifică prin tratare cu Florisil și se concentrează sub vacuum. Uleiul rezultat se dizolvă în 20 ml MeOH și se precipită prin turnare peste 250 ml apă. Se obțin în final 2,5g ($\eta = 56\%$) precipitat galben pai de compus 40a.

- tabel 33 -

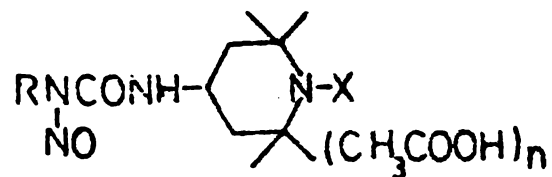
XVIII.2.3. Derivați de 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree policiclice.

2.3.1. 1-(2-Cloretil)-3-[8-(5',6'-benzo)-hexahidroindanil]uree, 47.

La o soluție conținând 0,007 moli (1,4g) amină 46, 1 ml Et_3N și 30 ml CHCl_3 , răcită la 15° se adaugă încet, sub agitare 0,007 moli (0,8g) 2-cloretil izocianat. După terminarea adăugării agitarea se continuă încă 5 ore la temperatura camerei. Apoi amestecul de reacție se spală succesiv cu 2x15 ml H_2O , 15ml HCl 1%, 15 ml H_2O . Stratul organic, uscat (Na_2SO_4) și concentrat la 1/2 din volum se adaugă cu agitare la 100 ml eter de

Tabel 33

Analiza spectrelor ir ale derivaților de 3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-nitrozouree, cm^{-1} , CHCl_3



Nr. comp.	R	X	n	$\nu_{\text{N-NO}}$	$\delta_{\text{C-N}}$	$\nu_{\text{C=O}}$	ν_{NH}
<u>29a</u>	CH_3	H	2	1490	1530	1710	3380
<u>29b</u>	ClCH_2CH_2	H	1	1495	1520	1710	3400
<u>30</u>	CH_3	NO	0	1520	1550	1680	3390
<u>32a</u>	CH_3	O	0	1480	1530	1710	3390
<u>32b</u>	ClCH_2CH_2	O	0	1490	1530	1705	3450

petrol ($30-60^\circ$), când ureea 47 precipită. Se obțin 1,1g (η , 60%) produs 47, pt 142° desc. ($\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{OCl}$ calc.% : C = 65,64; H = 7,17; N = 9,57 ; Cl = 12,13; găsit %: C = 65,54%; H = 7,08; N = 9,49; Cl = 12,53).

2.3.2. 1-(2-Cloretil)-3-[3-(5',6'-benzo)-hexanidroindanil]-1-nitrozouree, 48.

0,003 moli (1,0g) uree 47 se dizolvă într-un amestec format din 5 ml HCl 36% și 5 ml HCOOH 98-100% și răcit la $0-5^\circ$. Se adaugă apoi încet cu agitare și răcire ($0-5^\circ$), 0,036 moli (2,5g) NaNO_2 , după care agitarea se continuă încă 1 oră ($0-5^\circ$). Se diluează amestecul lent cu 20 ml H_2O ($0-5^\circ$) și după încă 0,5 ore de agitare, precipitatul format se filtrează, se spală cu apă rece și se usucă la vid/ P_2O_5 . Se obțin 1,01g (η 92%) 48, pt 116-118 ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{Cl}$; calc.% : C = 59,72; H = 6,22; N = 13,06; Cl = 11,04; găsit %: C = 60,00; H = 6,69; N = 13,30; Cl = 11,51).

XVIII.3. Derivați alifatici de bis [1-(2-cloretil)-1(3)-nitrozouree]
și bis [1-ciclohexil-3-nitrozouree].

Problemele ridicate de sinteza și structura nitrozoderivaților de acest tip precum și a precursorilor lor sînt discutate în cap.XIII.3. Atribuirile structurale s-au făcut pe baza analizelor elementare tabel 11 (55a-g și 56a-g), 12 (4a-g și 5a-g), 13 (6a,b), spectrelor ir (cap.XIV.1, tabel 34-37), rnm (cap.XIV.2. tabel 18-19) și spectrelor de masă (cap.XIV.3). Se dau în continuare exemple tipice de sinteză pentru compuşii noi prezentați precum și sinteze particulare, pentru compuşii neincluși în tabele. Prezentarea exemplilor se face în ordinea în care au fost discutați compuşii în cap.XIII.3.

XVIII.3.1. Derivați alifatici de bis 1-(2-cloretil) sau ciclohexil -3-uree și 3-nitrozouree.

3.1.1. 1,4-Tetrametilbis [1-(2-cloretil)-uree], 52d.

La o soluție conținând 10,9 moli (2g) clorură acidă 52d în 40 ml benzen anhidru, se adaugă treptat 68,6 mmoli (4,45g) NaN_3 activată. Amestecul se refluxează pînă cînd degajarea de N_2 încetează (sfîrșitul reacției se determină spectrofotometric în ir prin dispariția absorbțiilor caracteristice clorurii acide și azidei de la 1805 și respectiv 2140 cm^{-1}). Soluția de izocianat astfel obținut se folosește ca stare fără izolarea acestuia.

Se dizolvă 33,6 mmoli (3,9g) 2-cloretil amină clorhidrat în 10 ml apă rece, se aduce la pH 7,5-8 cu o soluție NaOH 50%, se agită 10 min. și se extrage cu benzen (3x20 ml). Extractele benzenice reunite și uscate (Na_2SO_4) la care se adaugă 5,8 ml Et_3N se răcesc (0-5°) și se amestecă cu soluția de izocianat preparată anterior. Amestecul de reacție se agită 0,5 ore la rece și apoi 7 ore la temperatura camerei. Derivatul de uree format precipită și se colectează prin filtrare. Se spală apoi cu eter de petrol, apă, sol.HCl 10% apă și eter de petrol. După uscare (vid/ P_2O_5) se obțin 5,2g (98%) 52d.

3.1.2. 1,4-Tetrametilenbis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree], 4 d.

Se dizolvă 0,013 moli (2,46g) uree 55d în 50 ml HCOOH 98-100%, rece (0-5°) și la soluția astfel obținută se adaugă în porțiuni, cu agitare și răcire, 0,13 moli (8,97g) NaNO₂. După încă o oră de reacție soluția se diluează foarte încet amestecându-se cu 120 ml apă (0-5°), când nitrozoureea 4d precipită. Se continuă agitarea încă 0,5 ore pentru perfectarea reacției, precipitatul se filtrează și se spală cu apă rece. Se usucă la vid/P₂O₅. Se obțin 3,0g (95%) produs brut. În vederea purificării sale izomerice acesta se dizolvă în 50 ml HCOOH 98-100%, se agită 2 ore la 0-5° și se precipită cu 120 ml apă rece. După 0,5 ore se filtrează și se spală bine cu apă (0-5°). Precipitatul uscat constă din 2,3 g η 75%, produs 4d.

3.1.3. 1,2-Etilen bis [1-(2-cloretil)-uree], 55a.

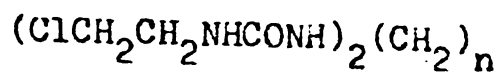
61 mmoli (6,33g) 2-Cloretil izocianat se adaugă în picături și sub agitare la o soluție conținând 30 mmoli (1,8g) 1,2-etilen diamină, 30 mmoli (4,35 ml) Et₃N în 10 ml eter etilic anhidru, răcită (0-5°). Amestecul se lasă să ajungă treptat la temperatura camerei și după 7 ore se colectează prin filtrare solidul alb format. Acesta se spală cu apă și eter de petrol și se usucă (P₂O₅) când se obțin 5,2g, η 62%, uree 55a.

3.1.4. 1,7-Heptametilen bis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree], 4f.

La o soluție conținând 1,55 mmoli (0,538g) uree 55f în 5 ml HCl conc., răcită la 0-5°, se adaugă încet, cu agitare și răcire 6,08 moli (0,42g) NaNO₂. După terminarea adăugării reacția se continuă încă o oră, după care nitrozoureea formată se precipită cu 10 ml apă rece. Purificarea precipitatului separat prin filtrare se face prin reprecipitare din HCOOH 98-100% (vezi 3.1.2.). Se obțin astfel 0,52g, η 84,4% precipitat galben 4f.

Tabel 34

Caracteristici spectrale în ir ale derivaților alifatici
de bis[1-(2-cloretil)-uree], KBr, cm^{-1}



Nr. comp.	n	ν_{CO} amida I	δ_{CN} amida II	ν_{NH}
<u>55a</u>	2	1630	1595	3340
<u>55b</u>	3	1640	1600	3350
<u>55c</u>	4	1640	1600	3325, 3345
<u>55d</u>	5	1635	1595	3330, 3355
<u>55e</u>	6	1635	1595	3325, 3335
<u>55f</u>	7	1640	1600	3320, 3350
<u>55g</u>	8	1640	1595	3325, 3350

Tabel 35

Caracteristici spectrale în ir ale derivaților alifatici
de bis[1-(2-cloretil)-3-nitrozouree], KBr, cm^{-1}



Nr. comp.	n	ν_{CO} amida I	δ_{CN} amida II	ν_{NNO}
<u>4a</u>	2	1715	1550	1505
		1735 ⁽¹⁾	1550 ⁽¹⁾	1500 ⁽¹⁾
<u>4b</u>	3	1710	1540	1485
<u>4c</u>	4	1715	1535	1450
		1725 ⁽¹⁾	1530 ⁽¹⁾	1490 ⁽¹⁾
<u>4d</u>	5	1730	1538	1495
		1730 ⁽¹⁾	1535 ⁽¹⁾	1498 ⁽¹⁾

continuare tabel 35

1.	2.	3.	4.	5.
<u>4e</u>	6	1710 1730 ⁽¹⁾	1590 1535 ⁽¹⁾	1490 1495 ⁽¹⁾
<u>4f</u>	7	1720 1730 ⁽¹⁾	1550 1540 ⁽¹⁾	1495 1500 ⁽¹⁾
<u>4g</u>	8	1730	1550	1500

1) CHCl_3

3.1.5. 1,4-Tetrametilen bis (1-ciclohexil-3-uree), 56d.

La o soluție preparată din 40 mmoli (4g) ciclohexil amină 41 mmoli (5,8ml) Et_3N și 30 ml benzen, se adaugă cu agitare și răcire ($0-5^\circ$) o soluție benzenică conținând ~ 40-45 mmoli 1,4-n-butan-diizocianat (preparat conform 55d). După agitare 0,5 ore la $0-5^\circ$ și 7 ore la temperatura camerei, precipitatul format se izolează prin filtrare, se spală cu eter de petrol sol.HCl 10%, eter de petrol și apoi se usucă (vid/ P_2O_5). Se obțin astfel 6g $\eta = 87\%$ 56d.

3.1.6. 1,6-Hexametilen bis (1-ciclohexil-3-nitrozouree), 5e.

32,5 mmoli (2,24g) NaNO_2 uscat se adaugă în porțiuni mici, cu agitare, la o soluție răcită la $0-5^\circ$ conținând 2,75 mmoli (1g) uree 56e în 10 ml HCOOH 98-100%. În continuare amestecul de reacție se agită o oră la $0-5^\circ$, după care se diluează lent cu 30 ml apă rece când nitrozoureea precipită și agitarea se continuă încă 0,5 ore pentru perfecționarea reacției. Solidul format se filtrează, se spală cu apă și se usucă (exicator/ P_2O_5). Produsul brut astfel obținut și uscat se purifică prin reprecipitare din 20ml HCOOH 98-100% cu 20ml apă (vezi 3.1.2.). Se obțin în final 0,9g $\eta = 76\%$ nitrozouree 5e.

3.1.7. 1,7-Heptametilen bis (1-ciclohexil-3-nitrozouree), 5f.

1,35 mmoli (0,5 g) uree 56f se dizolvă la temperatura camerei în 5ml HCl conc. și 5 ml HCOOH 98-100%. La soluția obținută și răcită

la 0-5° se adaugă treptat 7,24 mmoli (0,5 g) NaNO_2 , după care amestecul se mai agită o oră la această temperatură și se diluează cu 25 ml apă. Uleiul format se extrage cu CHCl_3 (2x10ml). Extractele cloroformice reunite se spală cu apă (3x15ml), se usucă (Na_2SO_4) și se concentrează sub vacuum când se obține un ulei care prin ședere la vid cristalizează (24-30 ore). Produsul brut astfel obținut se purifică prin reprecipitare din 10 ml HCOOH 98-100% cu 10 ml apă (conform 3.12). Uleiul rezultat cristalizează în timp. Se titruează cu eter de petrol, se obțin în final 0,5 g $\eta = 86,7\%$, 5f.

- tabel 36,37 -

XVIII.3.2. Derivați alifatici mono și bis[1-(2-cloretil)-1-nitrozouree]

3.2.1. 2-Cloretil-carbamoil azida, 68.

La o soluție 5% HN_3 în CHCl_3 (circa 1 mol) se adaugă 25 ml DMSO și apoi 0,08 moli (8,7g) 2-cloretil izocianat, astfel încât temperatura amestecului să se mențină în limitele 45-55°. După terminarea adăugării agitarea se continuă încă o oră la aceeași temperatură (sfârșitul reacției se determină spectrofotometric în ir prin urmărirea dispariției benzii de izocianat $\nu_{\text{NCO}} = 2270 \text{ cm}^{-1}$). Soluția rezultată se concentrează sub vacuum la 1/3 din volum, se toarnă peste 50 ml apă și se extrage cu încă 2x20 ml C_6H_6 . Stratul organic și extractele benzenice reunite se usucă (Na_2SO_4), se toarnă peste 300 ml eter de petrol și se lasă peste noapte la frigider. Se filtrează precipitatul rezultat când se obțin 6 g, η 50%, 68.

3.2.2. 1,7-Heptameten bis[1-(2-cloretil)-1-nitrozouree], 69.

Prepararea 2-cloretil-N-nitrozocarbamoil azide, 61. Se răcește la 0° un amestec format din 5 g acetat de sodiu (proaspăt topit), 0,5 g P_2O_5 , 15 ml anhidridă acetică și 35 ml acid acetic. La acesta se adaugă 0,025 moli (3,71 g) 2-cloretil carbamoil azidă (preparată conf. 3.2.1.)

Tabel 36

Caracteristici spectrale în ir ale derivaților alifatici de bis (1-ciclonexil-uree), KBr, cm^{-1}



Nr. comp.	n	ν CO amidă I	δ CN amidă II	ν NH
<u>56a</u>	2	1640	1595	3325, 3345
<u>56b</u>	3	1630	1578	3350, 3370
<u>56c</u>	4	1630	1585	3320, 3350
<u>56d</u>	5	1625	1575	3320, 3350
<u>56e</u>	6	1635	1580	3325, 3360
<u>56f</u>	7	1640	1580	3320, 3350
<u>56g</u>	8	1635	1575	3325, 3350

Tabel 37

Caracteristici spectrale în ir ale derivaților alifatici de bis(1-ciclohexil-3-nitrozouree), KBr, cm^{-1}



Nr. comp.	n	ν CO amidă I	δ CN amidă II	ν NNO
<u>5a</u>	2	1715	1540	1495
<u>5b</u>	3	1715	1545	1498
<u>5c</u>	4	1710 1730 ⁽¹⁾ 1765 ⁽²⁾	1545 1535 ⁽¹⁾ 1525 ⁽²⁾	1490 1490 ⁽¹⁾ 1490 ⁽²⁾
<u>5d</u>	5	1710 1730 ⁽²⁾	1538 1525 ⁽²⁾	1488 1490 ⁽²⁾
<u>5e</u>	6	1714 1725 ⁽¹⁾	1540 1530 ⁽¹⁾	1495 1485 ⁽¹⁾
<u>5f</u>	7	1715 1730 ⁽¹⁾	1535 1540 ⁽¹⁾	1490 1490 ⁽¹⁾
<u>5g</u>	8	1715 1725 ⁽¹⁾	1535 1540 ⁽¹⁾	1485 1490 ⁽¹⁾

1) CHCl_3 2) CCl_4

și apoi încet menținând temperatura la 0° 15 ml NOCl (soluție 15% în anhidridă acetică). După terminarea adăugării se continuă agitarea circa o oră la aceeași temperatură (sfârșitul reacției se apreciază spectrofotometric prin dispariția benzii de azidă de la $\nu_{\text{CN}_3} = 2110 \text{ cm}^{-1}$ în ir, prin dispariția ν_{NH} sau rnm, prin apariția tripletului caracteristic grupării Cl(CH₂)₂N(NO)). Amestecul de reacție se diluează cu 120 ml apă (0-5°) și se extrage cu 3x25 ml CCl₄. Extractele organice reunite se spală cu 2x15 ml apă, 2x15 ml sol. Na₂CO₃, se agită o oră cu 50 ml apă și 5 g schimbători de ioni. Se filtrează schimbătorul iar stratul organic se usucă pe MgSO₄, utilizându-se ca atare.

Prepararea 1,7-heptameten-bis 1-(2-cloretil)-1-nitrozouree, 6a.

La soluția cloroformică de 2-cloretil nitrozocarbanoil azidă preparată anterior, se adaugă cu agitare și răcire (0-5°) o soluție conținând 0,01 moli (1,3g) 1,7-heptan diamină 54a în 50 ml HMTP. După terminarea adăugării, se continuă agitarea încă 2 ore, îndepărtând răcirea. Amestecul de reacție se filtrează iar filtratul se spală succesiv cu 3x35 ml apă, 3x25 ml sol. HCl 10%, 2x35 ml apă, se usucă (MgSO₄) și se concentrează sub vacuum. Rezultă un ulei care la titrurare cu eter de petrol se solidifică. Se purifică prin cromatografiere pe coloana de Fluorisil folosind ca eluent C₆H₆. Se obțin 2,58 g ($\eta = 60\%$) 6a.

3.2.3. 1-(2-Cloretil)-3-(2',3'-dimetroxifenil)-uree, 65.

La o soluție conținând 0,012 moli (2,0g) amină 64, 3 ml Et₃N și 20 ml benzen anhidrizat, se adaugă sub agitare și menținând temperatura între 15-20°, 0,012 moli (11,28g) 2-cloretil izocianat. După terminarea adăugării, amestecul de reacție se lasă sub agitare, la temperatura camerei, peste noapte. Se evaporă apoi solventul sub vid, iar reziduiul rămas se titruează cu apă acidulată (HCl), și se extrage cu benzen (2x20 ml). Extractele benzenice se usucă (Na₂SO₄) și se toarnă, cu agitare, peste 200 ml eter de petrol. Precipitatul format se separă prin filtrare, când se obțin 1,81 g ($\eta 55,52\%$) uree 65, pt 118 (C₁₂H₁₇N₂O₃Cl).

calc.% : C = 52,84; H = 6,24; N = 10,28; Cl = 13,03; găsit % : C = 53,54; H = 7,01; N = 10,18; Cl = 12,79; $\nu_{C=O}$ 1630, CHCl_3).

3.2.4.1-(2-Cloretil)-3-(2',3'-dimetoxifenil)-1-nitrozouree, 66.

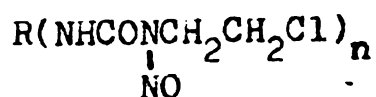
La 0,007 moli (1,81 g) uree 65, dizolvate în 17 ml HCOOH 98-100% rece (0-5°) se adaugă în porțiuni, cu agitare și răcire 0,014 moli (1,00g) NaNO_2 . După o oră de la terminarea adăugării amestecul de reacție, menținut la 0-5°, se diluează încet cu 50 ml H_2O rece. Se formează un ulei care se extrage cu eter etilic (3x30 ml). Extractele eterice se spală cu apă (3x20 ml), se usucă (Na_2SO_4) și se evaporă la vid. Rezultă un ulei, galben pai, care se reprecipită din 15 ml HCOOH 98-100% (conf.3.1.2.). Se obțin astfel 1,9 g (η 95%) 66, solid galben pai, pt 36-38° ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4\text{Cl}$; calc.% : C = 47,76; H = 5,31; N = 13,93; Cl = 11,77; găsit % : C = 48,20; H = 5,65; N = 14,00; Cl = 12,14; $\nu_{C=O}$ = 1710 cm^{-1} , CHCl_3 ; δ (ppm) : $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{NO})$ 3,50, 2H; $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{NO})$ 3,42, 2H, J = 6,00 Hz).

- tabel 38 -

Tabel 38

Caracteristici spectrale în ir ale unor derivați de

1-(2-cloretil)-1-nitrozouree



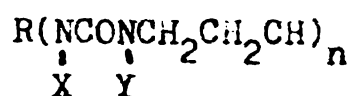
Nr. comp.	R	n	ν_{CO}	δ_{CN}	ν_{NNO}	solv.
<u>48</u>		1	1712	1510	1495	KBr
<u>66</u>		1	1720	1580	1485	CHCl_3
<u>6a</u>	$(\text{CH}_2)_7$	2	1720	1530	1490	CHCl_3
<u>6b</u>	$(\text{CH}_2)_8$	2	1720	1520	1490	CHCl_3

XVIII.4. Derivați de 1-(2-hidroxietyl)-1(3)-nitrozouree.

Sinteza compuşilor a fost descrisă în cap.XIII.4. Atribuirile structurale s-au făcut pe baza analizelor elementare (tabel 14,15), spectrelor ir (cap.XIV.1, tabel 39), spectrelor RMN (cap.XIV.2.) și spectrelor de masă (cap.XIV.3).

Tabel 39

Caracteristici spectrale în ir ale 2-hidroxietyl ureelor și nitrozoureeilor



Nr. comp.	R	X	Y	n	ν_{CO}	δ_{CN}	ν_{NNO}	Solv.
<u>65</u>	C ₆ H ₁₁	H	H	1	1610	1580	-	KBr
<u>13</u>	C ₆ H ₁₁	H	NO	1	1705	1545	1495	CHCl ₃
<u>64</u>	(CH ₂) ₆	H	H	2	1625	1590	-	KBr
<u>14</u>	(CH ₂) ₆	NO	H	2	1710	1520	1485	CHCl ₃

Se dau următoarele exemple de sinteză :

4.1. 1,6-Hexametilen bis-[1-(2-hidroxietyl)-uree] . 64 (n=6)

La o soluție conținând 0,2 moli (12,2g) monoetanol amină în 100 ml eter de petrol se adaugă treptat, cu agitare, menținându-se temperatura în limitele 10-15°, 0,1 moli (20,0 g) 1,6-hexametilen diizocianat, 53d. După terminarea adăugării se mai agită o oră la temperatura camerei. Precipitatul format se separă prin filtrare. Se obține astfel 30,55 g $\eta = 95\%$ 64.

4.2. 1,6-Hexametilen bis-[1-(2-hidroxietyl)-3-nitrozouree],

14e (n=6).

0,01 moli (2,9 g) uree 64 se dizolvă în 20 ml HCl conc.. la 6-8°. Soluția obținută se diluează cu 30 ml apă și apoi se adaugă treptat sub

agitare și răcire 0,043 moli (2,97 g) NaNO_2 . Se continuă agitarea, la rece, încă o oră, după care se diluează cu 60 ml apă. Se obține un precipitat cleios galben care se separă și după uscare, se dizolvă în 35 ml MeOH și se încălzește 0,5 ore la 40-50°. Produsul obținut prin îndepărtare la vid, a metanolului, se purifică prin reprecipitare din 40 ml HCOOH 98-100% cu 45 ml apă (vezi XIII.4.). Se obțin în final 2,78 g 14e (n=6).

XVIII.5. N-(2-cloretil)uretani și nitrozouretani

Sinteza a fost discutată anterior (cap.XIII.5). Se dau în continuare exemple de obținere a uretanilor prin ambele metode expuse în schema 6 precum și în ceea ce privește nitrozarea acestora. Analizele elementare (tabel 16), spectrele ir (tabel 41) și cele de masă confirmă structura propusă.

- tabel 40 -

5.1. N-(2-cloretil)-O-ciclohexil-uretan, 76.

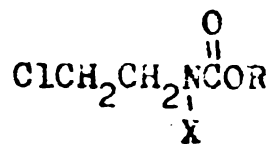
Se adaugă încet, cu agitare, 0,2 moli (20,2 g) Et_3N la o soluție conținând 0,1 moli (16,25 g) ciclohexil cloroformiat și 0,1 moli (11,6 g) 2-cloretil amină clorhidrat în 100 ml benzen. Se agită amestecul timp de 24 ore la temperatura camerei. După acest răstimp soluția se filtrează de eventualele impurități și filtratul se spală succesiv cu 2x35 ml apă, 2x35 ml HCl 10%, 3x35 ml apă, se usucă (Na_2SO_4) iar apoi solventul se îndepărtează la vid. Rezultă un ulei care cristalizează în timp. Se obțin 20,18 g ($\eta = 99,2\%$), 76.

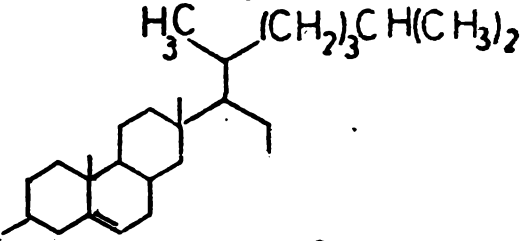
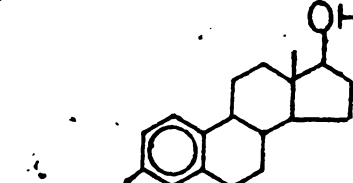
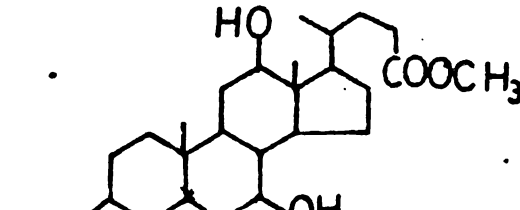
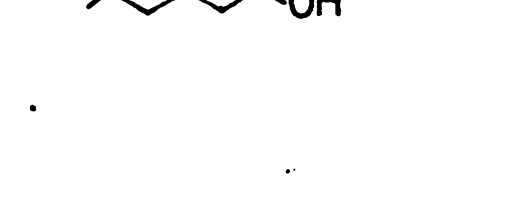
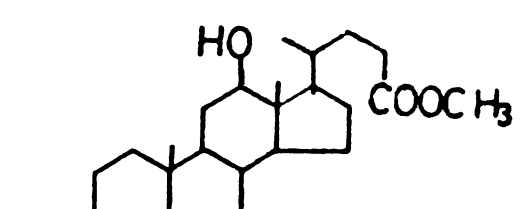
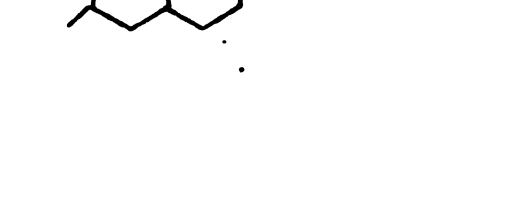
5.2. N-(2-cloretil)-N-nitrozo-O-ciclohexil-uretan, 77.

0,034 moli (6,98 g) uretan 76 se dizolvă în 50 ml HCOOH 98-100% rece (0-5°) și la soluția obținută se adaugă în porțiuni 0,102 moli (7,04 g) NaNO_2 având grijă ca temperatura să se mențină între 0-5°. După terminarea adăugării se continuă agitarea încă 1 oră, apoi amestecul de reacție se diluează cu 70 ml apă iar uleiul format se extrage cu 3x45 ml benzen. Extractele benzenice reunite se spală cu 3x25 ml apă,

Tabel 40

Caracteristici spectrale în ir ale 2-cloretil uretanilor
și nitrozouretanilor



Nr. comp.	R	X	ν_{CO}	ν_{NNO}	Solv.
<u>76</u>	C_6H_{11}	H	1710	-	C_6H_6
<u>77</u>	C_6H_{11}	NO	1720	1495	C_6H_6
<u>78</u>	4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_{10}$	H	1710	-	C_6H_6
<u>79</u>	4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_{10}$	NO	1730	-	C_6H_6
<u>80</u>		H	1680	-	KBr
<u>81</u>		H	1690	-	KBr
<u>82</u>		H	1690-1715	-	KBr
<u>83</u>		NO	1725	1505	CHCl_3
<u>84</u>		H	1680-1710	-	KBr
<u>85</u>		NO	1720, 1710	1505	C_6H_6

se usucă (Na_2SO_4) și apoi solventul se îndepărtează la vid. Se obține un ulei care se purifică prin cromatografiere pe Kieselgur, eluent benzen. Prin concentrarea soluțiilor benzenice se obține un ulei galben-pai, 4,97g ($\eta = 62,3\%$) de 77.

5.3. 3-N-(2-cloretil)-carbamoil estradiol, 81.

Se agită 5 zile la temperatura camerei un amestec format din 1,84 mmoli (0,50g) estradiol, 1,84 mmoli (0,19 g) 2-cloretil izocianat și 1,84 mmoli (0,18 g) Et_3N în 10 ml dioxan anhidru. După acest interval amestecul se toarnă peste 100 ml eter de petrol, iar precipitatul cleios format se separă prin decantarea supernatantului. Prin titrurarea succesivă a acestui clei cu apă, HCl 10% apă și eter de petrol se obține finalmente un solid ce se purifică prin dizolvarea în 15 ml EtOH și adăugarea lentă a unei soluții HCl 1% (75 ml). După uscarea precipitatul se recristalizează din benzen : eter de petrol/1:7. Se obțin 0,1 g ($\eta = 14,00\%$), 81.

5.4. 3 - N-(2-cloretil)-carbamoil -metil colat, 82.

Se adaugă în picături 5 ml Et_3N la un amestec de 0,01 moli (4,86g) colat de metil, 0,02 moli (2,32 g), 2-cloretil amină HCl în 50 ml benzen anhidru, se lasă cu agitare 48 ore. Filtrare. Soluția se spală cu 3x15 ml apă, 3x15 ml HCl 10% și 3x15 ml apă, se usucă, se concentrează la 1/3 din volum și se precipită prin turnare peste 250 ml eter de petrol. Recristalizare din benzen: eter de petrol/1:7. Se obțin 3 g ($\eta = 60,20\%$), 82.

5.5. 3 - N-(2-cloretil)-nitrozo-carbamoil -metil colat, 83.

Se dizolvă 0,001 moli (0,53 g) uretan 77 în 10 ml HCOOH 98-100%, rece. Se adaugă treptat cu agitare și răcire ($0-5^\circ$) 0,02 moli (1,38 g) NaNO_2 , se continuă agitarea încă o oră și se precipită cu 20 ml apă. Precipitatul după filtrare, spălare cu apă și uscare, se dizolvă în 10 ml MeOH și soluția se aduce la $45-50^\circ$ timp de 30 min. Se îndepărtează solventul la vid și solidul rămas se recristalizează din benzen: eter de petrol/

1:7. Se obțin 0,3 g ($\eta = 53,60\%$), 33.

XVIII.6. Procedeu de obținere a 2-cloretil izocianatului.

6.1. N-(2-hidroxietyl)-uretan(87) .

Se refluxează timp de 12 ore un amestec de 1 mol (61 g) monoetanol amină și 1,1 moli (129,8 g) dietil carbonat și apoi acesta este supus distilării sub vacuum. Se colectează fracția cu pf 169-172°/12 mmHg și se redistilă. Se obțin 130 g 87 (η 98%, pf 177-180°/12 mmHg).

6.2. 2-Cloretil izocianat (8)

La o soluție de 0,39 moli (50 g) clorură acidă a acidului 3-cloropropionic (84) în 50 ml tetralină se adaugă încet cu agitare și încălzire ușoară (30-40°) și intermitentă, 0,78 moli (50 g) NaN₃ activată /217/. După terminarea adăugării se încălzește lent la 80-85° și se menține această temperatură până când degajarea de azot încetează (sfârșitul reacției se determină spectrofotometric în ir prin dispariția absorbțiilor caracteristice clorurii acide și azidei de la 1800 și respectiv 2150 cm⁻¹). Se distilă izocianatul 28-30/10 mmHg, se obțin 32g, η 77% (pf lit.41/12 mmHg /135/).

XVIII.7. Procedeu tehnologic de preparare a 1-(2-cloretil)-3-ciclonexil-1-nitrozoureei.

7.1. 1-(2-Cloretil)-3-ciclonexil-ureea (86).

Se agită o oră, la temperatura camerei un amestec de 3 moli (348g) 2-cloretil amină HCl, 258 ml Et₃N în 1000 ml benzen anhidru. Se răcește la 0-5° și se adaugă 2 moli (250 ml) ciclohexil izocianat în trei porțiuni a câte 100 ml, 100 ml și respectiv 50 ml, astfel: adăugarea izocianatului se face în așa fel încât temperatura mediului să nu depășească 10°, se lasă amestecul să ajungă lent la temperatura camerei și cu agitare peste noapte. Se verifică spectrofotometric dacă a reacționat tot izocianatul și numai apoi se adaugă porțiunea următoare. Precipitatul se filtrează și se spală cu 4x250 ml apă, 4x250 ml HCl 10%, 4x250 ml apă. Se usucă la vid/P₂O₅. Se obțin 408 g (η 100%).

C O N C L U Z I I

Cercetările efectuate în cadrul lucrării de doctorat au urmărit:

- sinteza și studiul unor noi derivați de 2-cloretii nitrozo-uree, potențial antileucemici ;
- determinarea unor corelații calitative și cantitative structură chimică-activitate biologică în această clasă de compuși, în vederea obținerii unor informații suplimentare privind condițiile structurale necesare unei activități biologice optime;
- aplicarea experienței câștigate în acest domeniu prin asimilarea și introducerea în rețeaua medicală a unor citostatice din această clasă, de mare utilitate clinică (CCNU și MeCCNU).

Rezultatele experimentale prezentate și interpretarea lor permit conturarea următoarelor concluzii generale :

1. În dezvoltarea temei am încercat o abordare rațională a domeniului N-NU, atât pe baza unor considerente teoretice cât și prin corelații cantitative (QSAR), care să ne conducă la confirmarea, infirmarea sau evidențierea unor noi condiții structurale necesare unei activități antileucemice superioare.

În acest scop proiectarea de noi compuși în această clasă a urmărit :

- grefarea grupării 2-cloretii nitrozouree pe structuri chimice cu proprietăți certe de transportor pentru alte funcțiuni citotoxice (ca de ex. acidul 2-amino-4-metil-benzoic), sau pe structuri cu proprietăți farmacologice cunoscute, în vederea găsitii unor noi capi de serie exploatabili;
- verificarea diferenței de activitate biologică între izomerii 1-(2-cloretii)-1-nitrozo (1-NO) și 1-(2-cloretii)-3-nitrozouree (3-NO) în cazul unor serii omologe de bis nitrozouree alifatică și cicloalifatică;

- obținerea unor compusi capabili de activare metabolică ;
- modificări ale structurii 2-cloretil-nitrozouree prin sinteza unor analogi 2-hidroxietyl-nitrozouree sau 2-cloretil-nitrozouretani;
- obținerea unor noi N-nitrozouree marcate (cu markeri de spin) în vederea studierii comportării lor în vitro sau in vivo (res).

S-a acordat o atenție deosebită cercetărilor privind esențierea în țară a unor citostatice cu valoare clinică din această clasă și anume CCNU (Nipalkin) și MeCCNU.

2. S-au sintetizat 83 compusi nedescrși în literatura de specialitate aparținând următoarele clase :

- derivați aromatici de 2-cloretiluree și nitrozouree (10 compusi);
- derivați homo și heteroalifatici de 2-cloretiluree și nitrozouree: a) analogi de CCNU și MeCCNU (12 compusi, dintre care 3 sînt scizi 1,5-ditiiaspiro 5,5 -undecanil carboxilici); b) derivați 4-(2,2,6,6-tetrametilpiperidinil)uree și nitrozouree (13 compusi); c) derivați policiclici de 2-cloretiluree și nitrozouree (2 compusi);
- derivați polimetilenici bis [-(2-cloretiluree și 1(3)-nitrozouree] și bis [1-ciclohexil-uree și 3-nitrozouree] (32 compusi);
- derivați de 1-(2-hidroxietyl)-uree și 1(3)-nitrozouree (4 compusi);
- N-(2-cloretil)-uretani și nitrozouretani (10 compusi).

3. În vederea obținerii derivaților de N-nitrozouree cu structurile menționate anterior, s-au utilizat următoarele cîi de sinteză, selecționate atît pe baza unui studiu atent al literaturii aferente cît și în urma cercetărilor preliminare întreprinse în vederea evoluției lor:

- derivații de uree s-au obținut prin cuplarea izocianatilor cu aminele, în cadrul unor scheme care sîi ne permită, pe cît posibil, utilizarea unor intermediari comuni și obținerea unor serii de derivați omologi;
- nitrozoderivații de uree s-au obținut fie prin nitrozarea

directă a ureelor precursoare, în mediu acid cu azotit de sodiu, cât și direct din amine prin cuplare cu 2-cloretii-nitrozocarbamoil azide, un reactiv recent descris în literatură ce permite obținerea neechivocă a izomerilor 1-NO.

Dintre contribuțiile originale mai importante privind și sinteza derivaților de uree și nitrozouree (menționați la pct.2) subliniem :

a)- elaborarea unui proces tehnologic de preparare a GONU (Ni-palkin), aplicat în stația pilot a Institutului Oncologic București, și care a constituit obiectul brevetului Rom.54127/1977.

b)- îmbunătățirea procedurii de obținere a 2-cloretii nitrozocarbamoil azidei ;

c)- contribuții la studiul nitrozării unor derivați de uree greu solubili sau instabili în condițiile clasice de nitrozare;

d)- contribuții la îmbunătățirea sintezei 4-amino-2,2,6,6-tetrametil piperidinei;

e)- obținerea unor derivați de nitrozouree cu markeri de spin prin nitrozarea directă a nitroxilureelor corespunzătoare;

f)- realizarea simultană a deprotejării grupării cetonice și nitrozării funcțiunii ureidice în cazul 1,5-ditiaspiro-derivaților ;

g)- o nouă cale de sinteză a 2-cloretii izocianatului.

În afara acestor contribuții originale în lucrare sînt incluse și alte aspecte ce vizează îmbunătățirea unor procedee de sinteză, avînd ca efect direct creșterea randamentului, scăderea timpului de reacție, utilizarea unor reactanți mai accesibili, etc.

4. Noii compuși obținuți au fost caracterizați folosind rezultatele analizei elementare de C, H, N, Cl, S, spectrele în ir, raman, spectre de masă, temperatura de topire; toate determinările fiind efectuate pe produși cromatografic puri.

5. Pe baza analizei spectrelor ir, înregistrate pentru toți compușii sintetizați, se evidențiază deplasarea, la nitrozare, a benzii amidă I ($\nu_{C=O}$ uree 1610-1650 cm^{-1} , $\nu_{C=O}$ nitrozouree 1705-1730 cm^{-1}). Această deplasare, cunoscută din literatură, a fost utilizată de noi în aprecierea cantitativă a randamentelor nitrozării.

De asemenea, spectrele ir s-au utilizat la monitorizarea reacțiilor de sinteză a derivaților de uree, a izocianatilor, etc.

6. Spectrele rnm au fost utilizate în vederea atribuirilor structurale privind natura și puritatea izomerică a nitrozoderivaților de uree, obținuți prin nitrozare random. În ceea ce privește deplasările chimice ale protonilor aparținând celor două grupări metilenice ale funcțiunii $N(NO)CH_2CH_2Cl$ datele de literatură sînt contradictorii. S-au adus dovezi experimentale în vederea atribuirii tripletului situat la cîmpuri mai joase ($\delta = 4,05-4,27$ ppm) protonilor adiacenți grupării $N(NO)$. Una dintre ele constă în posibilitatea localizării neechivoce a grupării metilenice adiacente OH (în prezența și absența D_2O) în 1-(2-hidroxi-etil)-1-nitroso-3-ciclohexiluree ($\delta = 3,60$ ppm) sintetizată de noi.

Folosind spectroscopia rnm se pot face distincții clare între izomerii 1-NO și 3-NO, în majoritatea compusilor sintetizați de noi. În cazul derivaților de 4-(2,2,6,6-tetrametilpiperidinil)-uree apar posibilități suplimentare de nitrozare care complică atribuirea benzilor în rnm. Totuși, pe baza datelor obținute, lucrînd pe serii de compuși omologi, s-a făcut o tentativă în acest sens, care a dus la rezultate coerente.

7. Spectrele de masă s-au efectuat pentru unii dintre compușii studiați, în vederea aducerii unor argumente suplimentare privind atribuirile structurale făcute.

8. Analiza spectrelor res a derivaților de uree și nitrozouree nitroxidici, evidențiază o slabă dependență a parametrilor res de natura funcțiunii uree sau nitrozouree ceea ce îi recomandă ca markeri de spin.

9. In vederea calculării unor relații cantitative structură-proprietăți fizico-chimice - activitate biologică s-au determinat, pentru majoritatea nitrozoderivaților sintetizați: a) parametri fizico-chimici; lipofilicitatea ($\log P$), viteza de alchilare (A) și timpul de înjumătățire ($T_{0,5}$) în condiții fiziologice (pH 7,4, 37°); b) parametri biologici: toxicitatea acută (DL_{50}) și activitatea antitumorală pe două tipuri de tumori.

10. Investigarea parametrilor fizico-chimici evidențiază în seria polimetilen bis 1-(2-cloretil)-3-nitrozoureele o dependență aproape liniară a acestora de numărul grupărilor metilen din moleculă, fără a se putea stabili însă corelații cantitative între ei.

11. Determinările farmacologice privind toxicitatea acută (DL_{50}) și activitatea anticancerasă (pe carcinosarcomul W₂₅₆ și leucemia L₁₂₁₀) efectuate pentru majoritatea compuşilor sintetizați au semnalat proprietățile surprinzătoare ale compusului 1,7-heptametilen bis-1-(2-cloretil)-3-nitrozouree. Este pentru prima dată când în această clasă de compuși se evidențiază activitatea antileucemică a izomerilor 3-NO, ceea ce dovedește că, cel puțin în cazul anumitor structuri, afirmația din literatură, conform căreia acești izomeri nu prezintă interes biologic, nu este valabilă.

Dintre compușii sintetizați au prezentat activitate biologică interesantă, fiind propuși pentru testare clinică: 1,7-heptametilen bis [1-(2-cloretil)-1-nitrozouree] și 1,8-octametilen bis [1-(2-cloretil)-1-nitrozouree].

12. Parametrii fizico-chimici au fost corelați cu cei biologici utilizând relații de tip Hansch. În acest scop s-a folosit analiza de regresie multiliniară efectuată cu ajutorul unui calculator Felix 012. Din relațiile obținute corelații bune au rezultat în seria polimetilen bis 1-(2-cloretil)-3-nitrozoureele, cele mai semnificative fiind cele care se referă la corelarea activității antileucemice cu liposolubili-

tatea și activitatea alchilantă.

13. Analizând datele obținute anterior și în special rezultatele corelațiilor cantitative structură chimică - activitate biologică (QSAR), este plauzibil de admis că în cazul 1-(2-cloretil)-3-nitrozoureeilor, activitatea biologică se datorește, cel puțin parțial, 2-cloretil izocianatului, produs in vivo consecutiv descompunerii acestor compuși. Activitatea biologică a compușilor 3-NO s-ar putea explica prin inducerea formării unor legături încrucișate (crosslinking-uri) între ADN și proteine, după un mecanism în două trepte: a) carbamoiarea grupărilor NH_2 din histonele celulare H_1 (bogate în lizină) de către 2-cloretil izocianat cu formarea unor derivați de 2-cloretiluree ai unor aminoacizi; b) achilarea de către aceștia a ADN-ului (de ex. printr-o reacție cu o grupare OH, cum ar fi O^6 - din guanină). De asemenea se sugerează posibilitatea ca 2-cloretil izocianatul să carbamoiizeze enzimele implicate în mecanismele de reparare (ADN-polimerază I) contribuind astfel la amplificarea efectului antitumoral indus de alchilarea ADN-ului.

14. Toți compușii, care au fost testați conform testului de mutagenезă Ames (pe bacterii *S. thymurium* his^{-1} , TA98 și TA100) chiar și cei lipsiți de activitate biologică, sînt mutageni, ceea ce sugerează că activitatea mutagenă, deși localizată tot la nivelul ADN, este mai nespecifică.

Anexa I

Listă abrevieri

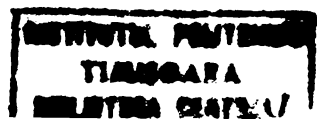
Simbol	Denumire
N-NU	N-nitrozouree
BCNU	1,3-bis-[1-(2-cloretil -1-nitrozouree)]
CCNU	1-(2-cloretil)-3-ciclohexil-1-nitrozouree
MeCCNU	1-(2-cloretil)-3-(4-metil-ciclohexil)-1-nitrozouree
Streptozotocina	2-(3-metil-3-nitrozouree)-2-deoxi-D-gluco-piranoză
Clorozotocina	2-[3-(2-cloretil)-3-nitrozouree]-2-deoxi-D-glucopiranoză
MNU	1-metil-1-nitrozouree
RFCNU	1-(2-cloretil)-3-[1'-(5'-p-nitrobenzoil-2',3'-izopropiliden)- α , β -D-ribofuranozil]-1-nitrozouree
PCNU	1-(2-cloretil)-3-(2,6-dioxo-3-piperidil)-1-nitrozouree
ACNU	1-(4-amino-2-metil-5-pirimidinil)-metil-3-(2-cloretil)-3-nitrozouree
HOOC-CCNU	1-(2-cloretil)-3-(4-carboxiciclohexil)-1-nitrozouree
BFNU	1,3-bis-[1-(2-fluoretil -1-nitrozouree)]
FCNU	1-(2-fluoretil)-3-ciclonexil-1-nitrozouree
FMNU	1-metil-3-(2-fluoretil)-1-nitrozouree
GANU	1-(2-cloretil)-3-(β -D-glucopiranozil)-1-nitrozouree
i.c.	intracerebral
i.p.	intraperitoneal
DL _{50%}	doză letală 50%

DL _{10%}	doză letală 10% (la o singură administrare i.p.)
ED99	doza unică care omorâ 99% din celulele leucemice implantate i.p.
ED50	doza unică la care se obțin supraviețuiri de 50% la șoarecii cu 10 ⁵ celule leucemice implantate i.p.
CTS%	creșterea timpului de supraviețuire
ICT%	inhibiția creșterii tumorale
QSAR	relații cantitative structură-activitate (quantitativ structure-activity relationships)
poli U	acid poliuridilic
poli A	acid poliadenilic
poli G	acid poliguanilic
poli C	acid policitidilic
NBP	4-nitrobenzil piridină
EDTA	acid etilendiaminotetraacetic

Anexa II

Lista compusilor noi sintetizati

Nr. crt.	Denumire	Nr. compus
A. <u>Derivati de 1-(2-cloretil)-uree si nitrozouree aromatice</u>		
1.	1-(2-cloretil)-3-[1'-(3'-carboximetil-4'-metil)-fenil] uree	17a
2.	1-(2-cloretil)-3-[1'-(2'-carboximetil-6'-metil)-fenil] uree	17b
3.	1-(2-cloretil)-3-[1'-(2'-carboximetil-4'-metil)-fenil] uree	17c
4.	1,3-bis-{3-[1-(2-cloretil)]-ureido}-4-metil-benzen	17d
5.	1-(2-cloretil)-3-2-(3,3'-diclor)-azobenzen-uree	17e
6.	1-(2-cloretil)-3-[1'-(3'-carboximetil-4'-metil)-fenil]-1-nitrozouree	18a
7.	1-(2-cloretil)-3-[1'-(2'-carboximetil-6'-metil)-fenil]-1-nitrozouree	18b
8.	1-(2-cloretil)-3-[1'-(2'-carboximetil-4'-metil)-fenil]-1-nitrozouree	18c
9.	1,3-bis-{3-[1-(2-cloretil)]-1-nitrozouree}-4-metil-benzen	18d
10.	1-(2-cloretil)-3-[2-(3,3'-diclor)-azobenzen]-1-nitrozouree	18e
B. <u>Derivati homo si heteroalifatici de 1-(2-cloretil)-uree si nitrozouree.</u>		
a) <u>Analogi de CCNU si MeCCNU</u>		
11.	Acid 1,5-ditiaspiro[5,5]undecan-6-carboxilic	20a
12.	Acid 1,5-ditiaspiro[5,5]undecan-8-carboxilic	20b
13.	Acid 1,5-ditiaspiro[5,5]undecan-6-metil-8-carboxilic	20c
14.	1-(2-cloretil)-3-[1,5-ditiaspiro[5,5]-6-undecanil]-uree	22a



15.	1-(2-cloretil)-3-[1,5-ditiapiro [5,5]-8-undecanil]-uree	22b
16.	1-(2-cloretil)-3-[1,5-ditiapiro [5,5]-6-metil-3-undecanil]-uree	22c
17.	1-(2-cloretil)-3-[1,5-ditiapiro [5,5]-6-undecanil]-1-nitrozouree	23a
18.	1-(2-cloretil)-3-[1,5-ditiapiro [5,5]-8-undecanil]-1-nitrozouree	23b
19.	1-(2-cloretil)-3-[1,5-ditiapiro [5,5]-6-metil-8-undecanil]-1-nitrozouree	23c
20.	1-(2-cloretil)-3-(1-ciclohexil-2-ona)-1-nitrozouree	25a
21.	1-(2-cloretil)-3-(1-ciclohexil-4-onă)-1-nitrozouree	25b
22.	1-(2-cloretil)-3-[1-(3-metil)-ciclohexil-4-onă]-1-nitrozouree	25c

b) Derivați de 4-(2,2,6,6-tetrametil-piperidinil)-uree și nitrozouree

23.	1-metil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-uree	37a
24.	1-(2-cloretil)-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-uree	37b
25.	1-ciclohexil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-uree	37c
26.	1-(1,5-ditiapiro[5,5]-6-undecanil)-3-(2,2,6,6-tetrametil-piperidinil)-uree	37d
27.	1-metil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-1-nitrozouree	38a
28.	1-(2-cloretil)-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-1-nitrozouree	38b
29.	1-(metil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil-1-nitrozol)-1-nitrozouree	40
30.	1-metil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidin-1-oxi)-uree	41a
31.	1-(2-cloretil)-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidin-1-oxi)-uree	41b
32.	1-ciclohexil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidin-1-oxi)-uree	41c

33.	1- [1,5-ditiaspiro [5,5] -s,s,s',s'-tetroxid-6-undecil] - 3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidin-1-oxi)-uree	41d
34.	1-metil-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidin-1-oxi)-1- nitrozouree	32a
35.	1-(2-cloretil)-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidin-1-oxi) -1-nitrozouree	32b

c) Derivați de 2-cloretil uree și nitrozouree policiclice

36.	1-(2-cloretil)-3- [8-(5',6'-benzo)-hexahidroindanil]-uree	47
37.	1-(2-cloretil)-3- [8-(5',6'-benzo)-hexahidroindanil]-1- nitrozouree	48

C. Derivați alifatici de bis 1-(2-cloretil)-uree și 1(3)-
nitrozouree și bis(1-ciclohexil-uree și 3-nitrozouree)

a) Derivați alifatici de bis 1-(2-cloretil) sau ciclohexil
uree și 3-nitrozouree

38.	1,2-etilen bis [1-(2-cloretil)-uree]	55a
39.	1,3-trimetilen bis [1-(2-cloretil)-uree]	55b
40.	1,4-tetrametilen bis [1-(2-cloretil)-uree]	55c
41.	1,5-pentametilen bis [1-(2-cloretil)-uree]	55d
42.	1,6-hexametilen bis [1-(2-cloretil)-uree]	55e
43.	1,7-heptametilen bis [1-(2-cloretil)-uree]	55f
44.	1,8-octametilen bis [1-(2-cloretil)-uree]	55g
45.	1,2-etilen bis(1-ciclohexil-uree)	56a
46.	1,3-trimetilen bis(1-ciclohexil-uree)	56b
47.	1,4-tetrametilen bis(1-ciclohexil-uree)	56c
48.	1,5-pentametilen bis(1-ciclohexil-uree)	56d
49.	1,6-hexametilen bis(1-ciclohexil-uree)	56e
50.	1,7-heptametilen bis(1-ciclohexil-uree)	56f
51.	1,8-octametilen bis (1-ciclohexil-uree)	56g
52.	1,2-etilen bis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree]	4a

53.	1,3-trimetilen bis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree]	4b
54.	1,4-tetrametilen bis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree]	4c
55.	1,5-pentametilen bis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree]	4d
56.	1,6-hexametilen bis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree]	4e
57.	1,7-heptametilen bis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree]	4f
58.	1,8-octametilen bis [1-(2-cloretil)-3-nitrozouree]	4g
59.	1,2-etilen bis(1-ciclohexil-3-nitrozouree)	5a
60.	1,3-trimetilen bis(1-ciclohexil-3-nitrozouree)	5b
61.	1,4-tetrametilen bis(1-ciclohexil-3-nitrozouree)	5c
62.	1,5-pentametilen bis(1-ciclohexil-3-nitrozouree)	5d
63.	1,6-hexametilen bis(1-ciclohexil-3-nitrozouree)	5e
64.	1,7-heptametilen bis(1-ciclohexil-3-nitrozouree)	6f
65.	1,8-octametilen bis(1-ciclohexil-3-nitrozouree)	6g

b) Derivați alifatici de mono și bis 1-(2-cloretil)-uree și 1-nitrozouree

66.	1,7-heptametilen bis [1-(2-cloretil)-1-nitrozouree]	6a
67.	1,8-octametilen bis [1-(2-cloretil)-1-nitrozouree]	6b
68.	1-(2-cloretil)-3-(2',3'-dimetoxifenil)-uree	65
69.	1-(2-cloretil)-3-(2',3'-dimetoxifenil)-1-nitrozouree	66

D. Derivați de 1-(2-hidroxietil)-uree și 1(3)-nitrozouree

70.	1-(2-hidroxietil)-3-ciclohexil-uree	65
71.	1,6-hexametilen bis [1-(2-hidroxietil)-uree]	64
72.	1-(2-hidroxietil)-3-ciclohexil-1-nitrozouree	13
73.	1,6-hexametilen bis [1-(2-hidroxietil)-1-nitrozouree]	14

E. N-(2-cloretil)-uretani și nitrozouretani

74.	N-(2-cloretil)-carbamoiil ciclohexan	76
-----	--------------------------------------	----

75.	N-(2-cloretil)-N-nitrozo-carbamoil ciclonexan	77
76.	N-(2-cloretil)-carbamoil-(4-metil)-ciclonexan	78
77.	N-(2-cloretil)-N-nitrozo-carbamoil-(4-metil)-ciclohexan	79
78.	3- N-(2-cloretil)-carbamoil -colesterol	80
79.	3- N-(2-cloretil)-carbamoil -estradiol	81
80.	3 - N-(2-cloretil)-carbamoil -metilcolat	82
81.	3 - N-(2-cloretil)-N-nitrozo-carbamoil -metilcolat	83
82.	3 - N-(2-cloretil)-carbamoil -metildeoxicolat	84
83.	3 - N-(2-cloretil)-N-nitrozo-carbamoil -metildeoxicolat	85

BIBLIOGRAFIE

- 1/ Methods in Cancer Research, Academic Press, 1979.
- 2/ C.G.Zubrod, Cancer Res. 38, 4377 (1978).
- 3/ J.A.Montgomery, T.P.Johnston și Y.F.Shealy, Burger's Medicinal Chemistry, 595 (1979).
- 4/ G.P.Wheeler și S.Chumley, J.Med.Chem. 10, 259 (1967).
- 5/ G.P.Wheeler, B.J.Bowdon și J.A.Grimsley, Cancer Res. 34, 194 (1974).
- 6/ G.P.Wheeler și B.J.Bowdon, Cancer Res. 25, 177c (1965).
- 7/ G.Gale, Biochem.Pharmacol. 14, 1207 (1965).
- 8/ R.F.Pittilo, A.Y.Narkates și J.Burns, Cancer Res. 24, 1222 (1964).
- 9/ D.P.Groth, J.H.D'Angelo, R.W.Vogler, E.S.Mirgioli și B.Netz, Cancer Res. 31, 332 (1971).
- 10/ S.Green, Cancer Res. 26, 2481 (1966).
- 11/ G.P.Wheeler și B.J.Bowdon, Cancer Res. 28, 52 (1968).
- 12/ J.A.Montgomery, R.James, G.S.McCaleb și T.P.Johnston, J.Med.Chem. 10, 668 (1967).
- 13/ S.K.Carter și J.W.Newman, Cancer Chemother.Rept. part 3, 115 (1969).
- 14/ S.C.Barranco și R.M.Humphrey, Cancer Res. 31, 191 (1971).
- 15/ R.A.Tobey și H.A.Crissman, Cancer Res. 35, 400 (1975).
- 16/ R.A.Tobey, Nature (London), 254, 245 (1975).
- 17/ R.A.Bender și R.L.Dedrick, Cancer Chemother.Rept. 59, 205 (1975).
- 18/ H.E.Skipper, F.M.Schabel, M.W.Trader și J.R.Thomson, Cancer Res. 21, 1154 (1961).
- 19/ F.M.Schabel, T.P.Johnston și G.S.McCaleb, Cancer Res. 23, 725 (1963).
- 20/ M.O.Green și J.Greenberg, Cancer Res. 20, 116 (1960).
- 21/ S.K.Carter și T.H.Wasserman, Cancer Treat.Rept. 60, 207 (1975).
- 22/ A.F.McKay și G.F.Wright, J.Amer.Chem.Soc., 69, 3027 (1947).
- 23/ K.A.Hyde, E.Acton, W.A.Skinner, L.Goodman, J.Greenberg și B.A. Baker, J.Med.Pharm.Chem. 5, 1 (1962).

- 24/ G.von Bruning, Berichte, 21, 1809 (1888).
- 25/ T.P.Johnston, G.S.McCaleb si J.A.Montgomery, J.Med.Chem. 6, 669 (1963).
- 26/ T.P.Johnston, G.S.McCaleb, P.S.Opliger si J.A.Montgomery, J.Med. Chem. 9, 892 (1966).
- 27/ T.P.Johnston, G.S.McCaleb, P.S.Opliger, W.A.Laster si J.A. Montgomery, J.Med.Chem. 14, 600 (1971).
- 28/ J.A.Montgomery, G.S.McCaleb, T.P.Johnston, J.G.Mayo si W.R. Laster, J.Med.Chem. 20, 291 (1977).
- 29/ P.F.Wiley, R.R.Heerr, H.K.Jahnke, C.G.Chidester, S.R.Mizsak, L.Bayard si A.D.Argoudelis, J.Org.Chem. 44, 9 (1979).
- 30/ R.R.Herr, H.K.Jahnke si A.D.Argoudelis, J.Amer.Chem.Soc. 89, 4808 (1967).
- 31/ C.Hansch, N.Smith, R.Engle, Cancer Chemother.Rept. 56, 443 (1972).
- 32/ N.Rakieten, M.L.Rakieten si M.V.Nadkarni, Cancer Chemother.Rept. 29, 91 (1963).
- 33/ A.N.Fujiwara, E.M.Acton si D.W.Henry, J.Med. Chem. 17, 392 (1974).
- 34/ M.Iwasaki, M.Ueno, K.Ninomya, J.Sekine, Y.Nagamatsu si G.Kimura, J.Med.Chem. 19, 918 (1976).
- 35/ T.P.Johnston, G.S.McCaleb si J.A.Montgomery, J.Med.Chem. 18, 104, (1975).
- 36/ J.L.Montero, A.Moruzzi, J.Oiry si J.L.Imbach, Eur.J.Med.Chem. 12, 397 (1977).
- 37/ G.Mathé, B.Merrou, M.Hayat, F.de Vassal, J.L.Misset, L.S.Schwarzenberg, D.Machover, P.Mibaud, D.Delpomme, C.Jassin, M.Misset, J.L.Montero si J.L.Imbach, Biomedicine, 27, 294 (1977).
- 38/ C.G.Moertel, A.J.Schutt si R.G.Hann, J.Natl.Cancer Inst. 54, 69 (1975).
- 39/ J.S.Kovach, C.G.Moertel si A.J.Schutt, Cancer, 33, 563 (1974).

- 40/ V.I.Borisov, National Cancer Institute Monograph, 45, 243 (1971).
- 41/ P.S.Schein, L.Panasci, P.W.Wooley și T.Anderson, Cancer Treat.Rept. 60, 801 (1976).
- 42/ T.H.Wasserman, Cancer Treat.Rept. 60, 709 (1976).
- 43/ R.Gunnarsson, C.Perne și J.Hellerstrom, Biochem.J. 140, 487 (1976).
- 44/ P.S.Schein, D.A.Cooney, M.G.Mc Menamin și T.Anderson, Biochem.Pharmacol. 22, 2625 (1973).
- 45/ R.Althouse, J.Huff, L.Tomates și J.Wilbourn, Cancer Res. 40, 1 (1980).
- 46/ J.A.Montgomery, J.G.Mayo și C.Hansch, J.Med.Chem. 17, 477 (1974).
- 47/ G.Eisenbrand, H.H.Fiebig și W.J.Zeller, Z.Krebsforsch. 86, 279 (1976).
- 48/ J.Hilton și M.D.Walter, Biochem.Pharmacol. 24, 2153 (1975).
- 49/ P.B.Farmer, A.B.Foster, M.Jarman, M.R.Oddy și D.J.Reed, J.Med.Chem. 21, 514 (1978).
- 50/ D.J.Steward, R.S.Benjamin, M.Leavens, M.Valdivieso, M.A.Burgess și G.P.Bodey, Cancer Res. 40, 3756 (1980).
- 51/ J.W.Lown, A.V.Joshua și L.W.Mc Laughlin, J.Med.Chem. 23, 798 (1980).
- 52/ T.Machinami, S.Nishiyama, K.Kikuchi și T.Suami, Bull.Chem.Soc.Jpn. 48, 3763 (1975).
- 53/ T.Hisamatsu și S.Uchida, Gann, 68, 819 (1977).
- 54/ T.Suami, T.Machinami și T.Hisamatsu, J.Med.Chem. 22, 247 (1979).
- 55/ T.Suami, K.Tadano și W.Bradner, J.Med.Chem. 22, 314 (1979).
- 56/ T.Lin, P.H.Fischer, G.T.Shiau și W.A.Prusoff, J.Med.Chem. 21, 130 (1978).
- 57/ H.Lam, A.Begheiter și G.J.Goldenberg, J.Med.Chem. 22, 250 (1979).
- 58/ A.M.Crider, C.K.L.Lu, H.G.Floss, J.M.Cassady și J.A.Clemens, J.Med.Chem. 22, 32 (1979).
- 59/ J.A.Montgomery, Cancer Treat.Rept. 60, 651 (1976).
- 60/ T.P.Johnston, G.S.Mc Caleb și J.A.Montgomery, J.Med.Chem. 18, 634 (1975).
- 61/ J.A.Montgomery, A.James, G.S.Mc Caleb, M.C.Kirk și T.P.Johnston, J.Med.Chem. 18, 568 (1975).

- 62/ T.H.Wasserman, M.Slavik și S.K.Carter, *Eur.J.Cancer*, 12, 41 (1976).
- 63/ E.A.Garrett, S.Goto și J.F.Stubbins, *J.Pharm.Sciences*, 54, 119 (1965).
- 64/ J.L.Boivin și P.A.Boivin, *Can.J.Chem.* 29, 478 (1951).
- 65/ J.K.Snyder și L.M.Stock, *J.Org.Chem.* 45, 886 (1980).
- 66/ R.Huisgen și H.Meimlinger, *Ann.* 599, 183 (1956).
- 67/ M.Colvin, J.W.Cowens, R.B.Brundrett, B.S.Kramer și D.B.Ludlum,
Biochem.Biophys.ResCommun. 60, 515 (1974).
- 68/ D.J.Reed, H.E.May, R.B.Boose, K.M.Gregory și M.A.Deilstein, *Cancer
Res.* 35, 568 (1975).
- 69/ R.J.Weinkam și H.S.Lin, *J.Med.Chem.* 22, 1193 (1979).
- 70/ R.B.Brundrett, J.W.Cowens, M.Colvin și J.Jardine, *J.Med.Chem.* 19,
958 (1976).
- 71/ A.B.Foster, M.Jarman, P.L.Coe, J.Sleigh și J.C.Fallow, *Comunicare
ICREW*,
- 72/ V.T.Oliverio, *Cancer Treat.Rept.* 60, 703 (1976).
- 73/ V.T.DeVita, P.P.Carbone și A.H.Owens, *Cancer Res.* 25, 1876 (1965).
- 74/ H.H.Hansen, O.S.Selvawry și F.M.Muggia, *Cancer Res.* 31, 223 (1971)
- 75/ R.C.Young, M.D.Walker și G.P.Canellos, *Cancer*, 31, 1164 (1973).
- 76/ V.T.Oliverio, W.M.Vietzke și M.K.Williams, *Cancer Res.* 30, 1330
(1970).
- 77/ F.P.Gastronovo Jr., M.P.Potsaid și S.Kopiwoda, *Cancer Res.* 40,
3473 (1980).
- 78/ R.W.Sponzo, V.T.DeVita și V.T.Oliverio, *Cancer*, 31, 1154 (1973).
- 79/ H.E.May, R.Boose și D.J.Reed, *Biochem.Biophys.ResCommun.* 57,
426 (1974).
- 80/ M.D.Walker și J.Hilton, *Cancer Treat.Rept.* 60, 729 (1976).
- 81/ G.P.Wheeler, T.P.Johnston, B.J.Bowden, G.C.McCaleb, D.L.Hill și
J.A.Montgomery, *Biochem.Pharmacol.* 26, 2331 (1977).
- 82/ J.M.Heel, P.A.Fox, D.Doukas și Ph.S.Schein, *Cancer Res.* 38,
1070 (1978).

- 83/ D.L.Hill, M.C.Kirk și R.F.Struck, Cancer Res. 35, 296 (1975).
- 84/ Ch.J.Cheng, Sh.Fujimura, D.Grunberger și I.B.Weinstein, Cancer Res. 32, 22 (1972).
- 85/ V.H.Bono Jr., Cancer Treat.Rept. 60, 699 (1976).
- 86/ B.S.Kramer, C.C.Fenselau și D.B.Ludlum, Biochem.Biophys.Res. Commun. 56, 783 (1974).
- 87/ D.B.Ludlum, B.S.Kramer și J.Wang, Biochemistry, 14, 5480 (1975).
- 88/ W.R.Tong și D.B.Ludlum, Biochem.Pharmacol. 27, 77 (1978).
- 89/ D.B.Ludlum și W.R.Tong, Biochem.Pharmacol. 27, 2391 (1978).
- 90/ K.W.Kohn, Cancer Res. 37, 1450 (1977).
- 91/ R.A.G.Ewig și K.W.Kohn, Cancer Res. 37, 2114 (1977).
- 92/ C.B.Thomas, R.Osieka și K.W.Kohn, Cancer Res. 38, 2448 (1978).
- 93/ L.C.Erickson, R.Osieka și K.W.Kohn, Cancer Res. 38, 802 (1978).
- 94/ L.C.Erickson, M.O.Bradley și K.W.Kohn, Cancer Res. 38, 612 (1978).
- 95/ P.W.Wolley, R.L.Dion, K.W.Kohn și V.H.Bono Jr., Cancer Res. 36, 1470 (1976).
- 96/ J.W.Lown; W.Larry și Y.N.Chang, Bioorg.Chem. 7, 97 (1978); CA 89 : 208909.
- 97/ G.P.Wheeler, Comunicare pers.International Cancer Res. Workshops Buc. mai 1979.
- 98/ H.E.Kann Jr., Cancer Res. 38, 2363 (1976).
- 99/ B.D.Baril, E.F.Baril, J.Laszlo și G.P.Wheeler, Cancer Res. 35, 1(1975).
- 100/ G.R.Gale, Biochem.Pharmacol., 14, 1707 (1965).
- 101/ H.A.Abelson, D.Karlan și S.A.Penman, Biochem.Biophys.Acta, 349, 389 (1974).
- 102/ H.E.Kann Jr., K.W.Kohn, L.Widerlite și D.Gullian, Cancer Res. 34, 1982 (1974).
- 103/ G.P.Wheeler, B.J.Bowdon și R.F.Struck, Cancer Res. 35, 2974 (1975).
- 104/ T.Anderson, M.G.McMenamin și Ph.S.Schein, Cancer Res. 35, 761 (1975).
- 105/ L.C.Panasci, D.Green, R.Nagourney, P.Fox și Ph.S.Schein, Cancer Res. 37, 2615 (1977).

- 106/ C.Hansch și J.M.Clayton, J.Pharm.Sci., 62, 1 (1973).
- 107/ B.J.Bowdon și G.P.Wheeler, Proc.Am.Assoc.Cancer Res., 12, 67 (1971).
- 108/ V.A.Levin și P.Kabra, Cancer Chemother.Rept. 58, 787 (1974).
- 109/ F.Helmer, K.Kiebs și C.Hansch, Biochemistry, 7, 2853 (1968).
- 110/ P.S.Schein, Cancer Res. 29, 1226 (1969).
- 111/ T.P.Johnston, G.S.Mc Caleb, S.D.Clayton, J.L.Trye, C.A.Krauth și J.A.Montgomery, J.Med.Chem. 20, 279 (1979).
- 112/ J.L.Montero, A.Moruzzi, J.Oiry și J.L.Imbach, Eur.J.Med.Chem.- Chimica Therapeutica, 11, 183 (1976).
- 113/ T.P.Johnston, G.S.Mc Caleb, T.Anderson și D.S.Murison, J.Med.Chem. 22, 597 (1979).
- 114/ J.L.Montero și J.L.Imbach, C.R.Acad.Sc.Paris, serie c, 279, 809 (1974).
- 115/ T.Suami, US 4, 148, 921; CA 91: 57418.
- 116/ T.Horvath, E.Csanyi, S.Eckhardt și E.Kiraly, Belg. 868, 988; CA 91: 175668.
- 117/ K.Tsujihara, M.Ozeki și Y.Arai, Jpn.Kokai Tokkyo Koho 79, 103, 826; CA 92 : 76889.
- 118/ N.Takamura, M.Kamido, Y.Arai și T.Mizoguchi, Jpn.Kokai Tokkyo Koho 79,66,668; CA 92 : 181574.
- 119/ T.Suami, Ger.Offen 2, 915, 397; CA 92 : 181574.
- 120/ S.Arzawa, K.Sasaki, H.Akutsu, T.Satomi, K.Momoki, T.Arika, S.Kawabata și Y.Inoue, Jpn.Kokai Tokkyo Koho 79, 144, 359; CA 92 : 147 144.
- 121/ K.Tsujihara, M.Ozcki și Y.Arai, Jpn.Kokai Tokkyo Koho 79, 151, 919; CA 92: 198709.
- 122/ S.Aizawa, K.Sasaki, H.Akutsu, T.Satomi, K.Momoki, T.Uka, S.Kawabata și Y.Inoue, Jpn.Kokai Tokkyo Koho 80 04,324; CA 92 : 198710.
- 123/ M.Murakami, Ger.Offen. 2, 230,003; CA 78 : 97512.

- 124/ Cilag Ltd. Brit. 824,218; CA 54: 4397.
- 125/ N.Sato, Japan.Kokai 74 69,676; CA 81 : 152 012.
- 126/ T.Hirata, A.Sato și R.Imai, Japan.Kokai 78 05,196; CA 89 : 24727.
- 127/ J.L.Montero, M.Rodriquez și J.L.Imbach, Eur.J.Med.Chem. - *Chimica
Therapeutica*, 12, 408 (1977).
- 128/ R.Blyum, Z.Stumbrevicinte, J.Valaviciene, V.Simkeviciene și
V.Lucenko, Liet.TSR Mokshe Akad.Darb.Ser.C. 1979, 113; CA 92:74-04.
- 129/ A.G.Nelson, F.J.Shelton și W.H.Wetzel, J.Med.Chem.10, 735 (1967).
- 130/ W.A.Pettit și R.H.Mortara, J.Med.Chem.18, 1029 (1975).
- 131/ W.Siefken, Ann. 562, 6 (1949).
- 132/ I.G.Farbenind, A-G Fr. 809233; CA 31: 6676.
- 133/ F.Lengfeld și J.Stieglitz, J.Amer.Chem.Soc.16, 71 (1894).
- 134/ H.Wenker, J.Amer.Chem.Soc. 53, 2603 (1936).
- 135/ C.K.Johnson, J.Org.Chem. 32, 1509 (1967).
- 136/ H.Najer, P.Chabrier și R.Guidicelli, Bull.Soc.Chim.Fr., 956 (1960).
- 137/A.Krantz, Tetrahedron Lett. 1975, 695.
- 138/ E.H.White, J.Amer.Chem.Soc. 77, 6008 (1955).
- 139/ Y.L.Chow și A.C.H.Lee, Can.J.Chem. 45, 311 (1967).
- 140/ K.Heyns și O.F.Woyrsch, Ber. 86, 75 (1953).
- 141/ K.Heyns și W.Bebenburg, Ber. 89, 1303 (1956).
- 142/ A.T.Blomquist, J.R.Johnson și H.Y.Sykes, J.Amer.Chem.Soc. 55,
2446 (1943).
- 143/ D.H.Hey, J.Stuart-Webb și G.H.Williams, J.Chem.Soc, 1952, 4657.
- 144/ Y.Ahmad și D.H.Hey, J.Chem.Soc. 1954, 4516.
- 145/ Y.Ahmad și D.H.Hey, J.Chem.Soc. 1955, 3819.
- 146/ J.Casado, A.Castro, M.A.L.Quintela și J.F.Cashaza, Monatsh.
Chem. 110, 1331 (1979).
- 147/ A.Meier, F.Stoos, D.Martin, G.Büyük și E.Hardergger, Helv.Chim.
Acta, 57, 2622 (1974).

- 148/ E.Hardergger, A.Meier și S.Stoos, *Helv.Chim.Acta*, 52, 2555 (1969).
- 149/ J.A.Settepani și G.R.Pettit, *J.Org.Chem.* 35, 843 (1970).
- 150/ J.A.Montgomery și H.J.Thomas, *J.Med.Chem.* 22, 1109 (1979).
- 151/ S.Matsumura, *Jpn.Kokai Tokkyo Koho* 78,148,932; *CA* 92: 152555.
- 152/ M.Takamura, T.Kanno, M.Ozeki, Y.Kawazoe, Y.Arai și T.Mizoguchi,
Jpn.Kokai Tokkyo Koho 79 39,074; *CA* 91 : 123 749.
- 153/ K.Tsujihara, M.Ozeki și Y.Arai, *Jpn.Kokai Tokkyo Koho* 79,100,324;
CA 92: 22 776.
- 154/ K.Tsujihara, M.Ozeki și Y.Arai, *Jpn.Kokai Tokkyo Koho* 79,88,273;
CA 91 : 41974.
- 155/ N.Nakanishi, K.Sacki și K.Ikeda, *Japan.Kokai* 75 58,040; *CA* 83 :
131 223.
- 156/ V.Kutsenko, V.Blyum și R.A.Taliene, *Zh.Org.Khim.* 2, 1201 (1973).
- 157/ T.Suami, T.Machinemi și T.Hisamatsu, *Japan.Kokai* 75,101,326;
CA 84 : 31365.
- 158/ P.Trutt și J.T.Witkowski, *J.Med.Chem.* 13, 574 (1970).
- 159/ W.H.Yanko, *US Pat.Appl.* 523,334; *CA* 83 : 96470.
- 160/ K.Tsujihara, M.Ozeki și Y.Arai, *Jpn.Kokai Tokkyo Koho* 79,154,714;
CA92: 181 581.
- 161/ K.Tsujihara, M.Ozeki și Y.Arai, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79, 157,
527; *CA* 92 : 215 731.
- 162/ K.Tsujihara, M.Ozeki și Y.Arai, *Ger.offen.* 292, 844; *CA* 93: 26734.
- 163/ A.Moruzzi, J.L.Montero, J.Oiry și J.L.Imbach, *Eur.J.Med.Chem. -*
Chimica Therapeutica, 13, 421 (1978).
- 164/ K.Goro, *Jpn.Kokai Tokkyo Koho* 78 95,915; *CA* 90 : 23608.
- 165/ K.Goro, *Ger.Offen.* 2, 805, 185; *CA* 90 : 6664.
- 166/ T.Hori, K.Momonoi, Y.Kiba, C.Yoshida, H.Sabai, K.Takeno, T.Onashi,
S.Kishimoto și I.Saikawa, *Yakugaku Zasshi* 99, 730 (1979).
- 167/ K.Goro, *Jpn.Kokai Tokkyo Koho* 78 96,331; *CA* 90 : 39195.
- 168/ G.Eisenbrand, *Ger.Offen.* 2, 659,862; *CA* 88: 120126.

- 169/ W.E.Keller, J.Chem.Phys. 16, 1003 (1948).
- 170/ D.R.Waldron și K.M.Badger, J.Chem.Phys. 18, 566 (1950).
- 171/ J.H.Bryden, Acta Cryst. 10, 714 (1957).
- 172/ J.E.Stewart, J.Chem.Phys. 26, 248 (1957).
- 173/ P.Vaughan și J.Donohue, Acta Cryst. 5, 530 (1952).
- 174/ A.R.Daniewski, V.Dabrowska, Z.Pracek și T.Urbanski, J.Chem.Soc. 1962, 2340.
- 175/ P.Grammaticakis, Bull.Soc.Chim.France, 14, 664 (1947).
- 176/ P.Grammaticakis, Bull.Soc.Chim.France, 16, 761 (1949).
- 177/ E.Stuckeyrr, J.Chem.Soc. 1949, 207.
- 178/ A.F.Schroeder, P.E.Wilcox, K.N.Trueblood și A.O.Dekker, Anal. Chem. 23, 1740 (1951).
- 179/ J.P.Picard și A.F.McFay, Can.J.Chem. 31, 896 (1953).
- 180/ P.Grammaticakis, Bull.Soc.Chim.France, 1959, 1550.
- 181/ P.Grammaticakis, Bull.Soc.Chim.France, 1962, 487.
- 182/ P.Grammaticakis, Bull.Soc.Chim.France, 1968, 1057.
- 183/ D.J.Pasto și C.O.Johnson, Organic Structure Determination, Prentice-Hall, Inc.1969.
- 184/ H.G.Leemann, K.Stich, J.Gründer și A.Lindemann, Helv.Chim. Acta, 46, 1148 (1963).
- 185/ Y.Mido, Spectrochim.Acta, 29A, 1(1973).
- 186/ C.I.Jose, Spectrochim.Acta, 25A, 111 (1969).
- 187/ C.N.R.Rao, G.C.Chaturvedi și R.K.Gosari, J.Mol.Spectr.28, 526 (1968).
- 188/ Y.Mido, Spectrochim.Acta, 29A, 431 (1973).
- 189/ Y.Mido, Spectrochim.Acta, 28A, 1503 (1972).
- 190/ L.Doub și J.M.Wandenbelt, J.Amer.Chem.Soc. 62, 2714 (1947).
- 191/ R.H.Barker, G.J.Boudreaux și S.L.Vail, Applied Spectry, 20, #14 (1966).
- 192/ M.A.Arsenault, C.D.Freeman și D.L.Hooper, Applied Spectry, 28, 197 (1974).

- 193/ A.J.Bloodworth și A.G.Bavies, J.Chem.Soc. 1966, 125.
- 194/ H.W.Smith, A.Camerann și N.Camerann, J.Med.Chem. 21, 168 (1978).
- 195/ J.K.Snyder și L.M.Stock, J.Org.Chem. 45, 886 (1980).
- 196/ O.Costăchel, M.Vitan, I.Niculescu-Duvăz, M.Ionescu, I.Mogos și V.Dobre, Rom. 51132/1968.
- 197/ I.Niculescu-Duvăz, M.Ionescu, M.Cambanis, K.Vitan și L.V.Feyns, J.Med.Chem. 11, 500 (1968).
- 198/ H.A.Brison și T.W.Riener, J.Amer.Chem.Soc. 65, 23 (1943).
- 199/ P.Sengupta, J.Org.Chem. 18, 249 (1953).
- 200/ D.Siebach, Synthesis, 17 (1969).
- 201/ J.Weinstock, J.Org.Chem. 26, 3511 (1961).
- 202/ G.Gosnovsky și M.Komeczny, Synthesis 11, 735 (1976).
- 203/ C.Harries, Ber. 29, 523 (1896).
- 204/ C.Harries, Ann. 417, 118 (1918).
- 205/ E.G.Rozanțev și Yu.V.Kohanov, Izv.Akad.Nauk, SSSR, Ser.Khim. 8, 1477 (1966).
- 206/ G.M.Rosen, J.Med.Chem. 17, 358 (1974).
- 207/ V.A.Golubiev și E.G.Rozanțev, Izv.Akad.Nauk, SSSR, Ser.Khim. 7, 716 (1965).
- 208/ E.G.Rozanțev, Izv.Akad.Nauk, SSSR, Ser.Khim. 6, 2218 (1964).
- 209/ R.Brière, H.Lemaire și A.Rassat, Bull.Soc.Chim.Fr.1965, 3273.
- 210/ K.V.Auwers și M.Schmidt, Ber. 46, 457 (1913).
- 211/ P.Ruggli, Ann. 399, 174 (1913).
- 212/ H.J.Backer și J.D.H.Homan, Rec.Trav.chim. 58, 1050 (1939).
- 213/ D.Holde Ber. 45, 3701 (1912).
- 214/ H.Erlenmeyer și W.Büchler, Helv.Chim.Acta, 29, 1924 (1946).
- 215/ L.Ruzicka și H.Brekenoogen, Helv.Chim.Acta, 14, 1319 (1931).
- 216/ V.Anger, Ann.Chim.Physique, 22, 289 (1891).
- 217/ P.A.S.Smith, Organic Reactions, vol.III, 373, John Willey & Sons, Inc., New York, 1959.

- 218/ I.Baracu, E.Tîrnăuceanu și I.Niculescu-Duvăz, Rev.Roum. 8, 885 (1977).
- 219/ I.Baracu, I.Niculescu-Duvăz, V.Dobre, Brevet Rom. 73679.
- 220/ I.Baracu, I.Niculescu-Duvăz, K.Deneș și V.Dobre, cerere brevet feb.1980.
- 221/ J.von Braun, Ann. 490, 100 (1931).
- 222/ E.Grant și I.Niculescu-Duvăz, Can.J.Chem. 43, 1227 (1967).
- 223/ I.Niculescu-Duvăz, A.Cambanis și E.Tîrnăuceanu, J.Med.Chem. 10, 172 (1967).
- 224/ I.Baracu, I.Niculescu-Duvăz și V.Dobre, Rom. 84.127/1977.
- 225/ I.Baracu, I.Niculescu-Duvăz și S.Teodorescu, Rom. 96.866/1977.
- 226/ I.Niculescu-Duvăz, I.Elian, M.Ionescu, E.Tîrnăuceanu, J.Graet. Chemie, 321, 522 (1979).
- 227/ R.Brière, M.R.Dupeyre, H.Lemaire, C.Morat, A.Rassat și J. 1, Bull.Soc.Chim., 3290, 1966.
- 228/ R.Chiairelli și A.Rassat, Tetrahedron, 29, 3639 (1973).
- 229/ T.G.Crăescu, I.Baracu, L.Bucșa, N.Grecu, Rev.Roum.Biochim. (in press).
- 230/ I.Baracu, G.Dotez, K.Deneș, V.Dobre, B.Ureche, T.Crăescu, N.Voiculeț și I.Niculescu-Duvăz, Rev.Roum.Biochimie, 1981.
- 231/ T.J.Bardos, N.Datta-Gupta, P.Hepborn și D.J.Triggle, J.Med. Chem. 8, 167 (1965).
- 232/ E.Cornfield și N.Mantel, J.Amer.Stat.Assoc. 45, 181 (1950).
- 233/ N.B.Ames, D.F.Lee și W.E.Durston, Proc.Nat.Acad.Sci. (Wash.), 70, 782 (1973); idem 70, 2281 (1973).
- 234/ N.Voiculeț, M.Sbenghe și C.Barbu, Oncologia (Buc.), 16, 15 (1977).