

MINISTERUL ÎNVĂȚĂMÎNTULUI
INSTITUTUL POLITEHNIC "TRAIAN VUIA" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ

T E Z A D E D O C T O R A T

ANTIMETABOLITI SI ANALOGI
PTERIDINICI
AI ACIDULUI FOLIC

BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITATEA "POLITEHNICĂ"
TIMIȘOARA

CONDUCĂTOR
PROF. EMERIT DR. DOC. G. OSTROGOVICH
MEMBRU CORESP. AL ACADEMIEI R.S.R.

DOCTORAND
ING. D.C. SCHUSTER

- 1978 -

INSTITUTUL POLITEHNIC TIMIȘOARA	
BIBLIOTECA CENTRALĂ	
Volumul Nr. 380.335	
Dulap 299 Lit. F	

Respectuos omagiu

Prof. Emerit Dr. Docent G. OSTROGOVICH

Membru Coresp. al Academiei R.S.R.

sub a cărui permanentă și înțeleaptă
îndrumare s-a înfăptuit această lucrare.

Toată recunoștința mea colegilor

Dr.ing.I.Niculescu-Duvăz

Chimist G.Ciuștea

Chimist E.Tărnăuceanu

Chimist G.Botez

Biolog V.Dobre

pentru sprijin și colaborare.

BUPT
1972

C U P R I N S

INTRODUCERE	1
PARTEA I. STUDIU CRITIC DE LITERATURA	
I. ACTIVITATEA BIOLOGICA A ANTAGONISTILOR CU STRUCTURA PTERIDINICA AI ACIDULUI FOLIC	5
1. Biochimia acidului folic.	6
2. Principii de proiectare a antimetaboliților acidului folic	9
2.1. Distribuția acidului folic și antagoniștilor săi	9
2.2. Transportul prin membrana celulară	10
2.3. Metabolizarea antagoniștilor acidului folic	11
2.4. Mecanismul de acțiune	12
2.4.1. Interacțiunea antagoniștilor acidului folic cu diverse sisteme enzimatică	12
2.4.2. Inhibarea biosintezei acizilor nucleici	14
2.4.3. Influența antifolicelor asupra cineticii celulare	15
2.5. Efecte secundare ale tratamentului cu anta- goniștii acidului folic	16
2.5.1. Toxicitatea	16
2.5.2. Rezistența	17
2.6. Relații structură chimică-activitate biologică	18

II. SINTEZA ANALOGILOR PTERIDINICI AI ACIDULUI FOLIC	25
1. Sinteza acidului folic și analogilor săi	
plecînd de la derivați pirimidinici	25
1.1. Fără izolarea pteridinei intermediare	25
1.2. Cu izolarea unui intermediar pteridinic	29
1.3. Sinteza intermediarilor	34
1.3.1. Sinteza intermediarilor pirimidinici	34
1.3.2. Sinteza componentei carbonilice	36
1.3.3. Sinteza componentei peptidice	37
2. Sinteza analogilor pteridinici ai acidului folic plecînd de la derivați pirazinici	39
3. Sinteza analogilor acidului folic utilizînd acidul pteric și analogii săi	40
4. Sinteza analogilor acidului folic prin reacții chimice efectuate asupra moleculei acestora.	41
4.1. Reducerea	41
4.2. Formilarea	42
4.3. Oxidarea	42
4.4. Reacția cu acidul azotos și azotic	43
4.5. Esterificarea	43
4.6. Halogenarea	44
5. Biosinteza acidului folic	44
PARTEA II. SINTEZA, STUDIUL FIZICO-CHIMIC SI BIOLOGIC	
AL UNOR ANALOGI AI ACIDULUI FOLIC	
I. JUSTIFICAREA ABORDARII DOMENIULUI	47
II. SINTEZE DE ANALOGI PTERIDINICI AI ACIDULUI FOLIC	50
1. Sinteza acidului N{4-[metil(2',4'-diamino-pteridinil)-6'-metil)amino]benzoil}L-glutamic(Methotrexat, MTX, 6-MTX, 6-L-MTX, antifolan, 6, MAB-L-Glu	50
1.1. Evaluarea procedurii Seeger de sinteză a 6-MTX	51

1.2. Evaluarea procedurii Berezovskii de sinteză a Methotrexatului	52
1.3. Sinteza 6-MTX via 2,4-diamino-6-cloro metil-pteridină	53
1.4. Purificarea MTX	55
1.5. Sinteza intermediarilor	57
2. Sinteza acidului N[4-[metil(2',4'-diamino-pteridinil-7'-metil)amino]benzoil]glutamic (7-L-MTX, 7,MAB-L-Glu, 6)	68
3. Sinteza analogilor dipeptidici ai acidului folic	71
4. Sinteza analogilor tripeptidici ai acidului folic	74
III. DETERMINARI STRUCTURALE ALE NOILOR ANALOGI	81
1. Reacții de degradare	81
2. Spectre RMN	83
3. Spectre de masă	84
4. Spectre de ultraviolet	84
4.1. Peptide	84
4.2. Pteridine	98
5. Spectre de infraroșu	98
6. Spectre de dicroism circular	125
7. Cromatografie	128
IV. ACTIVITATEA BIOLOGICĂ A NOILOR ANALOGI DI- SI TRIPEPTIDICI AI ACIDULUI FOLIC	129
1. Testarea activității in vitro a noilor analogi ai acidului folic cu structură pteridinică	130
1.1. Acțiunea asupra microorganismului <i>S. faecalis</i>	130
1.2. Inhibarea dihidrofolat reductazei (DHFR)	130
1.3. Acțiunea asupra adenovirusului	135
2. Testarea activității in vivo a noilor analogi ai acidului folic cu structură pteridinică	135

2.1. Toxicitatea (DL_{50})	135
2.2. Acțiunea asupra unor neoplazii experimentale	136
2.2.1. Acțiunea asupra L 1210	136
2.2.2. Acțiunea asupra carcinosarcomului W 256	138
3. Constatări privind activitatea biologică a noilor analogi ai acidului folic sintetizați	138
CONCLUZII	142
LISTA LUCRARILOR PUBLICATE	145
PARTEA EXPERIMENTALA	147
BIBLIOGRAFIE	167

I N T R O D U C E R E

Secolul nostru este incontestabil marcat de cercetările ce s-au efectuat și se vor efectua în domeniul etiologiei, profilaxiei și tratamentului bolii canceroase care, așa cum se știe, constituie cea de a doua cauză de deces, după bolile cardiovasculare.

Chimioterapia s-a impus de curînd printre mijloacele tradiționale de tratament (chirurgical și radiologic) ale bolilor neoplazice și ocupă, alături de imunochimioterapie (apărută în ultimii ani) o poziție aparte.

Apărută în deceniul al patrulea al secolului nostru, chimioterapia antitumorală s-a dezvoltat rapid și, datorită unor succese de necontestat în tratamentul anumitor forme de cancer dar rai ales perspectivelor sale practic nelimitate, se impune ca o cale generatoare de speranțe pentru viitor în acest domeniu.

Deși tratamente ale cancerului cu ajutorul unor substanțe chimice (arsenic, apă tare, etc) sînt relatate încă din antichitate, începuturile chimioterapiei antitumorale moderne se situează în preajma celui de al doilea război mondial, cînd la universitatea din Yale, un bolnav leucemic în stadiu terminal cunoaște o remisiune spectaculoasă, dar din păcate de scurtă durată, în urma administrării unei azotiperite.

La mai puțin de zece ani de la acest eveniment, adică în 1949, s-a realizat sinteza Methotrexatului, activ în tratamentul leucemiilor la copii. Acesta s-a dovedit a fi un produs de excepție în chimioterapia tumorilor neoplazice, datorită extraordinarei sale eficacități în tratamentul chorioepitelionului, boală altfel fatală în

cîteva luni.

În următoarele trei decenii, numărul produselor cu proprietăți antitumorale remarcabile a crescut rapid (Ciclofosfamida, Tio-Tepa, Actinomicina D, 6-Mercaptopurina, N-nitrozoureele, etc), fără însă a se ajunge la soluții definitive. Toate sînt caracterizate, ca de altfel și Methotrexatul, printr-o toxicitate excesivă ce lezează în special țesuturile cu proliferare rapidă. Trebuie de asemenea menționat ca neajuns general al chimioterapiei anticanceroase și instalarea rezistenței, fenomen ce crează dificultăți suplimentare.

Proliferarea fără precedent a compușilor potențial anticanceroci sintetizați și testați a impus, atît din motive sistematice, cît și practice, o clasificare a lor. Trebuie subliniat încă de la început că împărțirea acestora, unanim acceptată astăzi, și anume:

- agenți alchilanți
- antimetaboliți
- hormoni citostatici
- antibiotice
- produși naturali
- diverse

suferă de lipsa unui criteriu unic de clasificare, ceea ce face ca valoarea ei să fie cel puțin discutabilă. Astfel, compușii grupați în funcție de mecanismul lor de acțiune (antimetaboliții), apar alături de produșii naturali, clasificați în funcție de proveniență. Nu vom discuta acest aspect al problemei, care pentru noi nu prezintă importanță decît în măsura în care antimetaboliții constituie o clasă aparte, bine definită, în cadrul produșilor cu proprietăți antitumorale.

Sub acest aspect, antimetaboliții pot fi împărțiți în antimetaboliți ai amino acizilor, peptidelor, purinelor, pirimidinelor, vitaminelor, hormonilor, etc. Dintre aceștia, un loc aparte îl ocupă antimetaboliții acidului folic, ce fac obiectul prezentei lucrări.

Apariția produșilor cu acțiune antifolică a fost legată de trei momente importante:

- descoperirea rolului esențial al acidului folic în viața celulei;
- observația că atât microorganismele, cât și unele celule neoplazice sînt mari consumatoare de acid folic, astfel încît depleția acestuia (provocată printr-un mijloc oarecare) are consecințe imediate asupra lor;
- evidențierea posibilității transformării unui metabolit într-un antimetabolit, prin modificări potrivite ale moleculei primului.

Parcurgerea acestor trei etape explică foarte bine faptul că Methotrexatul a apărut la foarte scurt timp după elucidarea structurii și sinteza acidului folic și atestă caracterul rațional al descoperirii sale.

Curînd după sinteza Methotrexatului, Farber i-a descoperit acțiunea asupra leucemiei și mai tîrziu, Li și colab., oarecum întîmplător, asupra chorioepiteliomului.

De atunci și pînă în prezent, numeroase cercetări au căutat să elucideze mecanismul său de acțiune. În acest context s-a demonstrat în mod neechivoc, efectul său inhibitor asupra unei enzime implicate direct în biosinteza coenzimelor derivate de la acidul folic și anume dihidrofolat reductaza (DHFR). Mai puțin sigură este însă ipoteza ce leagă activitatea anticanceroasă a Methotrexatului de efectul său de blocare a acestei enzime.

În afara acestor studii biologice și biochimice, numeroși analogi ai acidului folic au fost sintetizați, atât în scopul găsirii unor compuși mai activi și mai puțin toxici decît capul de serie, cât și în vederea evidențierii unor relații între structura chimică și activitatea anticanceroasă. Porțiunea pteridinică a moleculei s-a bucurat de o atenție cu totul specială, fiind considerată responsabilă de acțiunea acestui tip de compuși. În vederea extinderii

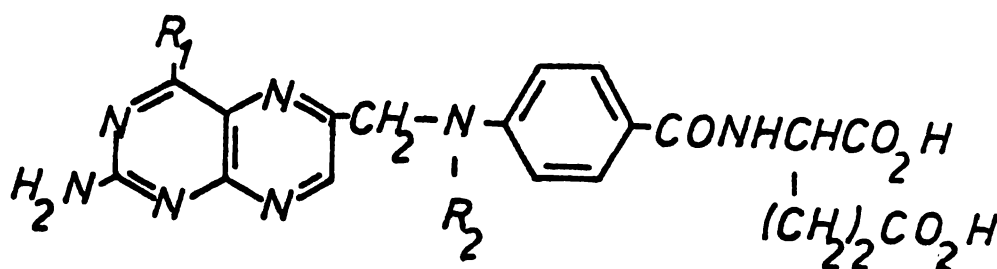
cunștințelor în acest domeniu, preocupările noastre s-au orientat către porțiunea peptidică mai puțin studiată. Sîntem de părere că în cazul antimetaboliților acidului folic, această împărțire convențională a moleculei în zone active și lipsite de importanță biologică este mai puțin corespunzătoare, structura moleculei luată în ansamblul ei fiind esențială. În ce măsură acest obiectiv a fost atins, rezultă din lucrarea de față.

PARTEA I

STUDIUL CRITIC DE LITERATURA

I. ACTIVITATEA BIOLOGICA A ANTIMETABOLITILOR CU STRUCTURA PTERIDINICA AI ACIDULUI FOLIC

Prepararea în anii 1948-49 a Aminopterinei (AM, I) și Methotrexatului (MTX, II) /1/ a constituit o etapă nouă în crearea de medicamente anticancerose. Descoperirea aproape imediată a activităților lor antileucemice /2/ a stimulat sinteza de noi analogi și studii biochimice amănunțite privind mecanismul lor de acțiune. Inșă proprietatea cea mai importantă a MTX de a vindeca într-un procent de peste 80% chorioepiteliomul /3/ (tumoră trofoblastică cu acțiune fatală extrem de rapidă) a fost descoperită mai târziu. Astăzi MTX (și mai puțin AM) sînt larg utilizate (în cadrul polichimioterapiei) în tratamentul neoplaziilor inițial diseminate, al tumorilor trofoblastice /4-6/, carcinomului de sîn /7/, carcinomului epidermoid al capului și gîtului /8/, etc.



	R_1	R_2
I	NH_2	H
II	NH_2	CH_3
III	OH	H

S-a dovedit încă de mult că atât AM (I), cât și MTX (II), sînt de fapt antimetaboliți ¹⁾ ai acidului folic (AF, III).

Definiția acceptată a antimetabolitului "clasic" pune deci ca prim element, analogia structurală între acesta și metabolit. Ulterior Baker /10-12/ consideră suficient dacă această analogie se referă exclusiv la zonele din molecula metabolitului responsabile de interacțiunea cu enzima. Pe această bază, antagoniștii AF pot fi clasificați în antimetaboliți "clasici" și "neclasici", ultimii fiind proiectați conform teoriei lui Baker.

În cele ce urmează ne vom rezuma exclusiv la prima categorie de antimetaboliți ai acidului folic.

O scurtă prezentare a biochimiei acidului folic este necesară în vederea explicării mecanismului de acțiune al antifolicilor și, legat de aceasta, a criteriilor de proiectare a analogilor structurali.

1. Biochimia acidului folic.

AF necesar celulelor este în majoritate de proveniență exogenă (hrană) /13-15/. AF suferă o activare in vivo prin reducerea sa pre-

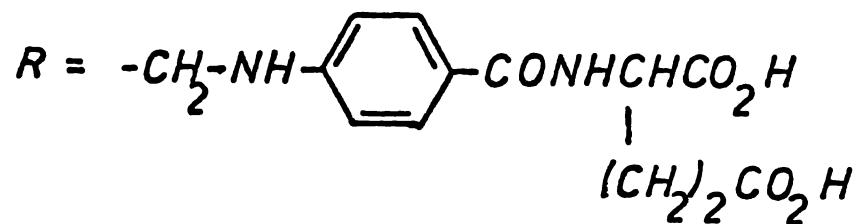
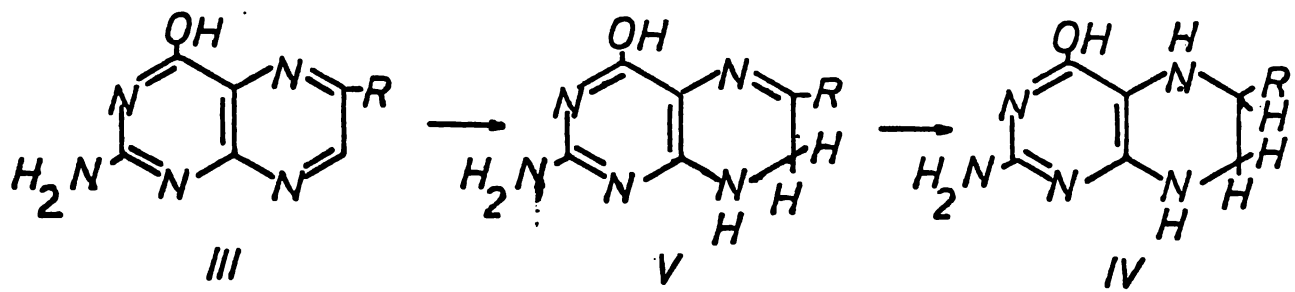
¹⁾ După Jukes /9/, un antimetabolit este definit drept un analog structural al unui metabolit (AF și coenzimele sale, în cazul nostru) capabil să provoace o deficiență în utilizarea acestuia din urmă, intrînd în competiție cu metabolitul pentru o enzimă dată. Elucidarea modului de acțiune al unui antimetabolit implică deci cunoașterea:

- sistemelor enzimatice ce controlează lanțul metabolic în care este implicat metabolitul respectiv;

- modului de interacțiune metabolit-enzimă, precum și a elementelor structurale din molecula metabolitului responsabile de această interacțiune;

- deficiențelor biologice provocate de antimetabolit.

alabilă la acid 5,6,7,8-tetrahidrofolic (THF, IV), via acid 7,8-dihidrofolic (DHF, V).



Reacția are loc fie sub acțiunea unei singure enzime (de exemplu în ficatul de șobolan /16/), fie a două sisteme enzimatică diferite (în *Clostridium striklandii* /17,18/). Pornind de la THF sînt sintetizate toate coenzimele AF, care apoi intervin în numeroase reacții biochimice extrem de importante, și anume:

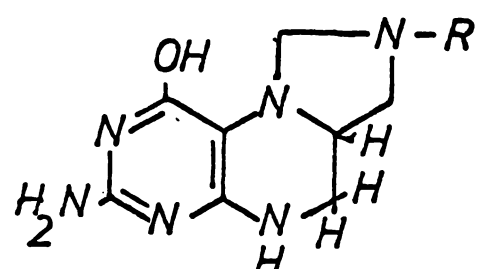
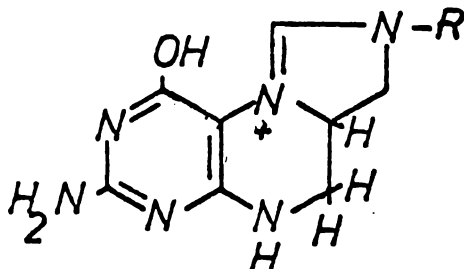
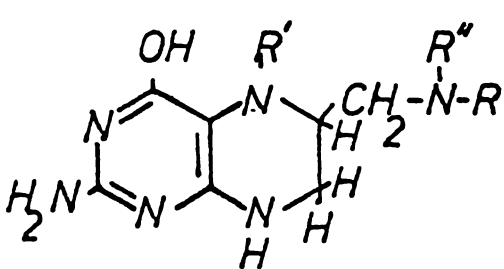
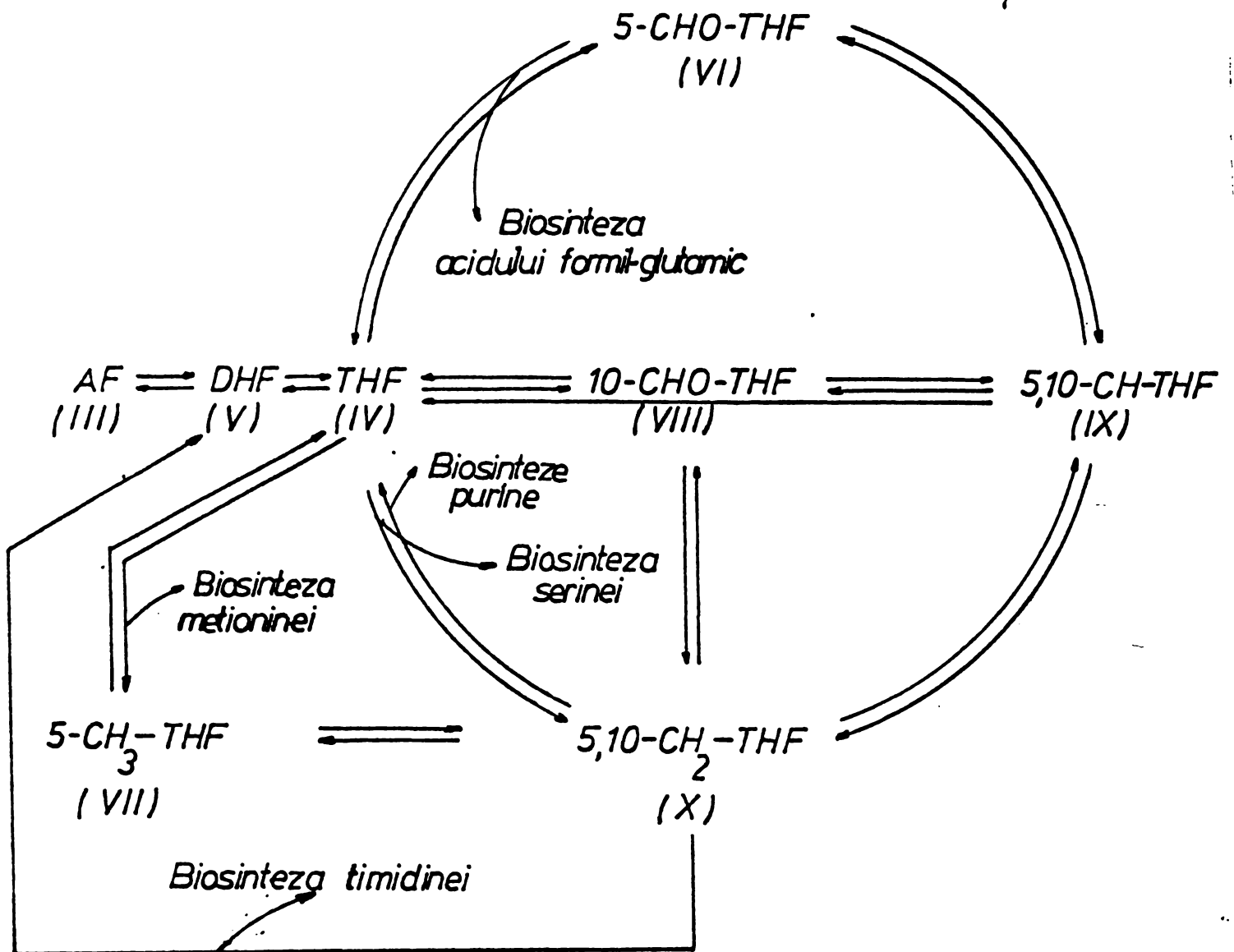
- sinteza și catabolismul purinelor (coenzimele AF furnizează atomii C₂ și C₈ ai nucleului purinic /19,20/);

- sinteza acidului timidilic (reacție dintre cele mai importante, deoarece concentrația acidului timidilic joacă rolul de "trigger" în biosinteza ADN /9,21-28/);

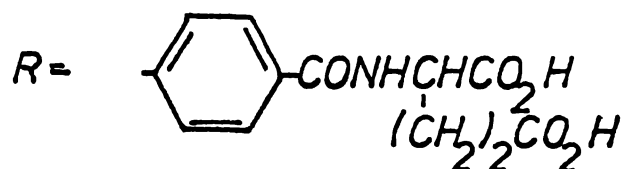
- sinteza și catabolismul unor amino acizi (biosinteza glicinei, serinei, metioninei, acidului glutamic, histidinei, precum și la inițierea sintezei proteice prin intermediul complexului rezultat prin formilarea Met-t-ARN^{fMet}, anume N-CHO-Met-t-ARN^{fMet} /9, 19,29-41/).

Ciclul AF și cele mai importante reacții în care acestea intervin sînt prezentate sumar în schema de mai jos (pag.8).

Rezultă deci rolul central al AF în metabolismul celular, acestea intervenind printre altele în biosinteza a trei din cele patru



	R'	R''
VI	CHO	H
VII	CH ₃	H
VIII	H	CHO



baze purinice și pirimidinice ale acizilor nucleici. Perturbarea metabolismului AF poate avea consecințe grave, chiar letale asupra celulei și acest efect este exploatat în sinteza de antimetaboliți ai acidului folic.

2.Principii de proiectare a antimetaboliților acidului folic.

Proiectarea antimetaboliților AF, ce urmărește realizarea unor compuși activi, puțin toxici și pe cât posibil specifici în tratamentul unor anumite forme de cancer, va trebui să țină seama de o serie de criterii. Complexitatea operației de proiectare de noi antifolice, rezultă din necesitatea studierii, măcar a capului de serie (MTX), de la administrarea și pînă la eliminarea sa, precizîndu-se următoarele aspecte:

- distribuție;
- transportul prin membrana celulară;
- metabolizarea și căile de detoxifiere;
- mecanismul de acțiune;
- relațiile structură-activitate biologică.

2.1.Distribuția acidului folic și a antagoniștilor săi.

AF din alimente (aflat sub formă de poliglutamat), spre a putea fi absorbit este transformat în monoglutamat /42,43/ cu ajutorul γ -L-glutamil-carboxipeptidazei /42/, enzimă specifică pentru legăturile γ -L-glutamice, cele α -L- sau γ -D-glutamice rămînd neafectate /44/.

AF ca atare sau sub formă de 5-CH₃-THF este stocat în ficat, acesta constituind principalul sediu în care are loc conversia AF în coenzimă.

La rîndul său, MTX administrat i.v. este eliminat în cea mai mare parte în primele 4 h /45/, restul fixîndu-se în țesuturile cu activitate ridicată de DHFR /45-50/. Persistența MTX în organele în

care se fixează preferențial este foarte ridicată. Astfel, în ficatul și rinichiul de șoarece, MTX se regăsește pînă la 240 zile/50, 51/, spre deosebire de om, la care această durată este de numai 116 zile /52/. În țesuturile cu proliferare rapidă (mucoasa intestinală, măduvă), persistența antagoniștilor AF este mai mică /53/. Retenția intracelulară a MTX a fost atribuită legării sale de DHFR /47,54,55/ dar în unele cazuri această explicație nu este suficientă /56/.

2.2. Transportul prin membrana celulară.

Transportul unei substanțe date prin membrana celulară constituie factorul hotărâtor care, alături de concentrația exterioară a substanței respective /57/, determină concentrația ei intracelulară. De asemenea, de acest fenomen sînt legate și unele mecanisme ale rezistenței intrinseci sau dobîndite ale celulei față de anumiți compuși.

În cazul antimetaboliților AF au fost sugerate trei tipuri de procese de transport și anume: transport activ¹⁾, difuzie pasivă²⁾ și difuzie facilitată³⁾.

În cele mai multe tipuri de celule tumorale, pentru MTX și AM a fost descris un transport activ, probabil similar celui al folaților

¹⁾ Transportul activ este definit drept transportul printr-o membrană celulară a unei substanțe în sens contrar gradientului ei de concentrație. Procesul decurge cu consum de energie, fiind sensibil la inhibitori energetici. Avînd loc prin intermediul unui purtător existent în membrană, el are un caracter competitiv față de substanțe înrudite structural.

²⁾ Transportul pasiv este procesul de transport ce se petrece conform legilor difuziei (legile lui Fick), ale osmozei (legea lui Van t Hoff) și ale echilibrului de membrană (Donnan), complicate cu fenomene de absorbție mai mult sau mai puțin specifice.

³⁾ Difuzia facilitată a fost propusă ca modalitate de transport în cazul leucocitelor umane.

naturali /58-76/.

În clasa antimetaboliților AF s-a constatat existența unei dependențe între viteza de transport și structura restului pteridinic din molecula lor /77/. De asemenea, grupările carboxilice din restul de acid glutamic par să joace un rol în acest proces /12,78,79/.

Cursul pătrunderii MTX în celule este puternic influențat de concentrația intracelulară și disponibilitatea DHFR, afinitatea enzimei pentru MTX fiind cu câteva ordine de mărime superioară celei a purtătorului /80/.

Un al doilea mod important de transport în cazul anumitor celule tumorale este difuzia pasivă. În aceste situații s-a constatat absența unui sistem de transport pentru antifolice /60,68,81,82/.

Deși diversitatea condițiilor experimentale nu permite stabilirea mecanismului de transport în fiecare caz în parte, sînt totuși posibile cîteva observații:

- viteza de transport a antagoniștilor AF variază în limite foarte largi, în funcție de tipul celular;
- citotoxicitatea antifolicelor poate fi corelată satisfăcător cu vitezele lor de influx.

Astfel, activitatea selectivă a unui antifolic față de un anumit tip de celule poate fi legată de un potențial superior concentrativ al acestora /73,83,84/.

În sfîrșit, trebuie arătat că se cunosc numeroși inhibitori ai transportului antagoniștilor AF, acțiunea lor fiind dependentă de foarte mulți factori (tipul celular, structura antagonistului, etc) /60,64,67,68,83,85-90/. Menționăm de asemenea, că s-au raportat și cîteva substanțe care stimulează pătrunderea MTX în limfociti umani dar acest proces nu se extinde și la alte tipuri de celule /91/.

2.3. Metabolizarea antagoniștilor acidului folic.

Este cunoscut faptul că în general medicamentele suferă in vivo reacții de detoxifiere. MTX face însă excepție, el fiind eliminat de

către or practic neschimbat prin urină și fecale /92/.

Modul în care se produce transformarea metabolică a antagoniștilor AF depinde în primul rând de specie, constatându-se mari diferențe între acestea. Astfel se pot cita următoarele transformări:

- 7-hidroxilarea /92-100/. MTX este transformat de către aldehyd-oxidaza de iepure și cobai în 7-hidroxi-MTX, compus având o capacitate de inhibare a DHFR mai redusă decât MTX. La iepure, la care această reacție se produce rapid și practic complet, toxicitatea antifolicelor devine neglijabilă.

- îndepărtarea amino acidului terminal sau atașarea de amino acizi suplimentari /98,101-104/. S-au identificat astfel enzime capabile să rupă restul de glutamat cu producerea derivatului pteric corespunzător. În ficatul de șobolan s-a observat transformarea parțială a MTX în poliglutarati de MTX, cu o permeabilitate redusă.

- acetilarea și formilarea /105-107/.

- dehalogenarea, observată în cazul 3'-I-AM în tiroidă, unde are loc eliberarea de iod /54/.

- ciclizarea restului de acid glutamic terminal la acid pirohidon carboxilic /108,109/.

2.4.Mecanismul de acțiune.

Proiectarea de medicamente anticanceroase pe baza cunoașterii mecanismului lor de acțiune reprezintă un caz ideal, care însă nu poate fi exploatat decât într-o mică măsură.

În cele ce urmează se va prezenta stadiul actual al cunoștințelor privind mecanismele de acțiune ale antagoniștilor AF.

2.4.1.Interacțiunea antagoniștilor AF cu diverse sisteme enzimaticе.

Inhibarea dihidrofolat reductazei (DHFR) .

Se pare că aceasta reprezintă principalul punct de atac al antagoniștilor AF /18,51,55,17,110-122/. Blocând DHFR, sinteza THF și

astfel a coenzimelor sale este serios afectată (și chiar oprită) ceea ce are drept consecință imediată depleția celor trei baze azotate ale acizilor nucleici (AN), oprirea biosintezei AN, încetinirea diviziunii celulare și în final moartea celulei.

MTX, AM și alți antimetaboliți ai AF sînt inhibitori puternici ai acestei enzime. De exemplu, AM este legată de LC⁵ ori mai puternic decît folatul de enzimă /16,51,123/. Această inhibiție nu este complet ireversibilă /16,51,53,79,116/, deoarece concentrații mari de substrat provoacă îndepărtarea antimetabolitului de pe enzimă. De asemenea, gradul de inhibiție a enzimei este dependent de pH și anume scade cu acesta, astfel încît la pH 7,6 inhibiția devine competitivă /49,85,124-126/.

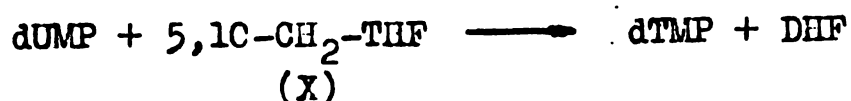
În general se admite că toxicitatea selectivă a antifolicelor față de un anumit tip de celule maligne depinde de capacitatea lor de blocare a DHFR /12,49,53,55,82,127-136/. Însăși protecția împotriva efectului letal al AM sau MTX obținută prin administrare prealabilă de AF (III) sau 5-CEC-TDF (VI, Citrovorum factor) constituie o dovadă în acest sens /49,137-139/. Totuși aprecierea efectului toxic și a celui terapeutic caracteristic antagoniștilor AF numai prin prisma inhibiției DHFR nu ține cont de o serie de date experimentale și anume:

- lipsa unei relații simple între toxicitate, răspunsul terapeutic și gradul de inhibiție a DHFR /110,135,140-142/;
- absența unei legături între inhibarea DHFR și creșterea anumitor tipuri de celule canceroase (HeLa)/143/;
- lipsa unei corelații între citotoxicitatea antagoniștilor AF și nivelul DHFR, în cazul celulelor rezistente /135,144,145/.

Aceste fapte sugerează drept importantă și inhibarea simultană sau mediată a altor sisteme enzimatiche.

Inhibarea timidilat sintetazei (TS).

Această enzimă catalizează următoarea reacție:



Inhibiția TS duce astfel (alături de inhibarea DHFR) la blocarea sintezei ADN, avînd în final un efect letal/49,111,140,141,146-152/.

Interacțiunea dintre MTX, timidin kinază (TK)
și alte enzime.

Blocarea de către MTX a DHFR poate fi compensată, cel puțin parțial, printr-o activitate crescută a TK /152-155/. Totuși datele de literatură privind interacțiunea MTX-TK sînt contradictorii indicînd fie o inhibare /156/, fie o stimulare /121,157/, fie o lipsă de efect /158/ asupra acestei enzime.

Dintre alte enzime afectate de MTX și AM menționăm: ornitin decarboxilaza /159/, enzimele formatoare de spermină și spermidină /159/, alcool-, glutamic- și glucozo-6-fosfat dehidrogenazele, catalaza /160-162/, etc.

Rezultă astfel, deși nu există unanimitate de păreri în această privință, că locul esențial de intervenție al antagoniștilor AF îl reprezintă cele două enzime cheie - DHFR și TS. Trebuie remarcat însă faptul că, în timp ce MTX și AM nu reușesc să discearnă între DHFR din diverse surse, unii antimetaboliți neclasici inhibă puternic DHFR bacteriană și slab pe cea de origine animală, alții producînd un efect contrar /163/. Această comportare trebuie legată de noțiunea de izoenzimă ¹⁾. Studiul comparativ al izoenzimelor DHFR din diverse surse a condus la evidențierea unor diferențe mergînd pînă la structura lor primară. Acest fapt l-a determinat pe Baker să afirme că izoenzimele DHFR trebuie să difere între ele prin regiunea adiacentă centrului activ (așa-numita "zonă hidrofobă")/11/.

¹⁾ Izoenzimele catalizează toate același tip de reacții, dar fiecare în parte prezintă specificitate de țesut sau de gen celular.

2.4.2. Inhibarea biosintezei acizilor nucleici.

Carența coenzimelor AF conduce, atât in vivo cât și in vitro, la blocarea sintezei AN /164/, observându-se în fazele inițiale o descreștere a biosintezei ADN, în timp ce sinteza de ARN și cea proteică nu sînt practic afectate /165-167/.

Intervenția antifolicelor are loc încă din etapa biosintezei de novo a bazelor purinice și pirimidinice. Astfel, administrarea MTX și AM produce inhibarea încorporării formiatului în purine și timină /168-171/, a CO₂ în purine /170/, precum și o întîrziere a încorporării glicinei în purine, timină și proteine /172/.

Datorită blocării sintezei de novo a purinelor și timinei, MTX și AM cresc încorporarea timidinei exogene în ADN /73,158,173-176/. Deoarece sinteza acidului timidilic joacă rolul de "trigger" pentru procesul de reduplicare celulară iar inhibarea ei de către AM se produce la concentrații foarte joase ale acestuia, ea este una dintre primele reacții blocate /177/, inhibiția sintezei ADN instalîndu-se rapid în urma afectării DHFR și TS /158/.

2.4.3. Influența antifolicelor asupra cineticii celulare.

Studiile privind efectul substanțelor anticancerose asupra cineticii proliferării celulare a unor tumori experimentale au contribuit pe de o parte la elaborarea unor scheme mai eficiente de tratament /178-181/, iar pe de altă parte la fundamentarea unor noi concepții în chimioterapia cancerului /182-184/. În cazul analogilor AF, acțiunea lor la acest nivel poate fi rezumată prin următoarele constatări:

- viteza reducerii numărului de celule tumorale în urma expunerii la MTX este mai mare în primele 24 h de la administrare, descrescînd în timp /185/;

- cinetica reducerii numărului de celule tumorale sub acțiunea agenților antineoplazici depinde de natura chimică a acestora /186/ iar sensibilitatea celulelor față de un anumit produs variază de-a

lungul unui ciclu celular ¹⁾.

S-a dovedit faptul că antifolicile acționează asupra celulelor în faza S /178,182,183,186-191/, în faza M /108,192-197/ și uneori (în cazul MTI) în faza G₂ /198/.

Trebuie reamintit că factorii care întârzie angajarea celulelor în ciclul celular le pot conferi protecție față de efectul antimetabolitelor /191,199/.

Cunoscând influența antifolicilor asupra diverselor faze ale ciclului celular s-a reușit îmbunătățirea substanțială a efectului acestora, prin elaborarea unor scheme de tratament ce țin cont de durata acestora și de sensibilitatea lor la produsele folosite.

2.5.Efectele secundare ale tratamentului cu antagoniști ai acidului folic.

Unii dintre antagoniștii AF, în special MTI și AM, au dat rezultate bune în tratamentul anumitor forme de cancer. Factorii principali care limitează totuși utilizarea lor clinică sunt:

- toxicitatea ridicată (ce limitează concentrația maximă de substanță ce poate fi administrată);
- rezistența primară și dobândită a unor tumori la acești compuși;
- caracterul tranzitoriu al remisunilor.

În cele ce urmează vor fi prezentate două dintre cele mai importante efecte secundare, toxicitatea și rezistența.

2.5.1.Toxicitatea.

Antagoniștii AF produc în general sindroame similare acelor datorate deficienței de AF, dar prezintă și manifestări toxice par-

¹⁾Ciclul celular reprezintă timpul între două mitoze și este împărțit în fazele G₁, S-sinteza ADN, G₂ și M-mitoză, divizată la rândul ei în profază, metafază, anafază și telofază.

ticulare /200/ și anume : depresia proliferării măduvii osoase /164,170,201-204/, leziuni grave ale mucoasei intestinale /205/, efecte morfologice și funcționale la nivelul rinichiului /206/, efecte teratogene și abortive /207,208/.

Citotoxicitatea in vivo a MTX este în general atribuită inhibiției sintezei timidilatului (fie direct /100/, fie indirect- ca consecință a inactivării DHFR /55/), ceea ce duce în final la blocarea sintezei AN /55/. Nu întotdeauna însă acest mecanism poate fi asociat citotoxicității. Astfel, în intestinul subțire al șoarecelui, doze mici de MTX nu provoacă leziuni observabile, deși sinteza ADN a fost inhibată rapid /133/. Pe de altă parte, inhibiția DHFR persistă 16 h după administrarea MTX cu toate că biosinteza ADN revine la 50% din activitatea inițială după numai 5 h de la injectarea acestuia /133/.

Trebuie menționat că CF (VI) /61,79,137,209-216/, ca și alte substanțe /154,189,217-225/, are proprietatea de a preveni și rever- sa competitiv toxicitatea MTX și AM prin suplinirea carenței de TEF și prin inhibarea pătrunderii MTX în celule.

2.5.2.Rezistența.

380-335
299 F

Rezistența la antifolice poate fi intrinsecă sau dobândită, ultima fiind mai importantă sub aspect clinic.

Mecanismele care explică rezistența la antifolice pot fi sumarizate în cadrul următoarelor categorii:

- modificarea (cantitativă și/sau calitativă) DHFR. În general, apariția rezistenței a fost asociată cu o activitate crescută a DHFR /49,113,215,226-242/, ca urmare a unui conținut mai bogat de enzimă /239,243/. O explicație a acestui fapt ar putea fi inducția de noi forme de DHFR (izoenzime) mai puțin susceptibile la MTX /144,227,235,244,245/. Celulele MTX rezistente cu o producție de DHFR crescută se caracterizează prin absența unui cromosom subtelocentric pe care este localizat un represor al producției DHFR, pier-

derea sa făcînd posibilă inducția unei sinteze crescute de enzimă /238,246,247/.

- transportul defectiv al antifolicelor prin membrana celulară /61,226/, fie prin reducerea permeabilității celulelor la antifolice /57,61,62,64,74,82,248-252/, fie prin alterarea proprietăților de legare a componentului purtător /60,68,74,253/.

- alte cauze, cum ar fi: alterarea antifolicului /254/, stimularea activității TK /153,154/, pierderea capacității de utilizare a purinelor preformate /191/, eliberarea unui factor ce leagă specific MTX /255/, existența unor celule mutant, intrinsec rezistente, care generează prin selecție o populație rezistentă de celule /49/.

2.6. Relații structură chimică-activitate biologică.

Cu toate progresele importante realizate în cunoașterea mecanismului de acțiune al antifolicelor, puțini compuși activi au fost realizați pe cale rațională. Modalitatea esențială de proiectare a antimetaboliților clasici ai AF o constituie și acum relațiile (calitative sau uneori semicantitative) între structura chimică și activitatea biologică.

Principiile generale ce guvernează schimbările structurale necesare transformării unui metabolit într-un antimetabolit pot fi rezumate astfel:

- elementele structurale implicate în legarea antimetabolit-enzimă trebuie păstrate ca atare sau modificate în sensul creșterii afinității antimetabolitului pentru aceasta;

- elementele structurale responsabile de funcționalitatea metabolitului vor fi modificate în sensul dorit (de exemplu în vederea realizării unei sinteze letale);

- proprietățile de transport ale moleculei trebuie păstrate pe cît posibil intacte sau îmbunătățite.

Proiectarea unor modificări structurale eficiente este dominată de conceptul de izosterie. Acesta postulează că activitatea bio-

logică a unei substanțe date poate fi modificată corespunzător prin înlocuirea în molecula acesteia a unui atom sau grupe de atomi echivalenți ca structură electronică, dar care modifică molecula atât sub aspect steric, cât și al reactivității ei chimice. Din cele cinci clase în care Bardos /256/ clasifică izosterii, cele mai importante pentru proiectarea antimetaboliților AF sînt clasa I-a (F, Cl, Br, I, OH, SH, NH₂, CH₃), a II-a (C, S, Se, Te, NH, CH₂) și a III-a (N, P, As, Sb, Bi, CH):

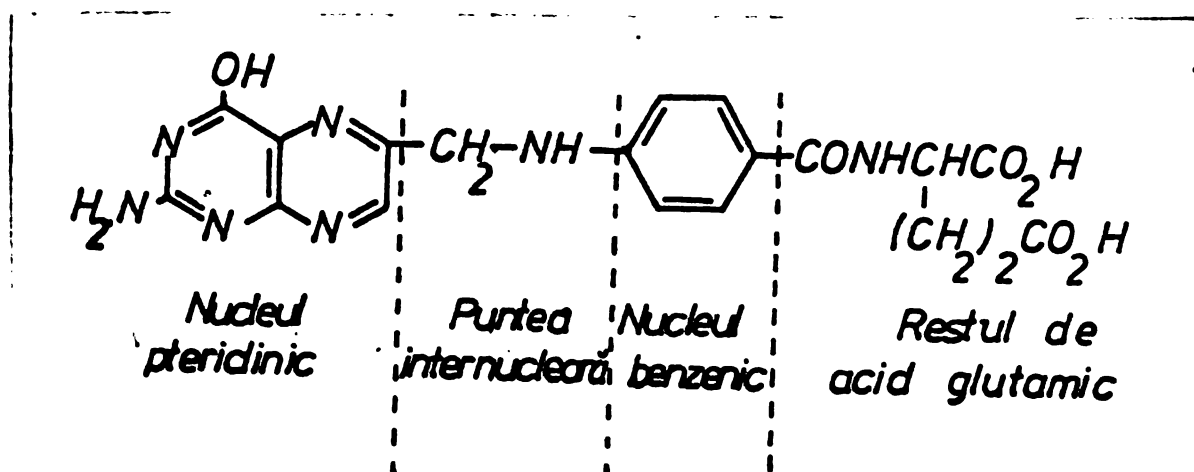
De o mare importanță în alegerea modificărilor izosterice potrivite, în vederea obținerii de antimetaboliți este și mărimea grupoi.

Un alt mod de variații structurale, util în realizarea unor antimetaboliți eficienți, constă în modificarea configurației sterice a metabolitului sau în rigidizarea uneia dintre conformațiile posibile ale acestuia.

În sfîrșit, studiul naturii legăturilor enzimă-substrat furnizează unele elemente în proiectarea antimetaboliților (în cazul inhibitorilor reversibili, legarea de enzimă se face prin legături ionice, de hidrogen, hidrofobe sau caracteristice complexelor de tip II)

Cele două grupuri de mărimi ce urmează a fi corelate se referă la structură (parametrii structurali sau fizico-chimici) și la activitatea biologică (parametrii biologici).

Parametrii structurali considerați în cazul antagoniștilor AF sînt configurația și conformația compușilor studiați. Pentru sistematizarea materialului existent, se va analiza fiecare porțiune a moleculei de metabolit (AF) astfel:



Parametrii fizico-chimici ce pot fi luați în considerare sînt constantele Hammett, Taft, constantele de bazicitate și aciditate, parametrii de lipofilicitate.

Parametrii biologici determinați sînt:

- in vitro, prin măsurarea inhibiției:

- unor sisteme enzimaticе, concomitent cu determinarea cineticii de inhibiție;
- creșterii unor microorganisme;
- creșterii culturilor de celule sau țesuturi;
- creșterii unor anumite tipuri de virusuri.

- in vivo, prin:

- determinarea toxicității (DL_{50});
- inhibiției creșterii unor tumori transplantate pe șoareci sau șobolani (Walker 256, L 1210, P 388).

Modificări structurale ale moleculei de AF.

Vor prezenta numai sumar rezultatele obținute în urma modificării nucleului pteridinic și benzenic și a punții dintre acestea, referindu-ne însă mai pe larg la amino acidul terminal.

Inlocuirea grupei 4-OH cu 4-NH₂ reprezintă principala modificare a AF care a condus la AM și ulterior la MTX, cu activitate antifolică extrem de promițătoare. Această schimbare afectează legarea substratului de DHFR, conducînd la un compus ce se combină pseudo-ireversibil cu enzima. Se sugerează că legătura antimetabolit-enzimă este de natură ionică /11,123,257-262/ sau prin legături de hidrogen /261,263-265/.

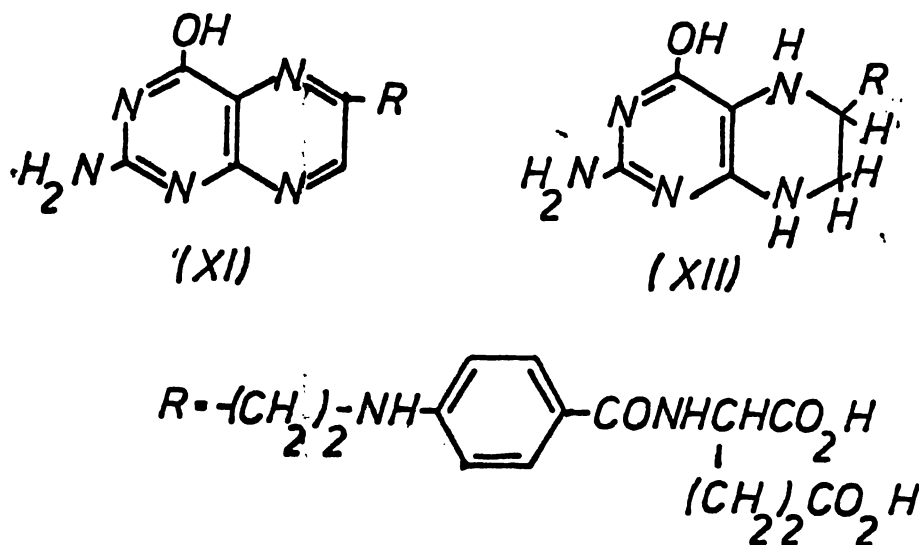
Deza analogii AF au permis stabilirea importanței relative a atomilor N¹, N³, N⁵ și N⁸. Dintre aceștia, doar N¹ pare important, restul putînd lipsi, unii compuși astfel rezultați fiind la fel sau chiar inhibitori mai puternici ai DHFR (5,8-dideza-analogii) decît MTX /11,131,266-274/.

Substituția la C⁷ a hidrogenului cu izosteri din clasa I-a

(CH,CH₃) a condus la compuși inactivi, ceea ce indică că această poziție trebuie să rămână liberă /275,276/.

Metilarea la N¹⁰ are un efect favorabil, MTX fiind mai puțin toxic și mai activ decât AM /277/.

Prin extinderea punții cu o grupă CH₂ (ca în acidul homofolic, HF, VI) au rezultat compuși activi biologic /278,279/. De fapt acidul tetrahidrohomofolic (THHF, XII) este compusul activ, fiind un



inhibitor al TS /280-282/. Pentru a fi eficace este necesară reducerea continuă a DHHF (și HF) de către DHFR, ceea ce nu poate fi asigurată decât în celulele MTX-rezistente, ce au nivele înalte de enzimă /283,284/.

Cea mai importantă modificare a nucleului benzenic o constituie substituția acestuia cu atomi de halogen (Cl și Br), în special în poziția 3. Toxicitatea scade considerabil și activitatea antileucemică crește, în special asupra formelor avansate /1,277, 284-292/.

Modificarea restului de acid glutamic (sau în unele cazuri a întregii porțiuni peptidice) ne interesează în mod deosebit, făcând de fapt obiectul lucrării de față. Sînt descrise următoarele transformări:

- esterificarea restului de acid glutamic. Această modificare

a fost făcută în ideea îmbunătățirii caracterului lipofilic al moleculei și o dată cu aceasta a proprietăților de transport (prin difuzie) prin membrana celulelor lipsite de purtător pentru antagoniștii AF /78,293-295/. Prin esterificarea grupărilor carboxilice ale restului de acid glutamic, transportul activ este sacrificat în favoarea difuziei pasive. Activitatea antitumorală a esterilor MTX este datorată, cel puțin parțial, hidrolizei lor la MTX /78/. Totuși, blocarea DHFR de către acești compuși nu poate fi atribuită exclusiv MTX liber, deoarece inhibarea acestei enzime nu este diminuată prin preincubarea esterilor MTX cu carboxipeptidaza G₁ (enzimă ce inactivează MTX, dar nu și esterii săi)/294/.

- înlocuirea restului de acid glutamic cu amine. În vederea îmbunătățirii transportului pasiv al MTX (fără afectarea restului pteridinic necesar legării de DHFR) s-au sintetizat o serie de astfel de compuși, dar aceștia nu prezintă o activitate semnificativă asupra L 1210 /78,293/.

- înlocuirea restului de acid glutamic cu alți amino acizi. Această modificare, efectuată asupra moleculei de AF /296-299/ și AM /290,291/, a condus la compuși puțin activi asupra L 1210, cu excepția acidului aspartic. Nici esterii analogilor AM și MTX /300/ cu alți amino acizi nu prezintă activități semnificative în sistemul mai sus menționat. Influența centrului asimetric (din restul de acid glutamic) a fost puțin studiată. Astfel, MTX cu acid D-glutaric este mai puțin activ ca MTX (cu acid L-glutaric) asupra L 1210 /301/.

- atașarea suplimentară de amino acizi reprezintă o modalitate de proiectare a compușilor cu activitate specifică, încă puțin exploatată. Numărul resturilor γ -glutamil servește ca factor specific al formării unor complexe enzimă-apoenzimă. De exemplu, pteroil-triglutaratul oprește creșterea unor tumori experimentale la șoarece, în timp ce monoglutamatul (AF) este inactiv /302/. Totuși

compuşii sintetizaţi pînă în prezent nu au prezentat activităţi semnificative, probabil şi datorită unui sistem de testare nepotrivit ales.

- legarea de macromolecule a condus la rezultate spectaculoase în unele cazuri. Astfel, cînd MTX a fost ataşat, prin intermediul grupărilor sale carboxilice, de o imunoglobulină, s-au atins supravieţuiri la şoarecii purtători de L 1210 de pînă la 75 zile (martorii netrataţi mor în 7-8 zile, cei trataţi cu MTX în cca. 18 zile iar cu simplul amestec MTX-immunoglobulină în 27 zile)/303/. Dacă cuplarea se face prin intermediul grupării 2-NH₂ (prin diazotarea MTX) se obţin rezultate mai slabe (10% supravieţuitori la 40 zile) /304/. Proprietăţile necitolitice dar citotoxice ale complexului MTX-anticorp pot fi explicate prin blocarea de către antinefrolit (fixat pe suprafaţa celulei împreună cu anticorpul) a sistemului de transport activ, aşezat favorabil pe suprafaţa celulară în raport cu antigenul /283/.

Activitatea acestor compuşii este mult dependentă de natura polimerului (dextrani, albumine, polipeptide sintetice)/305-307/. În general, activitatea lor este mai mică decît a MTX, dar prezintă avantajul că afectează mai puţin organele sensibile (măduvă, mucoase), putînd fi toleraţi mai bine decît concentraţii echivalente de MTX /305,308/.

Concluzii.

Se pot considera esenţiale pentru activitatea antineoplazică a antiretoliţilor AF următoarele elemente structurale:

- sistemul 2,4-diaminopirimidinic (eventual 2,4-diamino-piridinic) ce asigură legarea de enzimă. Atomii de hidrogen ai grupelor amino nu pot fi substituiţi.
- poziţia 7 de pe nucleul pteridinic să fie liberă.
- intercalarea între restul pteridinic şi centrul N¹⁰ al ca-

tenei laterale a încă unei grupe CH_2 conduce la un compus activ, în special asupra tumorilor cu un conținut ridicat de DHFR.

- activitatea în raport cu L 1210 este considerabil îmbunătățită prin substituirea nucleului benzenic cu atomi de halogen.

- Deleția sau înlocuirea acidului glutamic nu pare avantajoasă (cu excepția legării de anticorpi, dar mecanismul de acțiune se presupune a fi diferit).

Din cele expuse anterior rezultă stadiul cunoștințelor privind problema proiectării compușilor aparținând clasei antimetaboliților AF. Motivele care ne-au condus la sinteza unor compuși modificați în catena laterală vor fi expuse mai departe.

II. SINTEZA ANALOGILOR PTERIDINICI AI ACIDULUI FOLIC

În ultimii 25-30 de ani (în urma preparării acidului folic și a principalilor săi antagoniști, Methotrexatul și Aminopterina) o deosebită atenție a fost acordată metodelor de sinteză a analogilor structurali ai acestora. O serie de căi preparative a compușilor pteridinici aparținând categoriei antimetabolitilor "clasici" ai acidului folic au fost exploatate și puse la punct. O sistematizare a acestora în funcție de materialul de plecare este următoarea:

- de la pirimidine substituite (cu sau fără izolarea pteridinei intermediare);
- de la pirazine convenabil substituite;
- de la acidul pteric și analogii acestuia;
- de la acidul folic și analogii săi.

În sfârșit, mai trebuie menționate și procedeele de biosinteză (în cazul acidului folic), care diferă întrucâtva de cele menționate anterior.

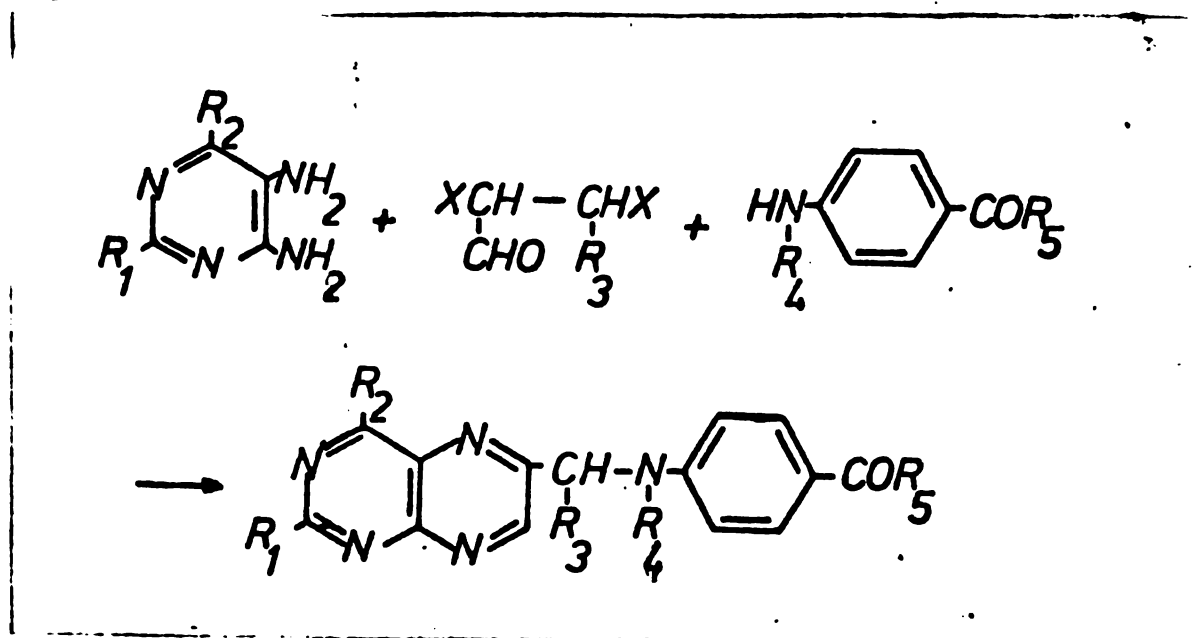
În cele ce urmează, aceste procedee vor fi examinate critic, în mod amănunțit.

1. Sinteza acidului folic și analogilor săi plecând de la derivați pirimidinici.

1.1. Fără izolarea pteridinei intermediare.

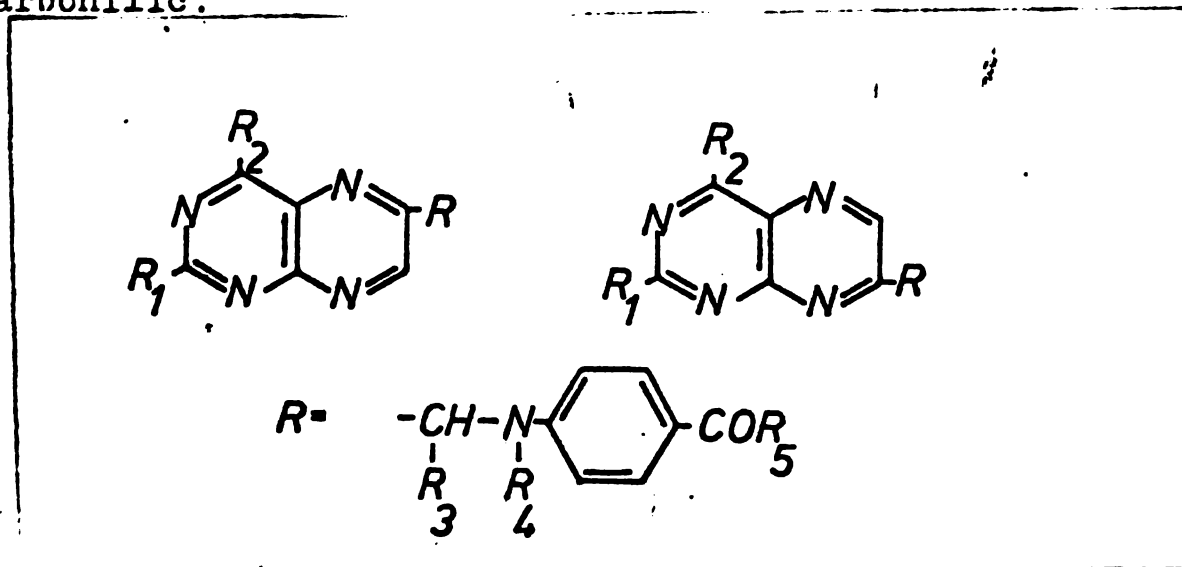
Acest procedeu reprezintă cea mai veche metodă de preparare a acidului folic și analogilor săi și constă în reacția între trei componente și anume: o 5,6-diaminopirimidină, un corp carbonilic (cel

puțin) trifuncțional și o peptidă conținând restul de acid 4-amino-benzoic. În tabelul de mai jos sînt redați unii dintre cei mai importanți compuși preparați pe această cale.



Compusul	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Referințe
Acid folic	NH ₂	OH	H	H	Glu	309-338
Acid pteroiic	NH ₂	OH	H	H	OH	309,321,339
Acid 10-CH ₃ -folic	NH ₂	OH	H	CH ₃	Glu	1,340,341
Acid 10-CH ₃ -pteroic	NH ₂	OH	H	CH ₃	OH	340
Acid 9-CH ₃ -folic	NH ₂	OH	CH ₃	H	Glu	1,342
Acid pteroil-aspartic	NH ₂	OH	H	H	Asp	200,296
Acid pteroil-poli-glutamic	NH ₂	OH	H	H	poli-Glu	343-345
Acid 9,10-dimetil-folic	NH ₂	OH	CH ₃	CH ₃	Glu	342
Acid oxifolic	OH	OH	H	H	Glu	323
Aminopterina	NH ₂	NH ₂	H	H	Glu	1,346-348
Acid 4-amino-pteroil-alanină, valină, sarcosină, aspartic	NH ₂	NH ₂	H	H	Ala, Val Sar, Asp	299,347
Acid 4-amino-pteroic	NH ₂	NH ₂	H	H	OH	347
Methotrexat	NH ₂	NH ₂	H	CH ₃	Glu	1,348-351
Acid 4-amino-10-CH ₃ -pteroic	NH ₂	NH ₂	H	CH ₃	OH	1,352
Acid 4-amino-10-CH ₃ -pteroil-D-glutamic, lizină, glutaric	NH ₂	NH ₂	H	CH ₃	D-Glu, Lys Glutaric	301
9-Metil-methotrexat	NH ₂	NH ₂	CH ₃	CH ₃	Glu	200,342

Această cale de sinteză prezintă dezavantajul posibilității de apariție simultană a izomerilor de poziție (6- și 7-substituiți pe nucleul pteridinic), așa cum era de altfel cunoscut în cazul pteridinelor simple preparate prin reacția Isay /314,316,317,327,353-355/. Factorii ce guvernează proporția dintre izomeri sînt multipli și țin în special de condițiile de reacție (pH) și de natura reactantului carbonilic.



Compuși carbonilici cei mai des folosiți au fost:

- 2,3-dibrompropionaldehida ca atare, sub formă de combinație bisulfitică sau de acetal /1,296,299,301,309,310,314,315,317-325, 339-341,343-345,347,349,355-358/;
- 1,3-dicloro- și dibromoacetona /331,332/;
- 1,1,3-tricloro- și tribromoacetona /329,342,348,351/;
- bromcloracetone /316,328,333,359/;
- acetonă tetra- și pentahalogenată /330,359/;
- reductona /311,312,326/, 2,3-epoxipropanal /338,360/, etc.

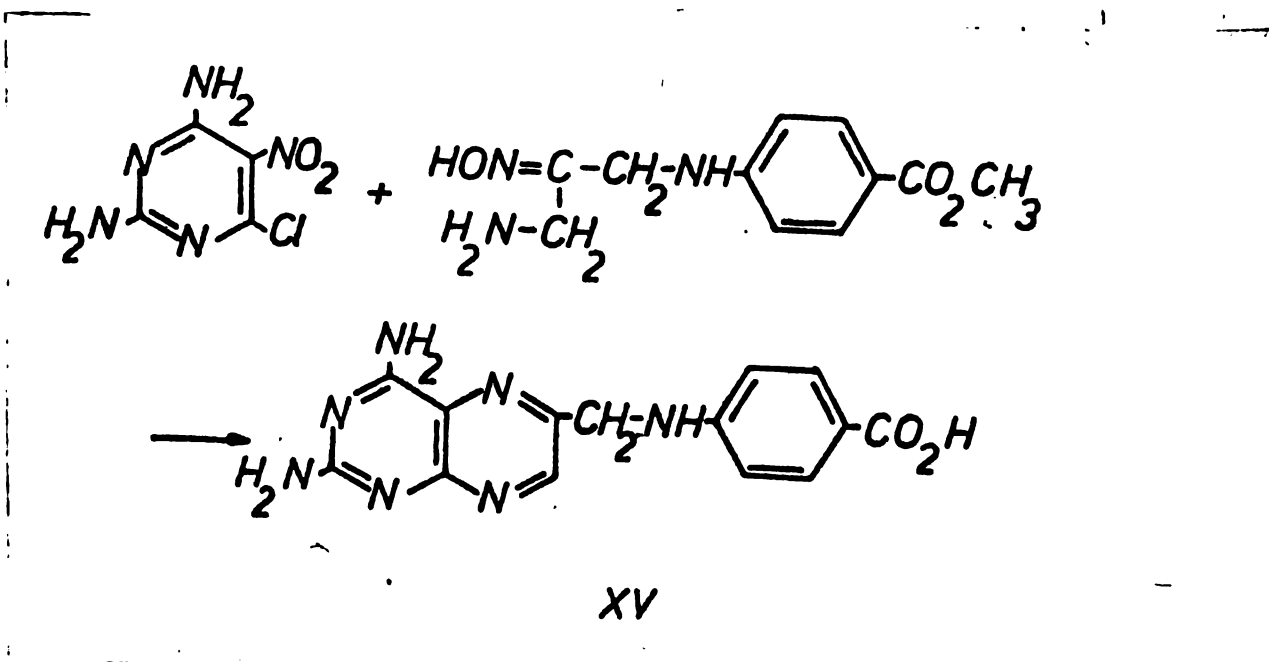
Prima metodă de sinteză a Aminopterinei și Methotrexatului, elaborată de Seeger și colab. /1,346/ s-a bazat pe utilizarea 2,3-dibrompropionaldehidei, dar randamentele în produs final erau extrem de scăzute (sub 2%). Trebuie menționat că acest procedeu conduce exclusiv la formarea izomerului 6-substituit. Printre produșii ce impurifică produsul brut de reacție s-au identificat 2-amino-4-hidroxi-6-metil- și hidroximetil-pteridinele.

Folosirea 1,1,3-tribromo- /350/ și tricloro-acetonei/348,351/

drept componente carbonilice a fost sugerată în vederea creșterii randamentului în produs final dorit. Astfel, Berezovskii și colab. /348/ comunică obținerea unui randament global de 32% la sinteza Methotrexatului utilizând 1,1,3-tricloroacetona. Valoarea metodei, așa cum am demonstrat în lucrarea de față, este îndoielnică deoarece, în condițiile descrise de autori, alături de produsul dorit (6-MTX) se formează în cantitate apreciabilă și izomerul de poziție al acestuia (7-MTX), amestecul lor fiind practic imposibil de separat. Această observație este confirmată de altfel și de faptul că prin utilizarea 1,1,3-tribromoacetonei marcate în sinteza acidului folic, rezultă un amestec de izomeri 6 și 7 ai acestuia /314,317,327/

În sfârșit, trebuie remarcat faptul că prin reacția cu 2,3-dibromopropanal rezultă într-o primă etapă 7,8-dihidro-derivatul corespunzător. Dehidrogenarea acestuia se realizează în general cu iod-iodură de potasiu /301,309,340,358/ dar s-au indicat și alți agenți: acetatul de mercur /318,357/, fericianura de potasiu, bromatul de potasiu, apa oxigenată, bicromatul de potasiu, cloratul de potasiu, bioxidul de seleniu /315,319,320/.

O altă variantă, utilizată mai ales în sinteza acidului 4-amino-pterinic, o constituie reacția între 2,4-diamino-6-clor-5-nitro-piridină și p[1-amino-2-hidroxiimino-propil(3)]aminobenzoat de metil /361,362/.

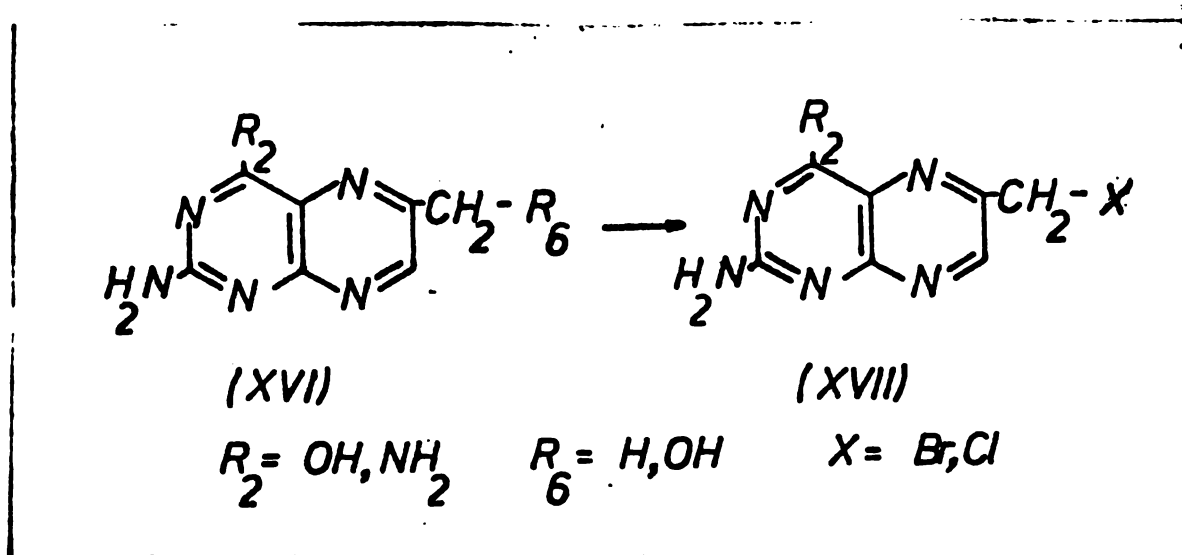


Purificarea amestecului brut rezultat din reacția de sinteză a acidului folic și analogilor săi merită o mențiune specială, deoarece reprezintă o operație deosebit de dificilă și laborioasă, dată fiind atât complexitatea amestecului, cât și conținutul extrem de scăzut de produs dorit în acesta. Purificarea constă în aplicarea succesivă (și/sau repetată) a unor procedee fizice sau chimice, și anume: 1) schimbări repetate de pH (dizolvare în apă la pH 11-12, filtrare, coborîrea pH-ului soluției la 7,0, refiltrare, precipitarea produsului final, parțial purificat la pH 3-4 și apoi reluarea întregului proces) /299,309-311,343-346,363/; 2) transformarea în clorhidrat cu acid clorhidric 6 N, urmat de diluarea soluției până la o concentrație la care produsul se separă (1 N) /363-367/; 3) recristalizarea produsului ca sare de calciu, bariu, magneziu sau zinc (numai când solubilitatea joasă a acestuia permite, ca în cazul acidului folic sau Aminopterinei) /368-376/; 4) recristalizarea sării de ciclohexilamină din butanol-apă /342/; 5) treceri pe coloane cromatografice de celuloză /348/, DEAE-celuloză /377-379/, TEAE-celuloză /379/, celuloză și cărbune /348/, celită /380/, Dowex 1X8 /381, 382/, Sephadex /383/, etc. Cel mai eficace procedeu rămîne însă cromatografierea pe coloane.

1.2. Cu izolarea unui intermediar pteridinic.

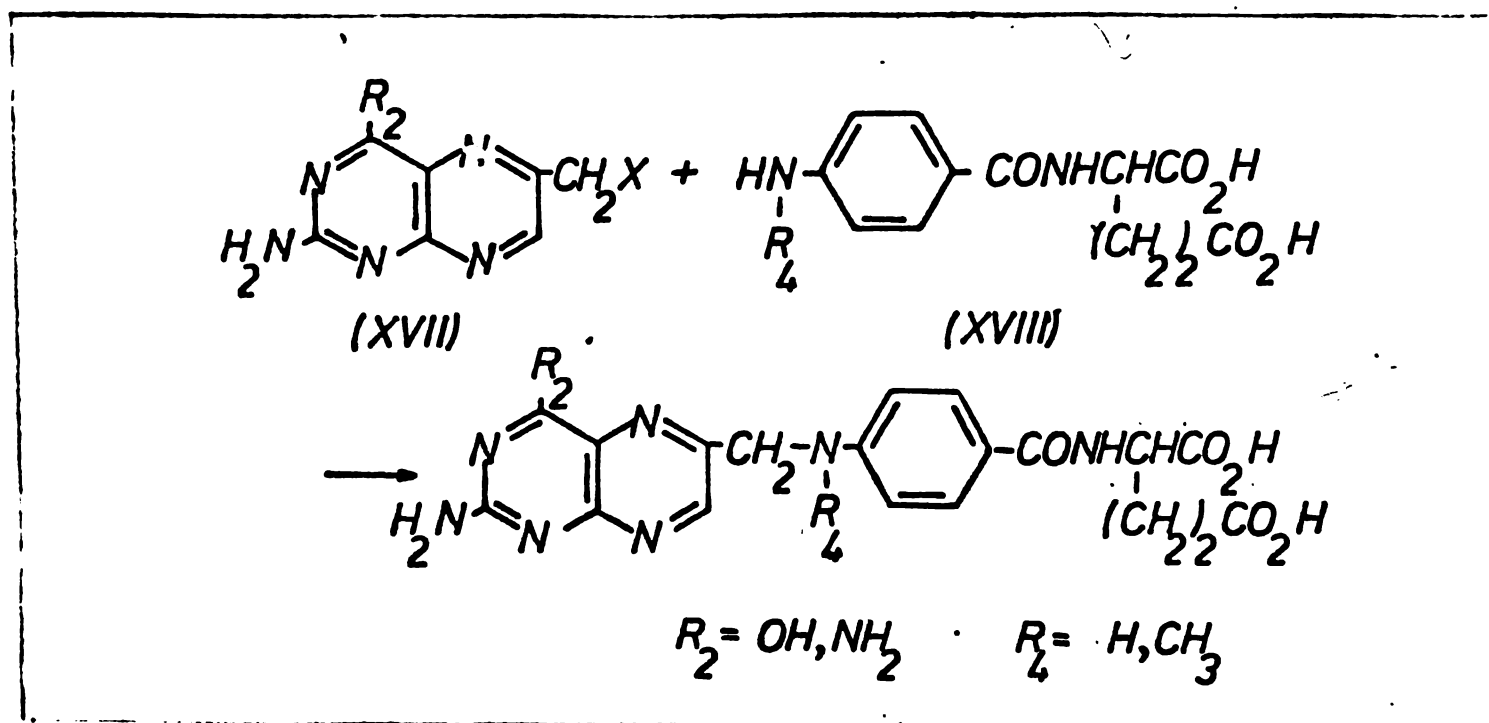
Pentru ridicarea randamentului global al reacției, prin micșorarea numărului de produși secundari rezultați, precum și în vederea obținerii unui produs izomeric pur, s-a încercat prepararea 6-halometil-pteridinei, ca intermediar cheie în această clasă de compuși.

Prepararea 2-amino-4-hidroxi- și 2,4-diamino-6-bromometil-pteridinei a fost realizată pe două căi: a) prin bromurarea 6-metil-pteridinelor corespunzătoare cu brom /384-390/, cu amestec de brom și acid bromhidric /384,391/ sau cu N-bromsuccinimidă /392,393/ și b) prin tratarea 2,4-diamino-6-hidroximetil-pteridinei cu Ph_3PBr_2 /394/.



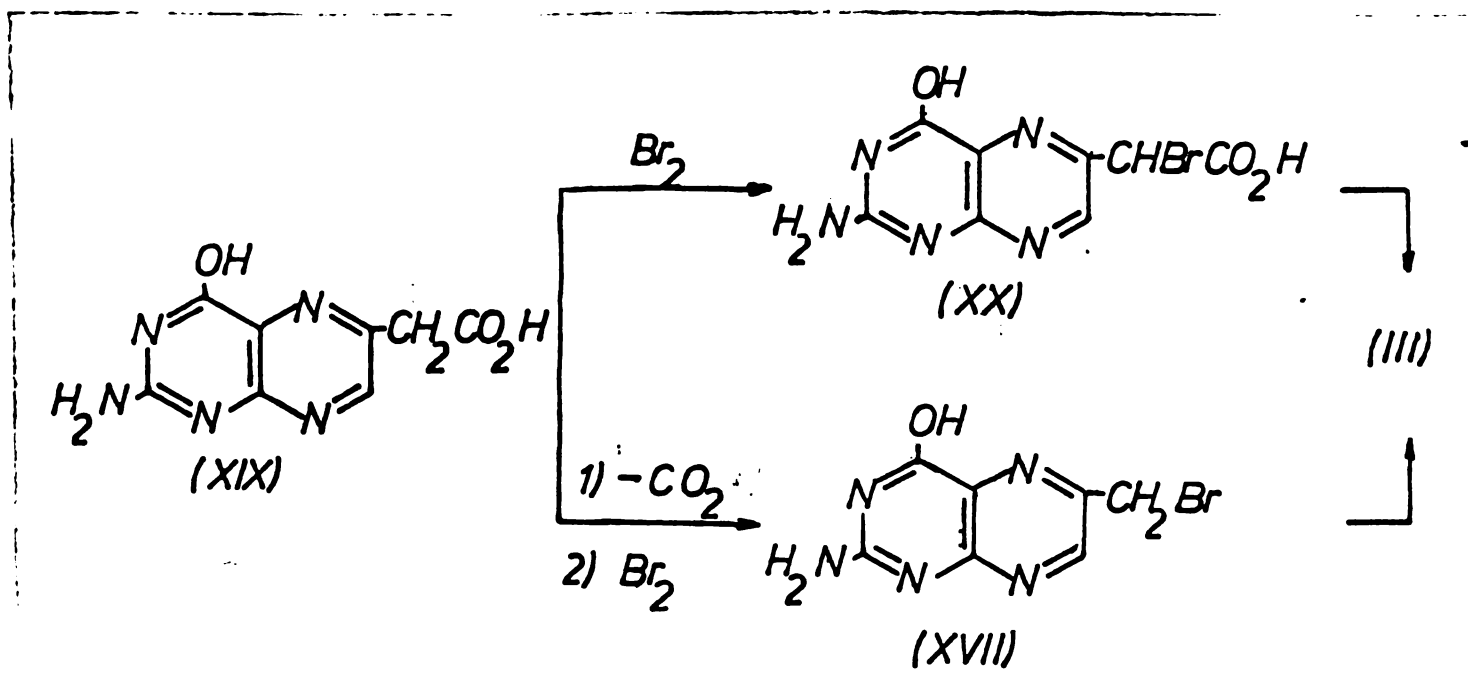
La rândul său, prepararea 6-clorometil-pteridinei s-a realizat prin: a) clorurarea 6-metil-pteridinei corespunzătoare cu clorură de sulfuril /384,388,394/ și b) clorurarea 6-hidroximetil-pteridinei cu clorură de tionil în prezența piridinei /395,396/.

A doua etapă constă în cuplarea halometil-pteridinei cu peptida corespunzătoare:

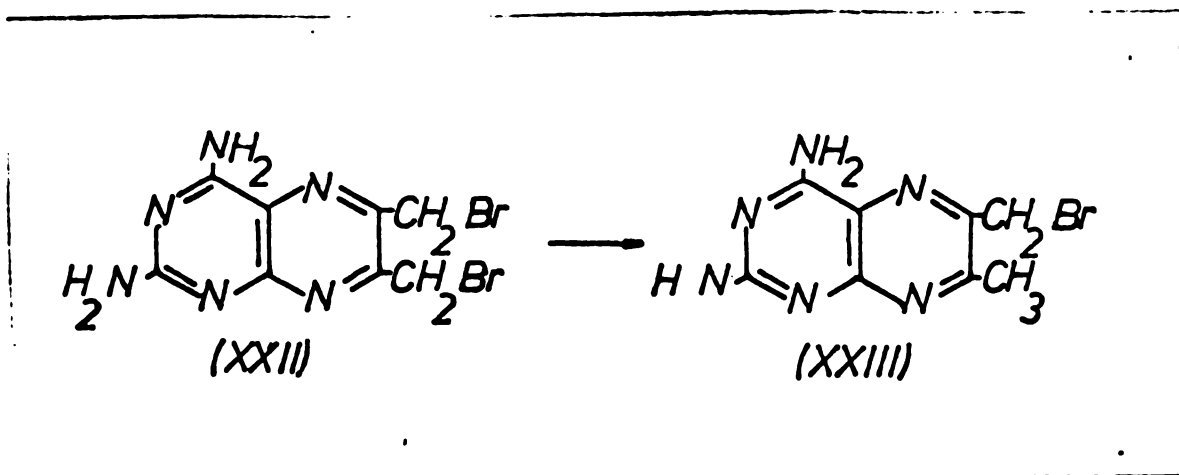


O variantă interesantă o reprezintă reacția directă între acidul 2-amino-4-hidroxi-pteridinil-6-bromacetic /397,398/ și peptida corespunzătoare sau prin decarboxilarea acidului 2-amino-4-hidroxi-pteridinil-6-acetic la 2-amino-4-hidroxi-6-metil-pteridină și transformarea acestuia din urmă în brom-derivat /390,399/:

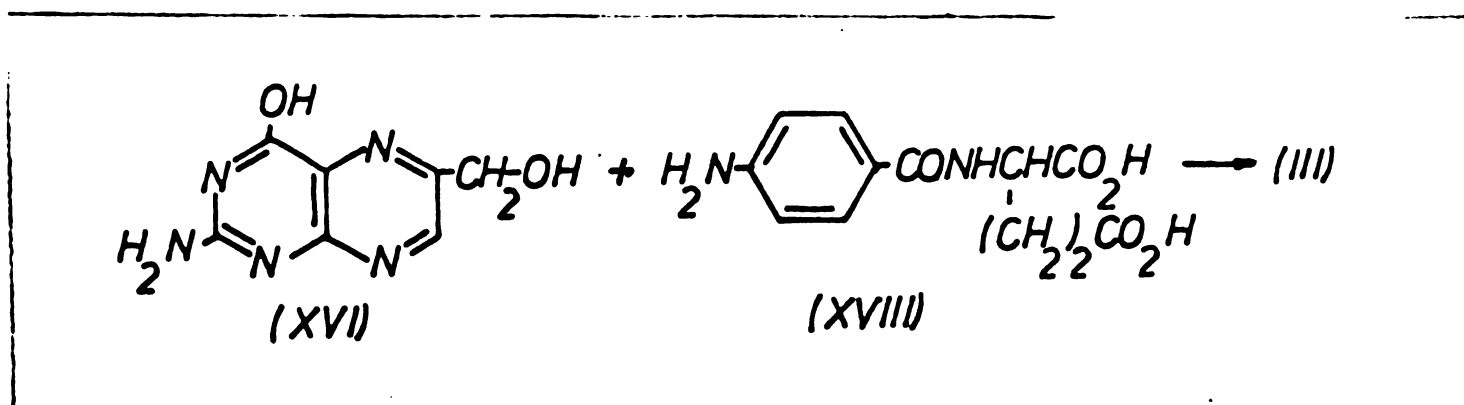
Mai se menționează și reducerea selectivă a 2,4-diamino-6,7-di-



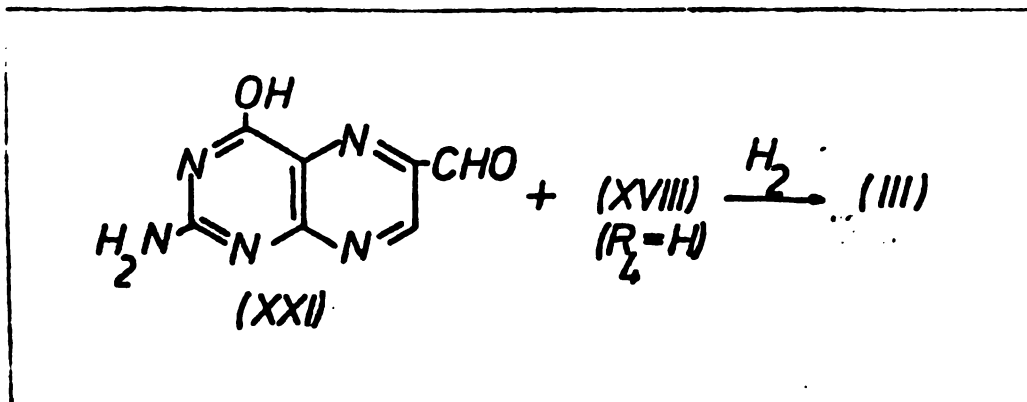
bromometil-pteridinci /275,400/, dar structura derivațiilor rezultați în urma cuplării cu peptida respectivă este discutabilă /276/.



De notat că în cazul derivațiilor de acid folic este posibilă chiar o cuplare directă a 2-amino-4-hidroxi-6-hidroxometil-pteridinci cu peptida în vederea obținerii produșilor corespunzători /401-406/. Reacția are loc în vid, la temperatură înaltă, în prezența clorurii de zinc.

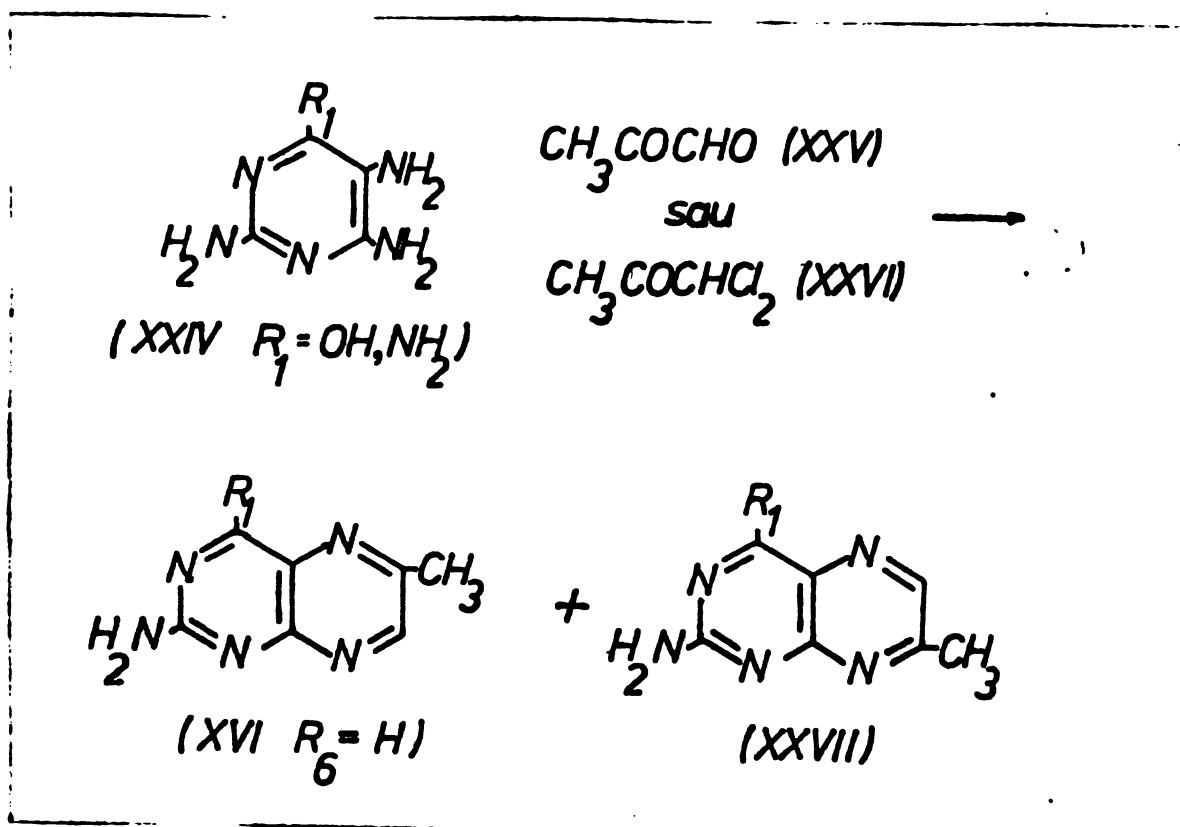


Trebuie de asemenea menționată și prepararea acidului folic și analogilor săi nesubstituiți la N¹⁰ prin cuplarea reductivă a 2-amino-4-hidroxi-pteridininil-6-metanalului cu acid N-(4-aminobenzoil)-glutamic /406-416/.

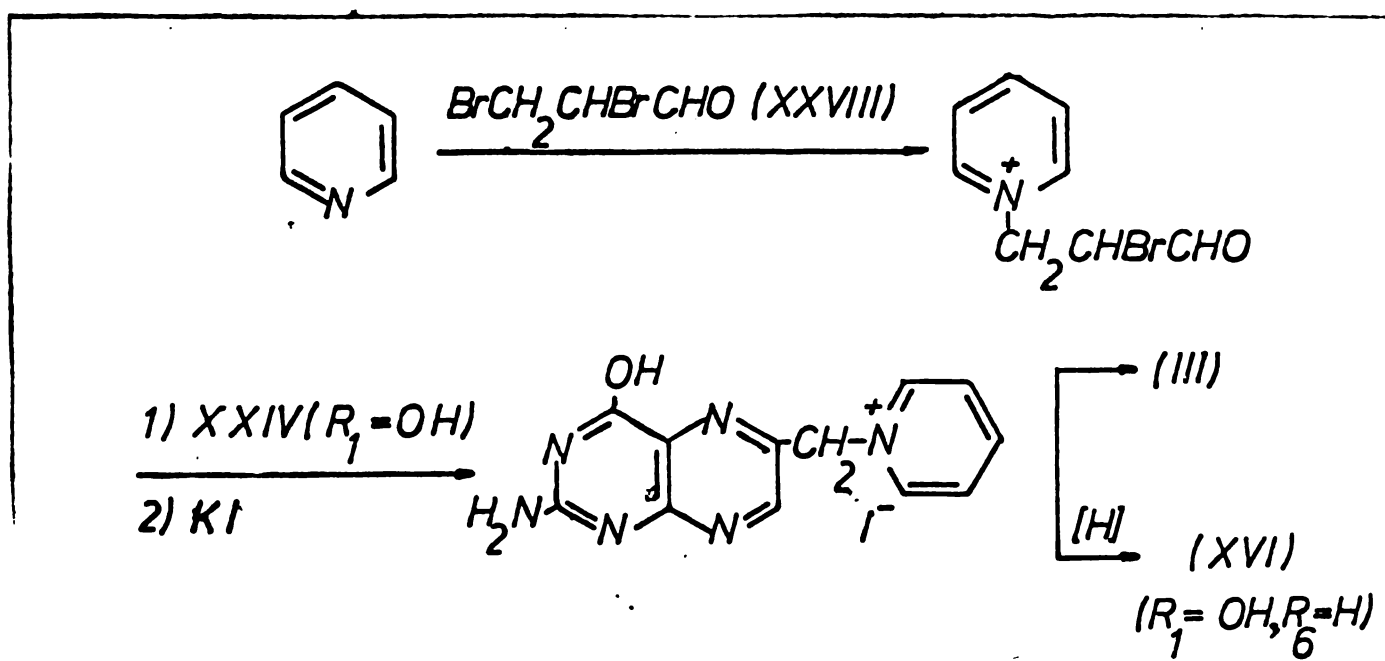


În ceea ce privește compușii pteridinici ce servesc ca materii prime, aceștia trebuie să fie izomeric puri. Privită sub acest aspect, prepararea lor va fi succint comentată.

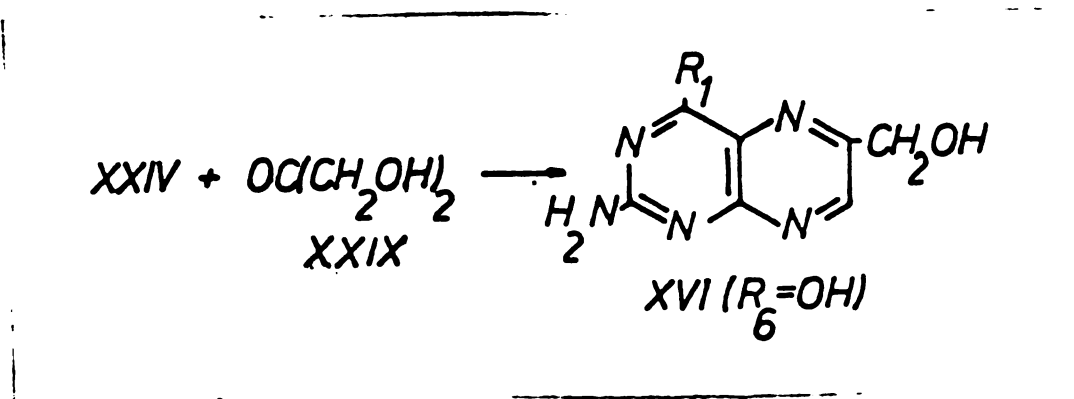
Sinteza 2,4-diamino- (sau 2-amino-4-hidroxi) metil-pteridinei se realizează prin condensarea 2,4,5,6-tetraaminopirimidinei (respectiv a 2,4,5-triamino-6-hidroxi-pirimidinei) cu metilgloxal sau 1,1-dicloracetonă /316,355/. Din reacție rezultă un amestec de 6- și 7-metil-pteridine care poate să fie separat în cei doi compuși prin purificări chimice obișnuite /353,384/.



O metodă interesantă, deoarece se pare că duce exclusiv la obținerea izomerului 6, constă în reacția 2,3-dibrompropionaldehidei cu piridină, urmat de ciclizarea cu 2,4,5-triamino-6-hidroxi-pirimidină la bromură de N[(2-amino-4-hidroxi-pteridinil-6)metil]piridiniu /310,384/. Acesta din urmă poate fi convertit direct la acid folic prin tratare cu acid N-(4-aminobenzoil)-glutamic sau la 6-metil-pteridina corespunzătoare prin reducere cu zinc și hidroxid de sodiu (prin intermediul dihidroderivatului respectiv).



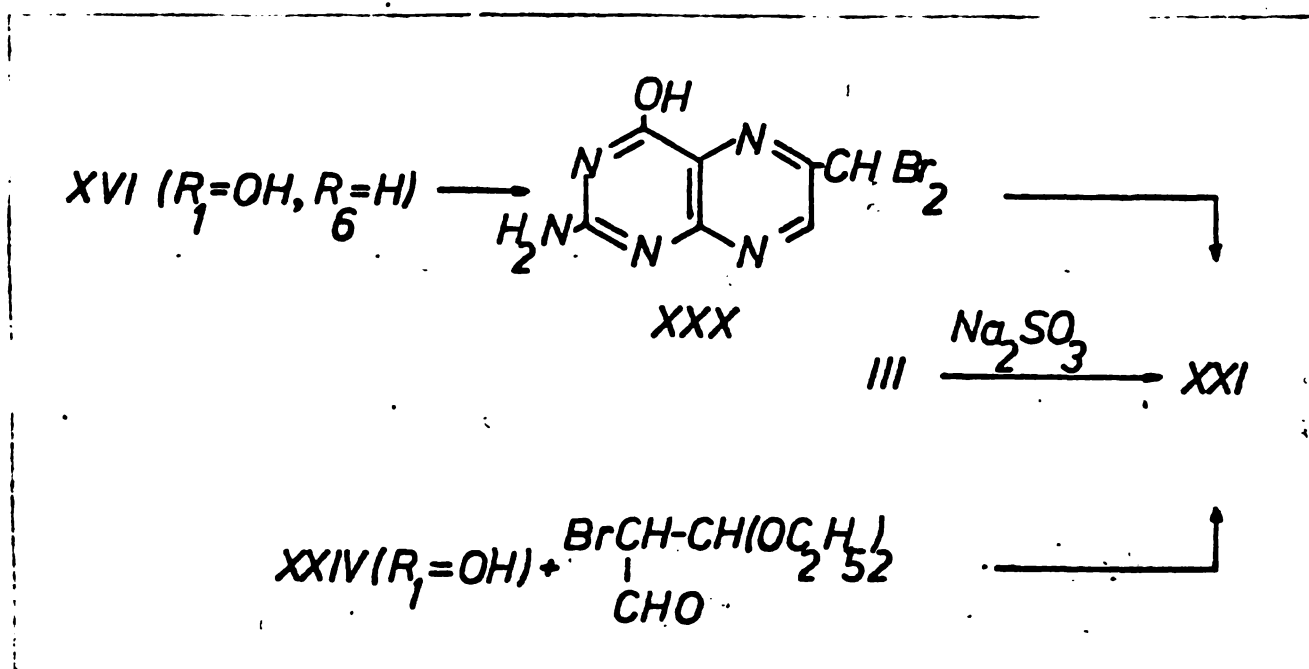
2-Amino-4-hidroxi-(sau 2,4-diamino-)-6-hidroxi-metil-pteridina se prepară din 2,4,5-triamino-6-hidroxi- /395,396,417,418/ sau 2,4,5,6-tetraamino-pirimidină /419/ și 1,3-dihidroxiacetonă. În anumite condiții de pH și temperatură se obține exclusiv izomerul 6, dar produsul final este de obicei impurificat cu cantități însemnate de 6-metil-pteridină. De altfel, unii autori nu au reușit să obțină pe această cale decât 6-metil-pteridină /354,420/. Pentru formarea exclusivă a izomerului 6 s-a recomandat folosirea hidrazinei /417/, acidului boric /418/, etc. Trebuie menționat că în anumite



-condiții de lucru, reacția conduce exclusiv la 7-hidroxometil-pteridină /354,421/. Înlocuirea 1,3-dihidroxiacetonei cu 2,3-dibrompropionaldehida poate duce de asemenea la 6-hidroximetil-pteridină /421/. În fine, 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetil-pteridina se obține și din 2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidină și dibromacetonilftalimidă /402/.

Sinteza 2-amino-4-hidroxi-pteridinil-6-metanalului poate fi realizată prin:

- dibromurarea 6-metil-pteridinei și hidroliza 6-dibromometil-derivatului respectiv /422,423/;
- tratarea acidului folic cu sulfat de sodiu /423/ sau brom /424/;
- condensarea 2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidinăi cu 2-brom-3-dietoxi-propanal /425,426/.

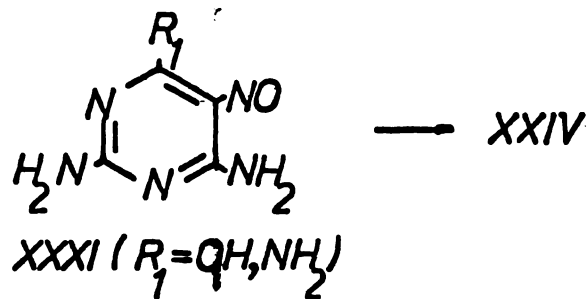


1.3. Sinteza intermediarilor.

1.3.1. Sinteza intermediarilor pirimidinici.

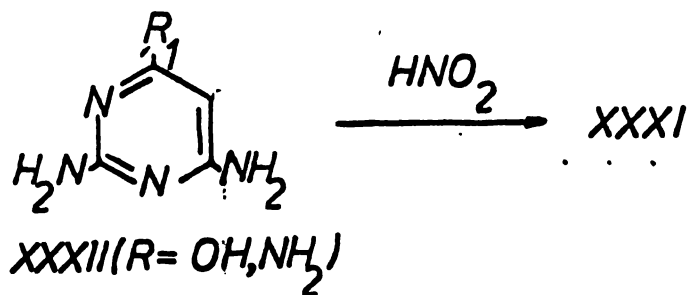
În sinteza analogilor pteridinici ai acidului folic sînt esențiali doi intermediari pirimidinici: 2,4,5,6-tetraaminopirimidina /427/ și 2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidina. Compușii se prepară prin reducerea 5-nitrozo-pirimidinelor corespunzătoare cu ditionit

de sodiu /428,429/, metabisulfid de sodiu /430/, sulfură de amoniu /431-433/ sau catalitic /434/. In general însă, randamentul acestei reacții este variabil și nereproductibil.

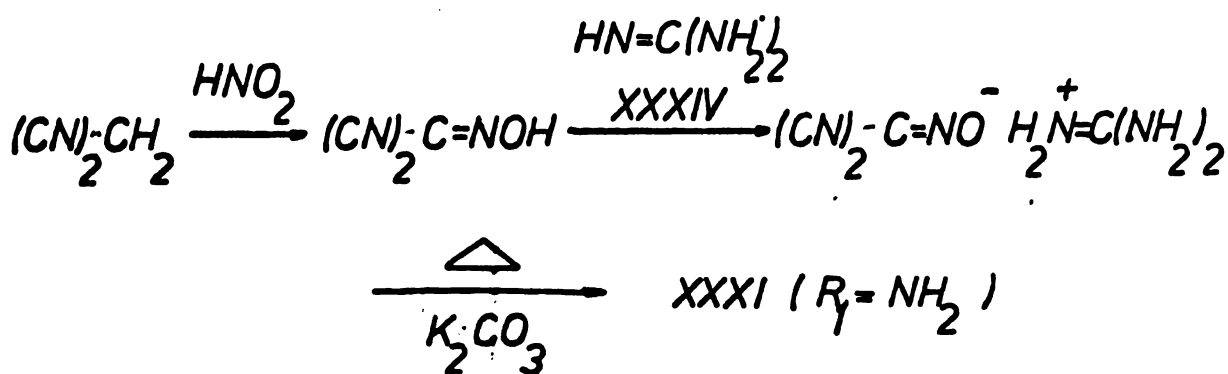


La rândul lor, 2,4,6-triamino- sau 2,4-diamino-6-hidroxi-5-nitrozopirimidinele pot fi obținute:

- prin tratarea cu acid azotos a 2,4,6-triamino- sau 2,4-diamino-6-hidroxi-pirimidinelor /429,432,433/:



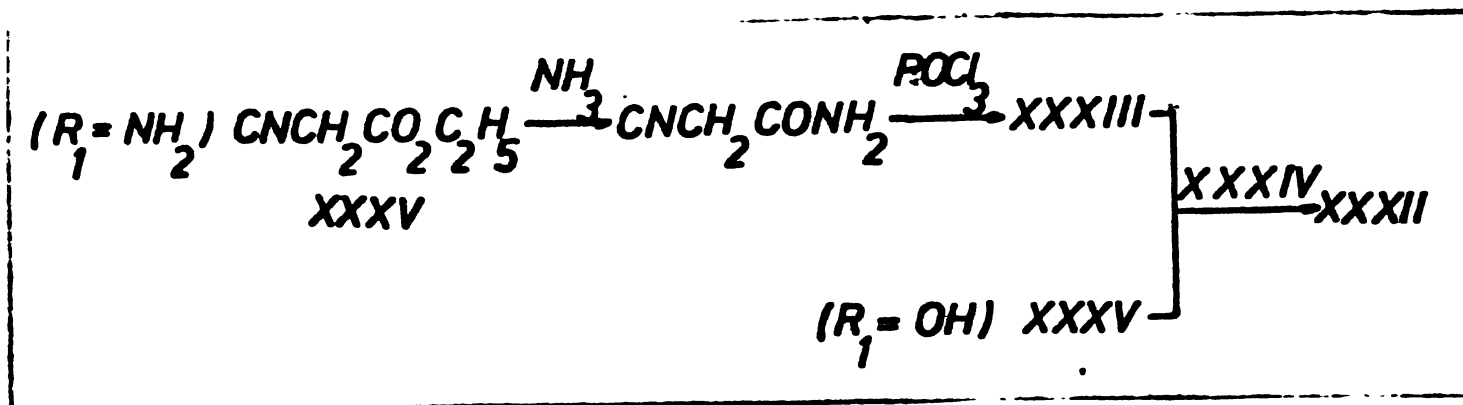
- prin condensarea izonitrozomalondinitrilului cu carbonat de guanidină /436/, ce duce direct la 2,4,6-triamino-5-nitrozopirimidină:



Acest din urmă procedeu reprezintă de fapt o simplificare a unui mai vechi, în care izonitrozomalondinitrilul era separat ca sare de argint, apoi transformat în sare de potasiu, înainte de reacția cu guanidina /437,438/.

2,4,6-Triamino- și 2,4-diamino-6-hidroxi-pirimidinele de ple-

care au fost obținute conform următoarei secvențe de reacții:

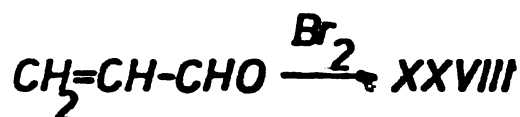


Pentru sinteza 2,4-diamino-6-hidroxi-pirimidinei se condensează cianacetatul de etil cu guanidină în mediu alcalin (EtONa)/432/, în timp ce pentru sinteza 2,4,6-triaminopirimidinei se utilizează valonodinitrilul în locul cianacetatului de etil, în aceleași condiții. Valonodinitrilul se prepară corod din cianacetamidă /439/ prin eliminare de apă cu oxiclорură de fosfor /440-443/ sau pentaclorură de fosfor /441,444,445/.

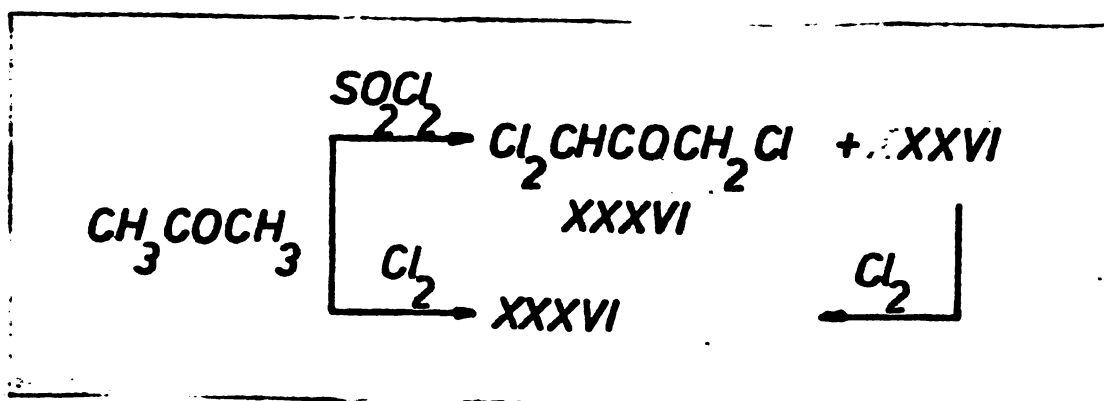
1.3.2. Sinteza componentei carbonilice.

Se va discuta pe scurt sinteza componentelor carbonilice cel mai des folosite și anume a 2,3-dibrompropionaldehidei și 1,1,3-tricloracetonei.

- 2,3-Dibrompropionaldehida se obține prin bromurarea acroleinei cu brom în sulfură de carbon /446-448/, tetraclorură de carbon /449/ sau dioxan /450/ și se purifică prin distilare:



- 1,1,3-Tricloracetona se prepară fie prin clorurarea acetonei

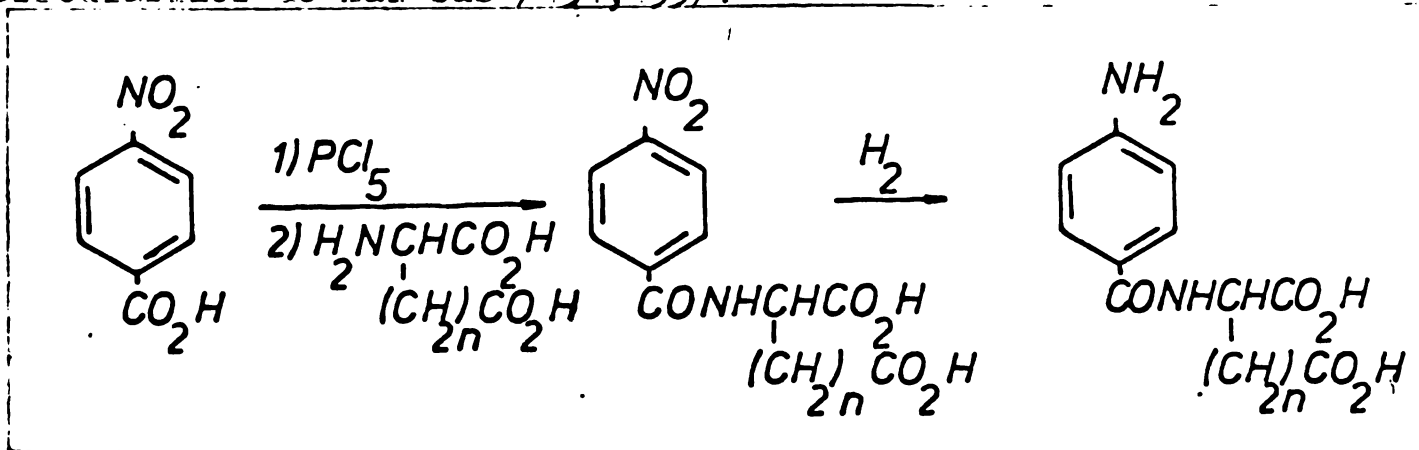


cu clorură de sulfuril /451/ (cînd rezultă doar 20% 1,1,3-triclor-acetonă, restul fiind practic 1,1-dicloracetone), fie prin clorurarea acetonei /451/ sau 1,1-dicloracetonei /452/cu clor.

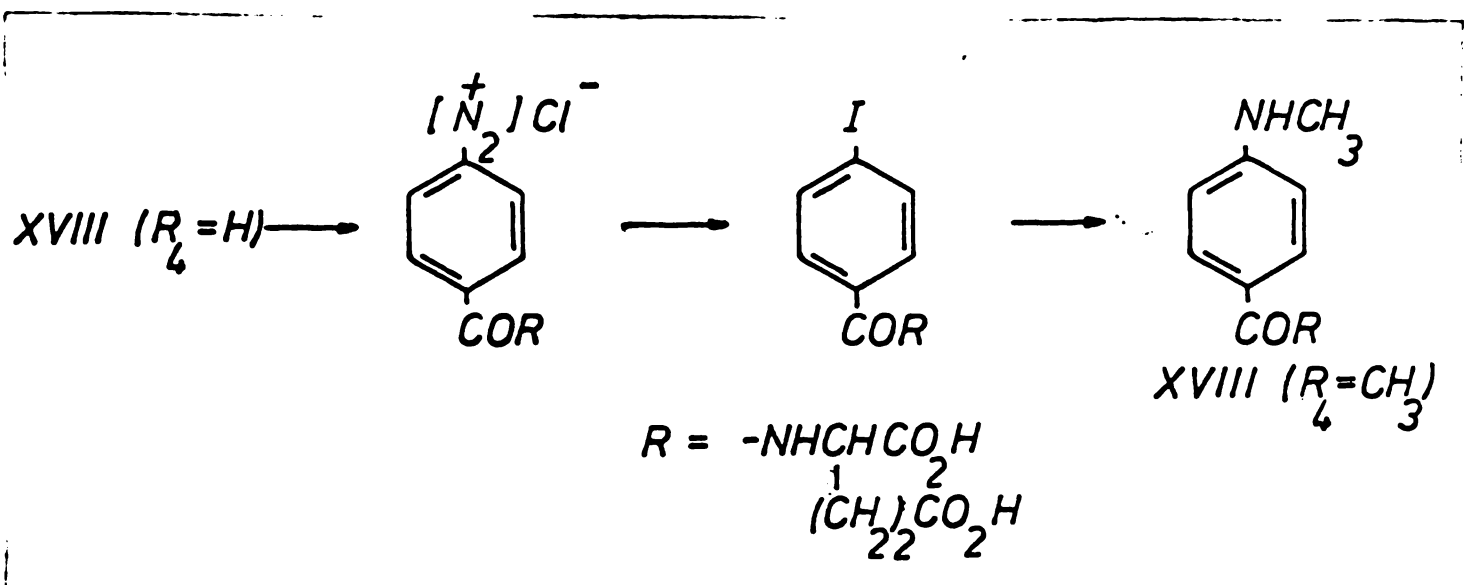
1.3.3. Sinteza componentei peptidice.

Catena laterală peptidică a acestei categorii de compuși este formată de obicei din acid N[4-(metilamino)benzoil]glutamic (aspartic). Sinteza acestuia poate fi realizată conform mai multor variante și anume:

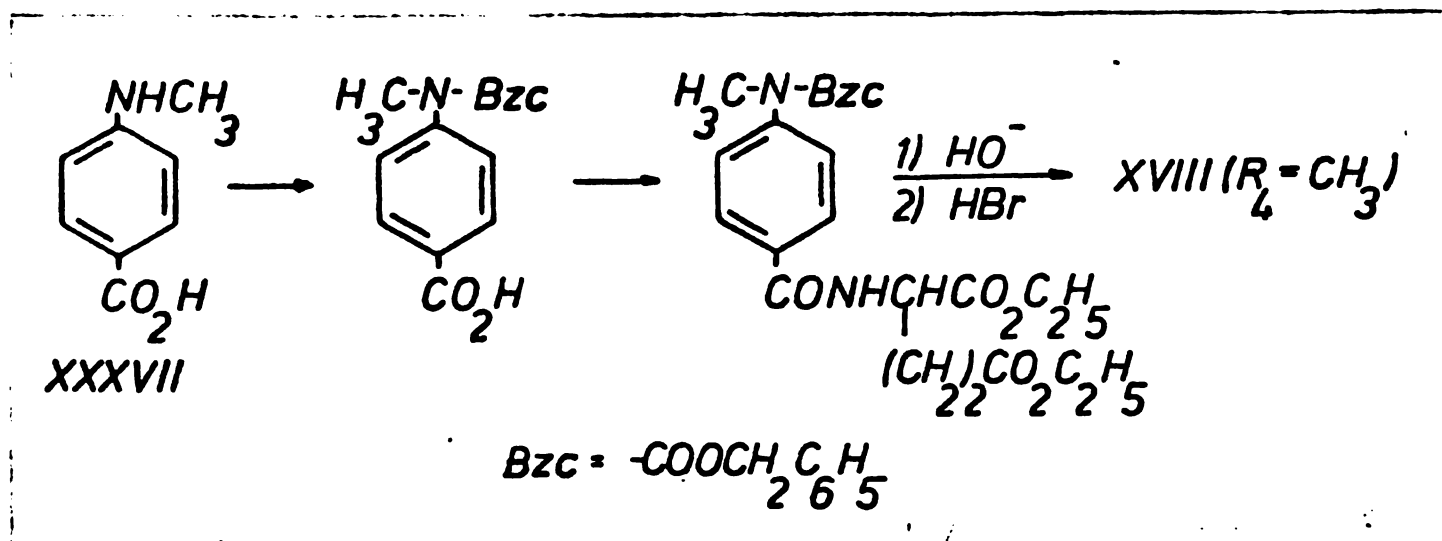
- cuplarea, prin metoda Schotten-Baumann a clorurii de 4-nitrobenzoil (preparată din acid 4-nitrobenzoic și PCl_5) cu acid glutamic (aspartic) /340,453-455/. Acidul 4-aminobenzoil-glutaric (aspartic) rezultă apoi prin reducerea catalitică sau cu hidrogen sulfurat a intermediarilor de mai sus /454,455/:



Diazotarea acidului N-(4-aminobenzoil)-glutamic, urmată de transformarea sa în acid 4-iod-benzoil-glutamic și reacția cu metilamină, permite obținerea acidului N[4-(metilamino)benzoil]-glutamic.

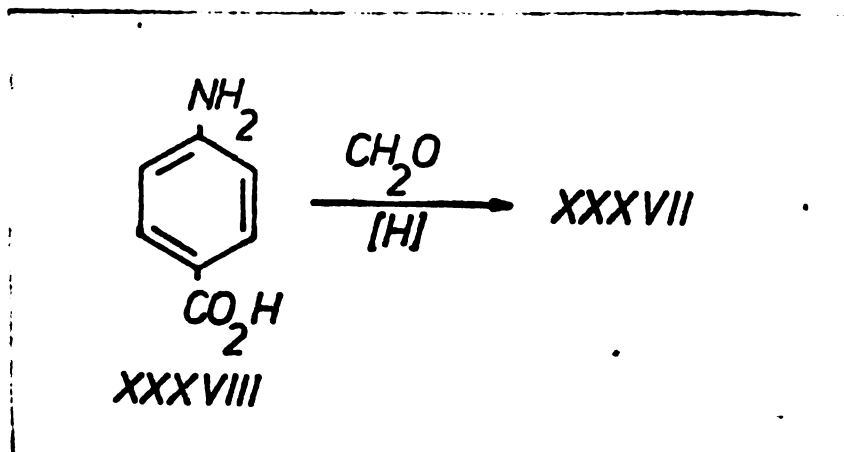


- cea mai elegantă metodă de sinteză a acidului N[4-(metilamino)benzoil]glutaric pornește de la acid 4-metilamino-benzoic, care este transformat în acid 4[metil-(benziloxycarbonil)amino]benzoic prin tratare cu cloroformiat de benzil (prin reacția Schotten-Baumann). Acesta este apoi transformat în clorură acidă prin reacția sa cu PCl_5 și cuplat cu L-glutamat de dietil. După hidroliza blîndă a esterului, grupa benziloxycarbonil este îndepărtată cu HBr în acid acetic. Rezultat: crăhidratul acidului N[4-(metilamino)benzoil]glutamic /456/.

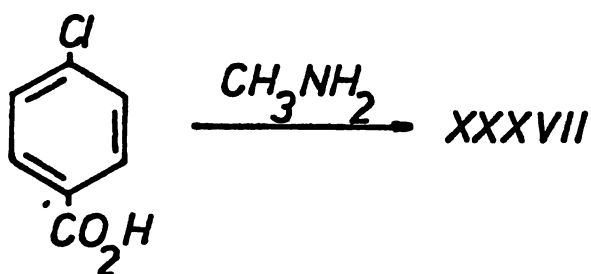


Că variantă a acestui procedeu constă în protejarea grupei amino din acidul 4-metilamino-benzoic cu ajutorul restului formil. Procedul cuprinde apoi aceleași etape ca cele de mai sus, deprotejarea efectuându-se și de această dată prin hidroliză acidă. Randamentele ambelor metode sînt foarte ridicate /301/.

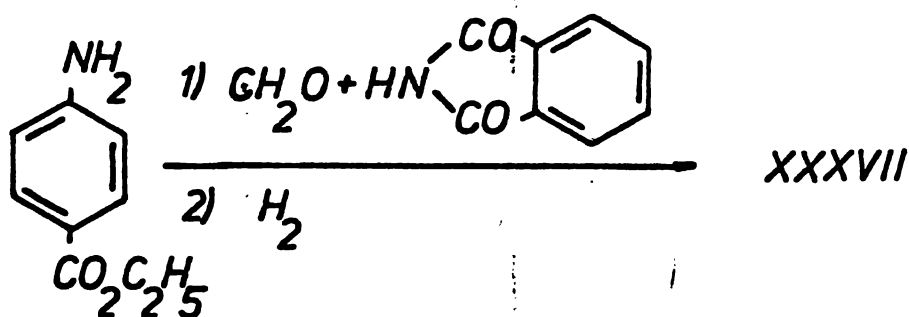
Acidul 4-metilamino-benzoic este preparat fie prin tratarea acidului 4-amino-benzoic cu formaldehidă în prezență de zinc și hidroxid de sodiu:



fie din acid 4-clor-benzoic cu metilamină /457/:



O metodă recentă, superioară sub aspectul randamentului, tratează anestezina cu formaldehidă, ftalimidă, nichel Raney și hidrogen în autoclavă, la presiune /458/:



Separarea aminei secundare de cea primară și terțiară (conținute ca impurități în cazul anumitor procedee de metilare) se face de obicei prin nitrozare /459/.

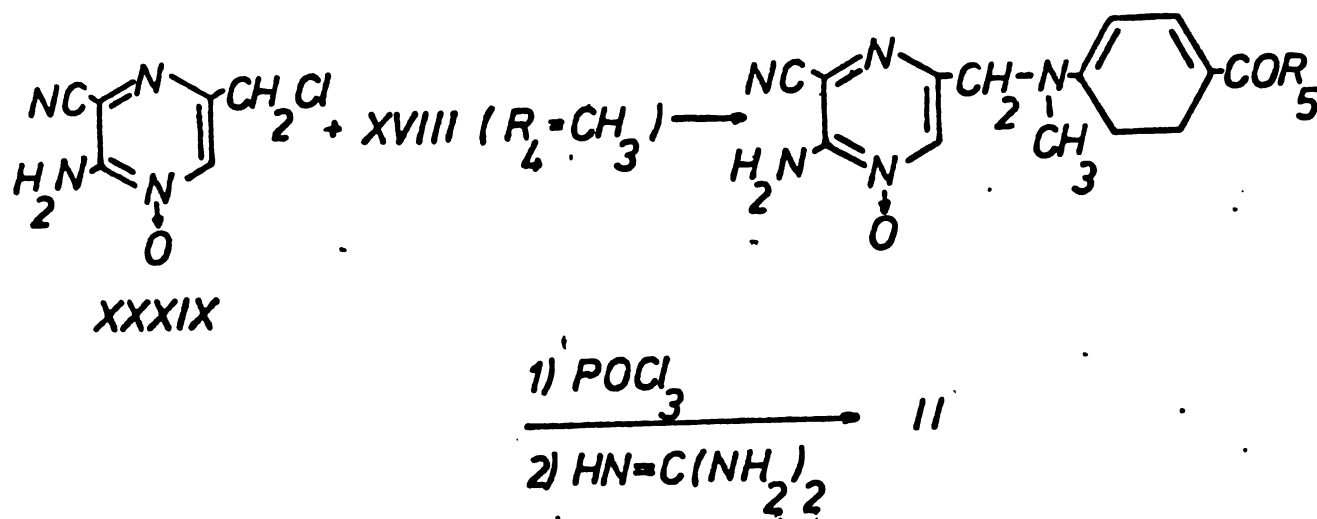
Clorhidratul esterului glutamic se prepară din acid glutamic și alcool etilic absolut, prin barbotare de HCl uscat. Apa rezultată este îndepărtată prin concentrare la sec și reacția este continuată prin adăugarea unei noi cantități de alcool anhidru proaspăt, refluxare și repetarea operațiilor descrise mai sus /460-464/

2. Sinteza analogilor pteridinici ai acidului folic plecând de la derivați pirazinici.

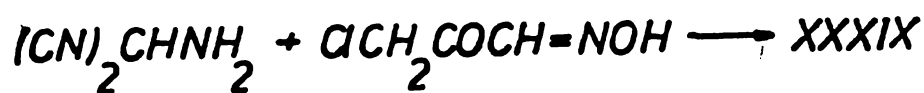
Recent a fost descrisă o sinteză neechivocă a derivaților pteridinici (6-metil- și hidroximetil-pteridine, Methotrexat, etc) pornind de la pirazine /276, 465-470/.

Se pare însă că condițiile alcaline relativ severe în timpul condensării finale cu guanidina provoacă în unele cazuri (de exemplu la Aminopterina) racemizarea /471/. În schimb, acidul folic nu

se racemizează în aceste condiții.

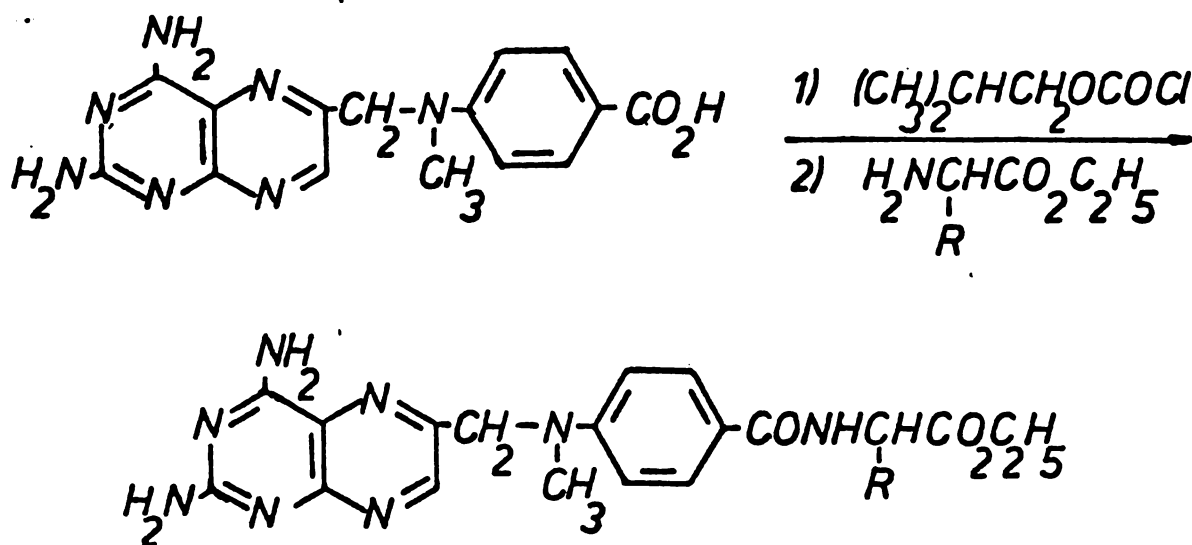


La rândul ei, pirazina corespunzătoare se prepară astfel:



3. Sinteza analogilor acidului folie utilizând acidul pteric și analogii săi.

Reacția are loc prin transformarea acidului în clorura de acil corespunzătoare /472/, fie utilizând compuși în care gruparea carboxilică este activată prin transformarea sa în anhidridă mixtă /473/.

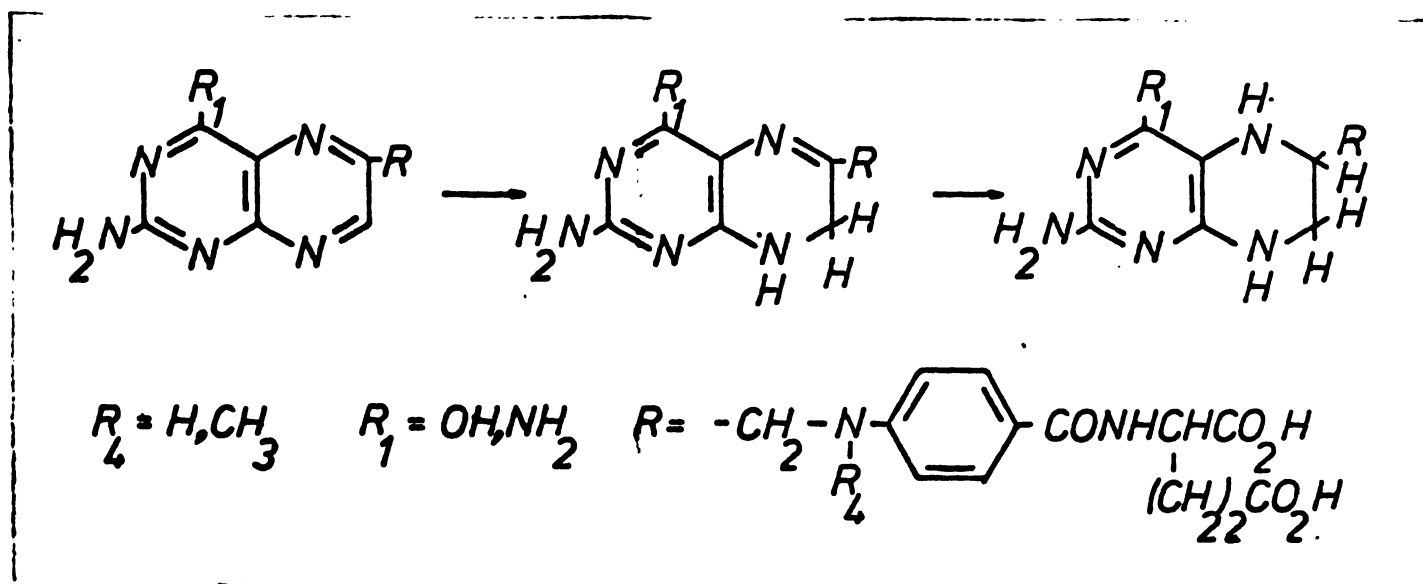


Cuplarea acestor intermediari se poate face direct cu esterii de amino acizi sau după fixarea acestora din urmă pe un suport solid. S-au preparat pe această cale atât analogi ai Methotrexatului cu diverși amino acizi terminali în formă esterificată /300,472/, cât și poliglutamați ai acidului folic sau Methotrexatului (în acest caz, sinteza se face pe suport solid /352,474,475/).

4.Sinteza analogilor acidului folic prin reacții chimice efectuate asupra moleculei acestora.

4.1.Reducerea.

Acidul folic și analogii săi pot fi reduși la di- și tetrahidro-derivați /377/. Reducerea este condusă fie catalitic ($PtCl_2$) /287,378/, fie utilizând ditionit de sodiu /476-482/, fie zinc și hidroxid de sodiu /479,483/. Compușii rezultați (în special tetrahidro-derivatul) sînt instabili, descompunîndu-se la contactul cu aerul, singurul compus identificabil fiind acidul N(4- amino--enzoil)glutamic (în cazul acidului folic).

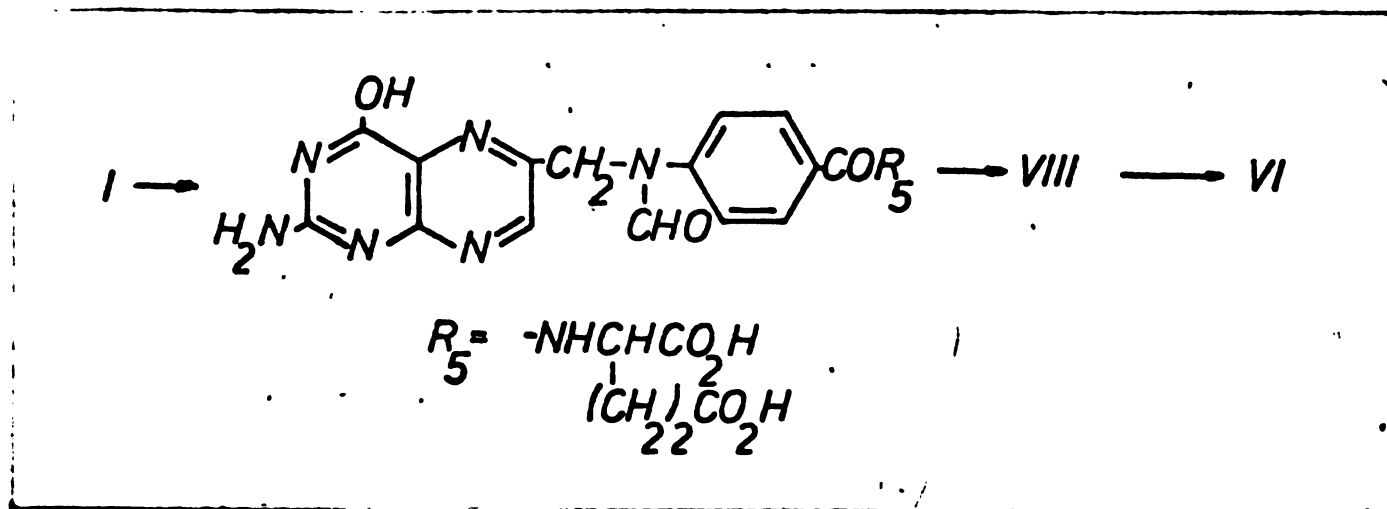


Tetrahidro-derivații pot fi apoi transformați fie în 8-metil-analogi (de exemplu prin metilarea directă a tetrahidro-Methotrexatului /484/), fie suferă reacții diferite cu formaldehida /287,43/, ducînd, în cazul acidului folic, la o serie de coenzime importante ale acestuia.

4.2. Formilarea.

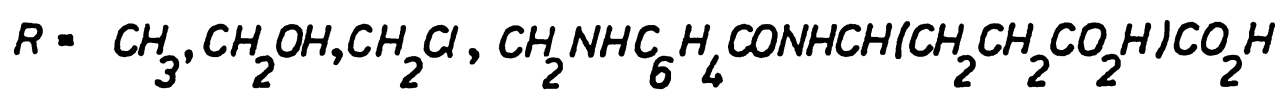
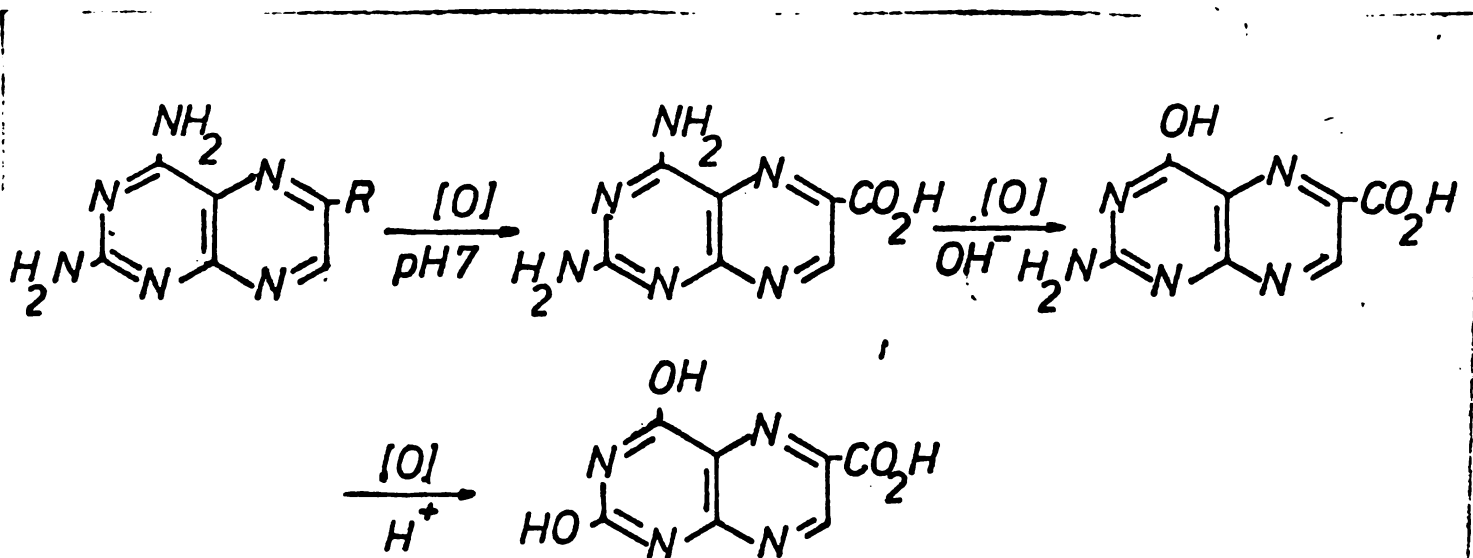
Acidul folic și Aminopterina pot fi formilate (la N¹⁰) cu acid ictric 98% singur sau în amestec cu anhidrida acetică /287,477,486, 487/.

Trebuie remarcat că grupa formil din acidul 10-CHO-folic, după hidrogenare la acid 10-CHO-tetrahidrofolic suferă transpoziție în mediu alcalin, rezultând acid 5-CHO-tetrahidrofolic (Citrovorum factor, CF, VI), o importantă coenzimă a acidului folic /488-492/.



4.3. Oxidarea.

Această reacție, efectuată asupra Methotrexatului, Aminopterinei, acidului folic, etc, cu soluție de permanganat de potasiu la diverse valori ale pH-ului duce la obținerea acizilor pteridinil-6-carboxilici 2,4-disubstituiți /340,493/.

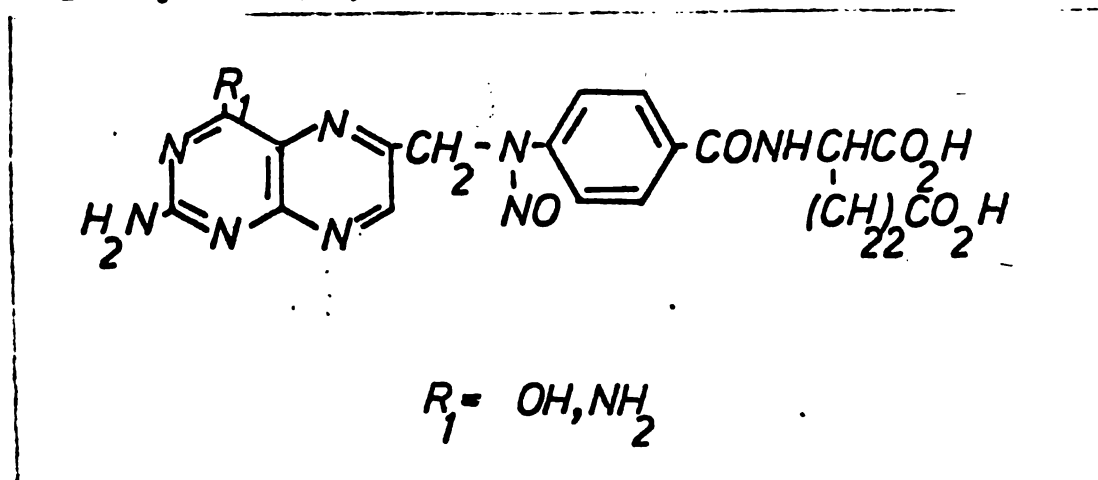


În mediu neutru se obține acidul 2,4-diamino-, în mediu bazic- acidul 2-amino-4-hidroxi- iar în mediu acid- acidul 2,4-dihidroxi-pteridinil-6-carboxilic /493/.

În cazul pteridinelor substituie în poziția 7 (în loc de 6) se obține în aceleași condiții acidul pteridinil-7-carboxilic, ce se deosebește ușor în u.v. de primul. Din acest motiv, reacția este importantă ca mijloc chimic de precizare a poziției restului peptidic sau a unor alte catene laterale mai mici (metil, hidroximetil) în derivații pteridinici 2,4-disubstituiți.

4.4. Reacția cu acidul azotos și azotic.

Acidul folic și Aminopterina tratate cu acid azotos sînt N-nitrozate în poziția 10 /494/:



Acești produși pot fi retransformați în compuși inițiali prin tratare cu fenol și acid clorhidric.

Se citează de asemenea și diazotarea grupării 2-amino, în vederea cuplării cu o imunoglobulină /304/.

Prin tratare cu acid azotic, acidul folic este transformat în acid 3',5'-dinitro-folic /284/

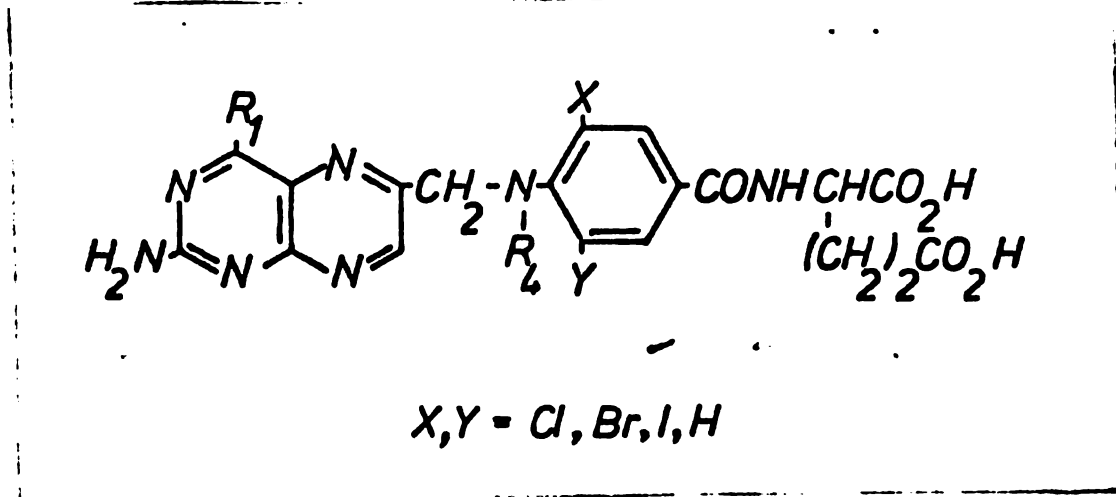
4.5. Esterificarea.

S-a comunicat esterificarea directă a acidului folic /495/ și analogilor săi /295/ cu alcooli alifatici inferiori (metilic, etilic), folosind acid clorhidric gazos, uscat.

Esterii pot fi hidrolizați, fără afectarea structurii pteridinei prin tratare cu acid clorhidric 4 N.

4.6. Halogenarea.

Halogenarea directă (sau cu ICl) în soluție de formamidă sau de acid clorhidric a permis prepararea unor derivați mono- și di-halogenati (cu clor, brom sau iod) pe nucleul benzenic. Se pot prepara astfel 3'-halo- sau 3',5'-dihalo-derivați /291,496,497,502/. În ca-



zul iod-derivaților, se pare că rezultă exclusiv compusul mono-halogenat /498,499/, deși inițial, unele date de literatură au menționat și posibilitatea preparării 3',5'-diod-derivatului /497,500/.

Fluor-derivații corespunzători au fost obținuți exclusiv prin procedee indirecte /496,501/.

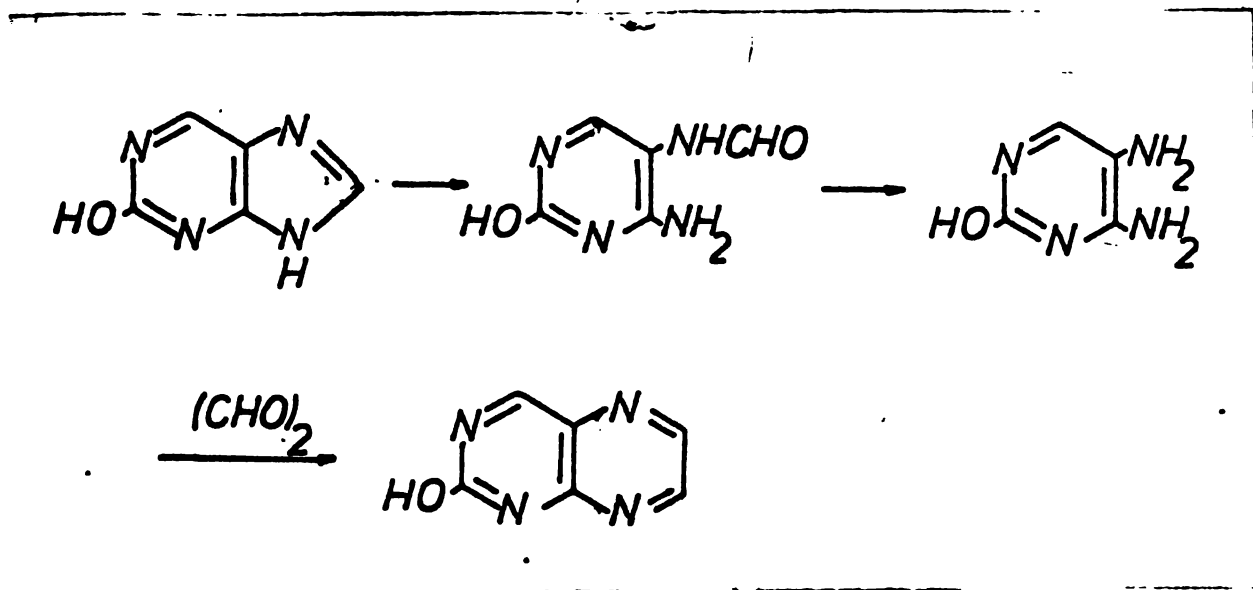
5. Biosinteza acidului folic.

Deși unele etape ale biosintezei acidului folic și pteridinelor produse de către anumite microorganisme corespund în parte unor procedee chimice descrise anterior, s-a preferat repetarea lor în vederea prezentării unitare a acestei metode de mare importanță.

S-a arătat că guanina-¹⁴C este încorporată într-un compus pteridinic de către *Xenopus* /503/; de asemenea în *Drosophila melanogaster* tot o purină este precursorul unui pigment pteridinic /504,505/. În fluturele *Pieris brassicae* L, guanina sau guanosina-5'-fosfat sînt precursorii xantopterinei și leucopterinei /506/. S-a arătat apoi că acidul dihidrofolinic rezultă din guanosină-5'-fosfat și acid 4-amino-benzoil-glutamic, în prezența ATP, clorurii de magneziu și 2-mercaptoetanolului, cu extracte aceluare de *Lactobacillus plantarum* /507/. Administrarea adeninei-2-¹⁴C la celulele unei specii

de Corynebacter, duce la formarea de acid pteroil-triglutamic (teropterină) radioactiv, în timp ce administrarea adeninei-8-¹⁴C produce de asemenea teropterină, dar neradioactivă. Acest fapt a constituit o primă indicație că în cursul metabolizării adeninei de către bacterii, unitatea C⁸ a fost îndepărtată, restul moleculei fiind utilizat direct pentru sinteza porțiunii pteridinice a teropterinei. În mod asemănător, extracte aceluare de E.coli produc transformarea guanosinei în restul pteridinic al acidului folic /508/.

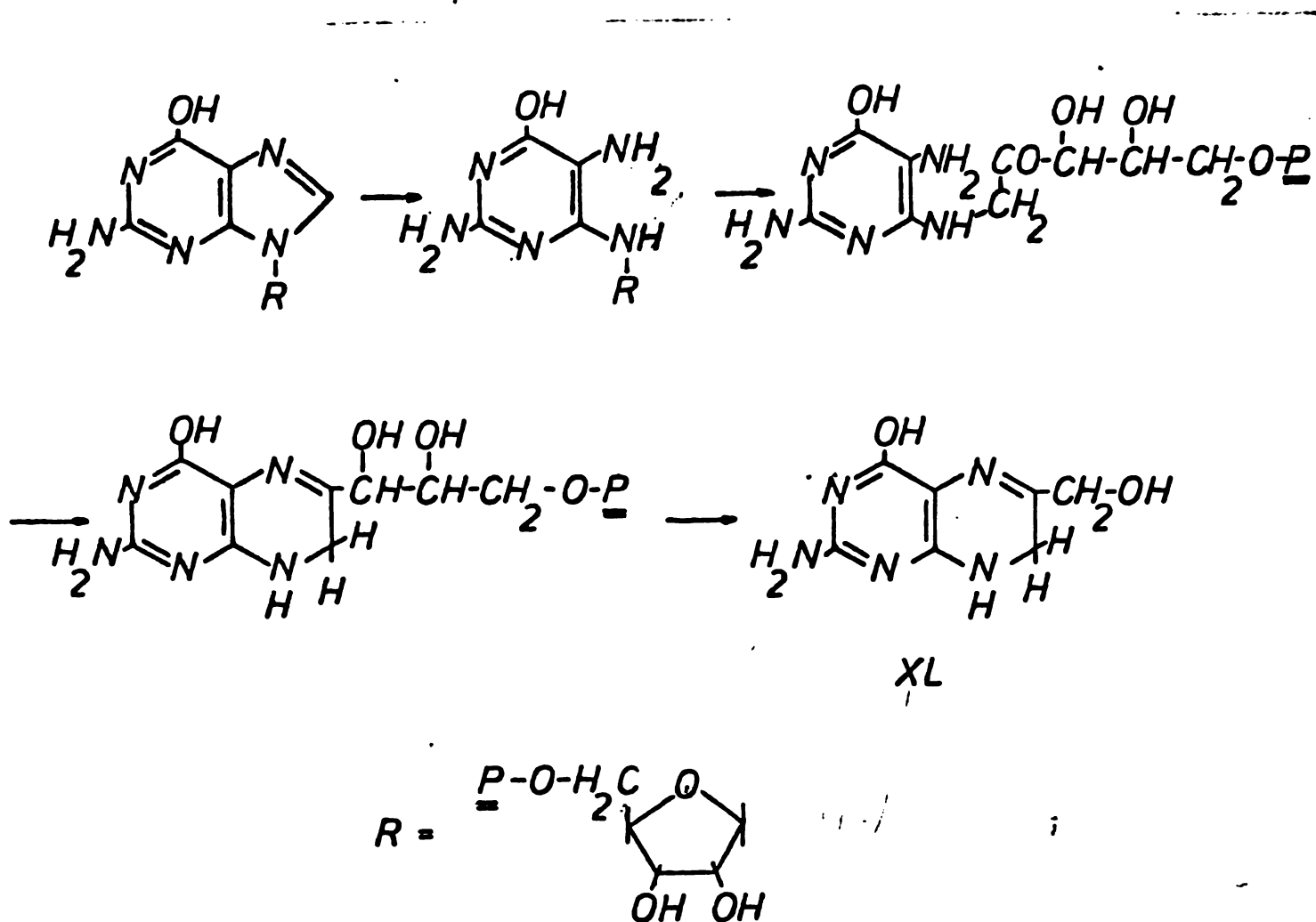
De o mare importanță în demonstrarea implicării precursorilor purinici în biosinteza ciclului pteridinic a fost descoperirea reacției de lărgire a inelului imidazolic al sistemului purinic prin tratare cu glioxal /509,510/:



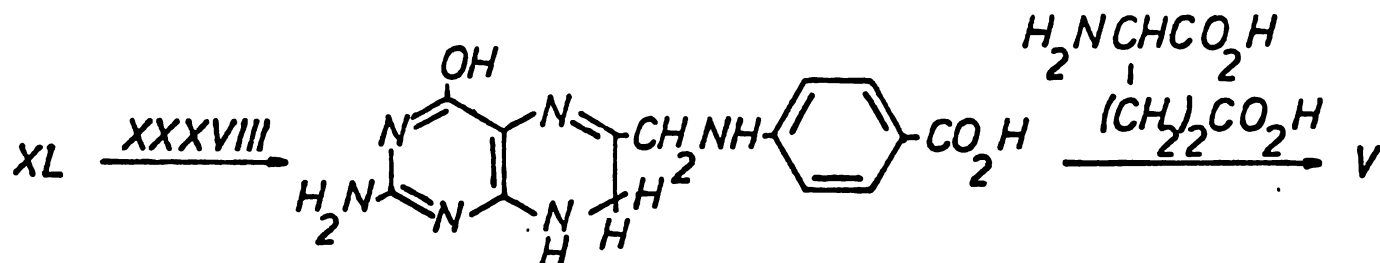
Din secvența de reacții de mai jos de sinteză a 2-amino-4-hidroxi-6-hidroxi-metil-dihidropteridinei rezultă că atomii C⁶ și C⁷ ai nucleului pteridinic provin din C² și C¹ ai ribozei /503, 511-515/, iar C⁹ al punții din atomul C³ al zaharului /515/.

Urmează apoi reacția 2-amino-4-hidroxi-6-hidroxi-metil-dihidropteridinei cu acid 4-amino-benzoic în prezența ATP, pentru a da acidul dihidroptericoic, iar acesta, de asemenea în prezența ATP, cu acid glutamic produce acid dihidrofolinic /516,517/. Se arată că în E.coli, această secvență este preferată, iar nu conversia directă

Pa acid dihidrofolic, prin reacția cu acid 4-aminobenzoil-glutamic.
De altfel, trebuie remarcat că nu s-au găsit enzime care să catali-



zeze reacția de formare a acidului 4-aminobenzoil-glutamic din acid
4-aminobenzoic și acid glutamic /516/.



Hidroximetil-dihidropteridina utilizată în această ultimă se-
rie de reacții nu este de sigur liberă ci sub formă de pirifosfat
/60,518,519/.

P A R T E A I I

S I N T E Z A , S T U D I U L F I Z I C C - C H I M I C
S I B I O L O G I C A L U N O R N O I A N A L C G I
A I A C I D U L U I F O L I C

I. JUSTIFICAREA ABOORDARII DOMENIULUI

Din cele expuse în prima parte a acestei lucrări, rezultă poziția pe care o are un cercetător angajat în domeniul creării de medicamente în general și de medicamente anticanceroase în special. O sinteză rațională, justificată, a unor astfel de compuși nu se poate face decît pe baza cunoștințelor asupra mecanismelor de acțiune și a relațiilor structură chimică-activitate biologică în domeniul vizat. Din păcate, în cazul principalelor medicamente antitumorale, mecanismele de acțiune nu sînt prea bine înțelese. Rămîne astfel, pentru o sinteză cît mai rațională a lor, utilizarea relațiilor structură chimică-activitate biologică. În clasa antimetaboliților acidului folic, pe de o parte, datorită complexității structurii moleculelor respective iar pe de altă parte, interacțiunilor secvențiale ale acestora cu sistemele biologice ce participă cu ponderi diferite (și nu prea bine cunoscute) la efectul final observat, aceste relații au un caracter pur calitativ. Recent au apărut totuși și încercări de corelare cu un aspect cantitativ mai pronunțat, cum ar fi de exemplu: a) corelarea densității de electroni (calculată prin metoda orbitalilor moleculari) în porțiunea pteridinică a moleculei acidului folic și antagoniștilor săi, cu intensitatea efectului de inhibare exercitat de aceștia asupra DHFR, sau b) corelarea între coeficientul de partiție ($\log P$) și inhibiția unor sisteme enzimatică. Atît simplificările introduse în calcule, cît și dificultățile legate de extrapolarea rezultatelor obținute in vitro asupra situațiilor mult mai complicate existente in vivo, au condus în majoritatea cazurilor la rezultate neconcludente.

Literatura consultată și analizată în partea introductivă a lucrării, atribuie structurii pteridinice din molecula antimetaboliților clasici ai acidului folic (adică sistemului 2,4-diamino-pteridinic) rolul principal în conferirea proprietăților antiblastice ale acestora.

Deși structura 2,4-diamino-pirimidinică este aproape sigur implicată în legarea de DHFR, semnificația celorlalte elemente structurale ale moleculei (chiar și a inelului pirazinic din sistemul pteridinic) este mai puțin bine precizată. Porțiunii peptidice a moleculei i se atribuie un rol minor, în general considerându-se că acidul glutamic terminal este implicat în transportul medicamentului prin membrana celulară. În sfârșit, trebuie reamintit faptul că nu există o relație simplă, directă, între gradul inhibării DHFR de către această grupă de derivați și efectul lor antitumoral.

În cadrul lucrării de față ne-am concentrat asupra unor aspecte încă puțin studiate în literatura de specialitate, încercând să elucidăm importanța restului peptidic în cadrul efectului biologic general al moleculei. Am căutat astfel să precizăm următoarele aspecte:

- rolul centrului optic activ din acidul glutamic terminal;
- importanța poziției de atașare a catenei laterale peptidice pe nucleul pteridinic;
- importanța naturii amino acidului terminal și a grupărilor α - și γ -carboxilice ale acestuia pentru activitatea antitumorală a analogilor de Methotrexat;
- influența dimensiunilor catenei laterale peptidice asupra proprietăților biologice. Admițând necesitatea prezenței nucleului benzenic și a restului de acid glutamic (sau aspartic) terminal, dimensiunile catenei laterale s-au modificat prin intercalarea unui amino acid suplimentar între aceste două elemente.

Complexitatea obiectivelor propuse a impus sintetizarea unui număr relativ mare de compuși noi, aleși în mod corespunzător, ceea

ce a necesitat:

- punerea la punct a unor procedee de sinteză care să conducă la compuși izomerici puri (derivați 6- sau 7-substituiți pe nucleul pteridinic);

- aducerea randamentelor unor reacții în limite acceptabile;

- realizarea unor procedee de lucru reproductibile (în unele cazuri, chiar pe scară largă);

- îmbunătățirea și individualizarea unor procedee de purificare a produșilor finali;

- caracterizarea corespunzătoare a tuturor compușilor sintetizați.

În cele ce urmează se va prezenta metodologia de sinteză adoptată în vederea obținerii compușilor propuși a fi preparați, cu scopul de a elucida aspectele mai sus discutate. Dat fiind rolul central pe care l-a avut sinteza Methotrexatului în elaborarea lucrării de față și de fapt, pentru întreaga clasă de antimetaboliți ai acidului folic, el a fost tratat separat, deși organic este legat de analogii dipeptidici ai acidului folic.

II. SINTEZE DE ANALOGI PTERIDINICI AI ACIDULUI FOLIC

1. Sinteza acidului N[4-[metil-(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil) amino]benzoil]L-glutamic ¹⁾ (Methotrexat, MTX, 6-MTX, 6-L-MTX, anti-folan, 6, MAB-L-Glu ²⁾).

În momentul abordării în cadrul laboratorului nostru a sintezei MTX, erau cunoscute două procedee de preparare a acestui medicament și anume:

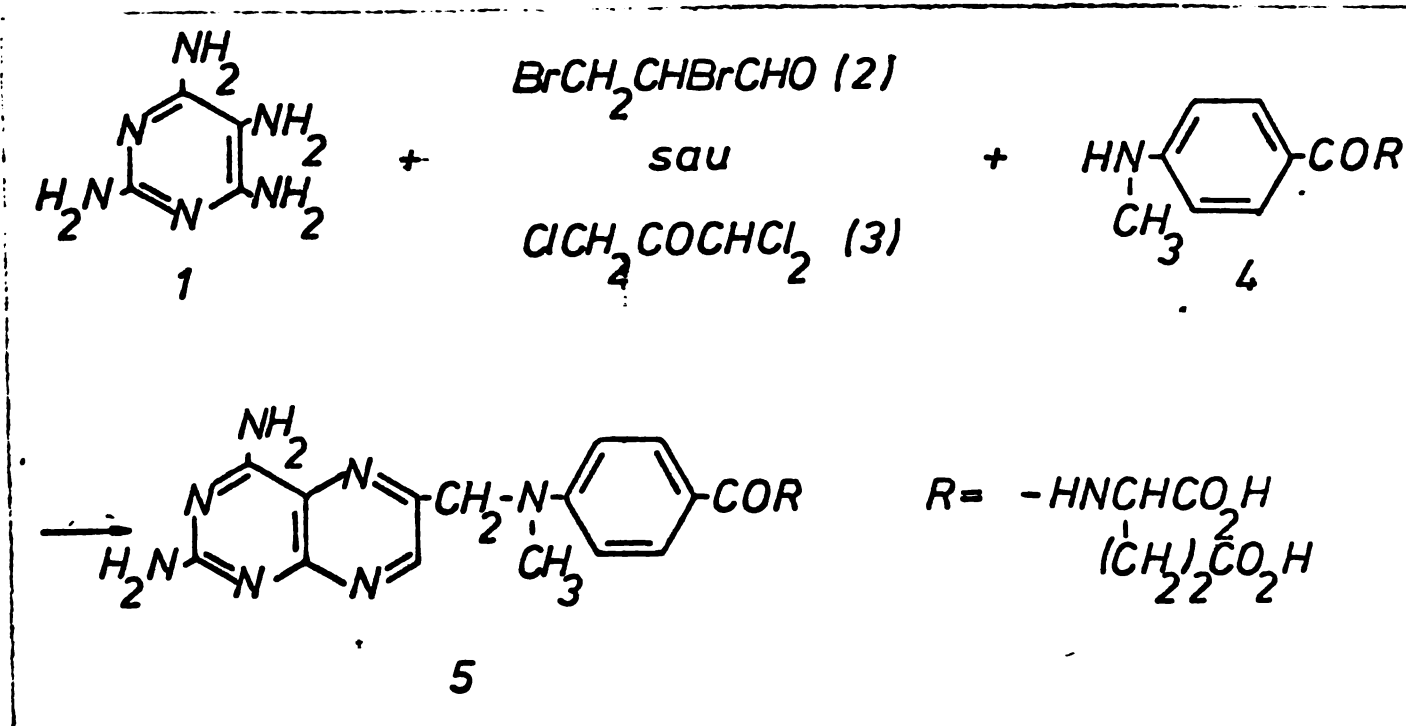
1) metoda lui Seeger și colab. /1/, ce constă în condensarea într-o singură fază a tetraaminopirimidinei (1), acidului N[4-(metil-amino)-benzoil]glutamic (4) și a 2,3-dibrompropionaldehidei (2);

2) cea a lui Berezovskii și colab. /348/, care utilizează același sistem, înlocuind 2,3-dibrompropionaldehida (2) cu 1,1,3-tricloracetona (3).

În continuare va fi analizat fiecare procedeu în parte de sinteză a Methotrexatului, încercat și de noi.

1) Această denumire a Methotrexatului o înlocuiește pe cea clasică, discutabilă din anumite puncte de vedere, de acid N[4{[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]N¹⁰-metilamino}benzoil]L-glutamic.

2) La toți analogii acidului folic sintetizați a fost adoptată, din motive de comoditate de exprimare, o notație simplificată, în care cifra indică poziția (6 sau 7) de atașare a restului peptidic pe nucleul pteridinic, literele reprezentând inițialele amino acizilor componenți din peptidă.



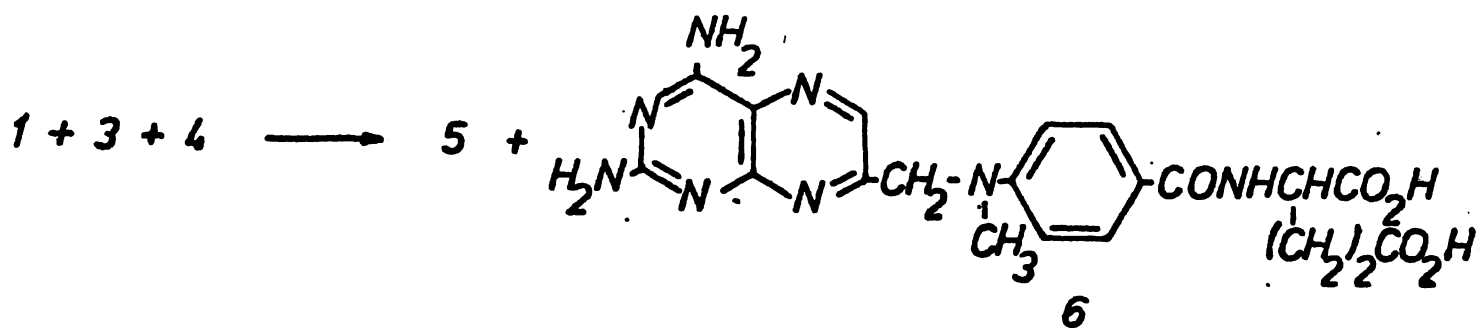
1.1. Evaluarea procedurii Seeger de sinteză a 6-MTY.

Reproducerea acestui procedeu, efectuat prin picurarea concòmitentă a soluțiilor de 2,3-dibrompropionaldehidă (2) și de iodiodură de potasiu la amestecul tamponat (pH 3-4) de tetraaminopiridină (1) și acid N[4-(metilamino)-benzoil]glutamic (4), ne-a condus la un produs brut, avînd un conținut extrem de mic în acid N{4-[metil-(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil)-amino]benzoil}glutaric (5, 6-L-MTY) (determinat spectrofotometric). Acesta, după purificări laborioase prin schimbări de pH, combinate cu treceri multiple pe coloane cromatografice a permis obținerea unui 6-MTY identic din toate punctele de vedere (cromatografic, spectre u.v. și i.r., determinări biologice) cu o probă autentică furnizată de firma Lederle. Deși prin procedeul Seeger rezultă 6-MTY izomerie pur (dovedit ulterior prin degradare chimică și R.M.N.), randamentul final obținut s-a dovedit inacceptabil de mic (2%), avînd în vedere intențiile noastre de preparare pe scară largă a acestui produs.

Aceasta a impus cercetarea arăunțită și a altor procedee de sinteză descrise în literatură la acea dată.

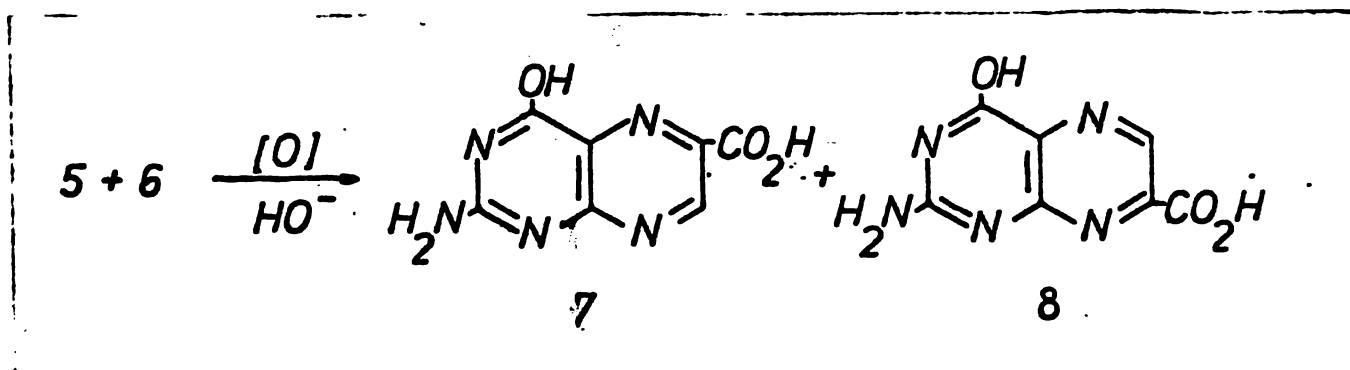
1.2. Evaluarea procedurii Berezovskii de sinteză
a Methotrexatului.

Procedura lui Berezovskii și colab. /348/, efectuată în condiții asemănătoare celui descris mai sus (cu mențiunea că 2,3-dibrompropionatului a fost înlocuită cu 1,1,3-tricloracetona (3), soluția de iod-iodură ne mai fiind evident necesară), duce la randamente mari de produs, cu un conținut ridicat de compus aserănător MTX. În urma purificării acestuia, produsul final rezultat, deși identic cu o probă autentică de Methotrexat (Lederle) (din punct de vedere cromatografic, cromatografie pe hirtie Whatman nr.1, descendent, eluent-tampon fosfat disodic 0,1 M, pH 7,0), prezintă un coeficient de extincție molar (în HCl 0,1 N, la 306 nm) mai mare ca al acestuia, precum și o activitate biologică considerabil mai scăzută (cca. 60% din cea a Methotrexatului). Excluzând posibilitatea unei purități necorespunzătoare, am scris ipoteza că produsul rezultat după procedura Berezovskii este de fapt un amestec de 6-MTX și acid N{4-[metil-(2',4'-diamino-pteridinil-7'-metil)-amino]benzoil}glutamic (7-L-MTX, 7, MAB-L-Glu, (6)), ultimul fiind caracterizat printr-un coeficient de extincție molar superior MTX și o activitate biologică semnificativ mai redusă decât a acestuia. Trebuie menționat că 7-MTX nu era descris în literatura de specialitate /520,521/.



Oxidarea și hidroliza produsului de reacție cu $KMnO_4$ în mediu bazic a confirmat acest punct de vedere /522/. Se obține astfel un amestec de acizi 2-amino-4-hidroxi-pteridinil-6- (7) și -7-carboxi-

lici (8) ușor de separat cromatografic și de identificat spectrofotometric, fiind cunoscuți în literatura de specialitate /340/.



Rezultă deci că acest procedeu conduce cu randamente satisfăcătoare la un amestec de 6-MTX (5) și 7-MTX (6), ce nu a putut fi separat prin niciunul din procedeele încercate. Evident, produsul obținut este necorespunzător în vederea utilizării sale ca medicament.

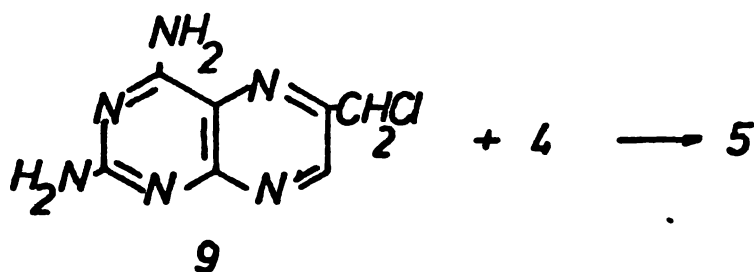
1.3. Sinteza 6-MTX via 2,4-diamino-6-clorometil-pteridina.

Având în vedere observațiile rezultate în urma analizei căilor de sinteză Seeger /1/ și Berezovskii /348/, se punea problema nu numai a atingerii unor randamente acceptabile ci și a unui produs izomeric pur, arbele procedee evaluate dovedindu-se necorespunzătoare sub unul sau altul din aceste aspecte.

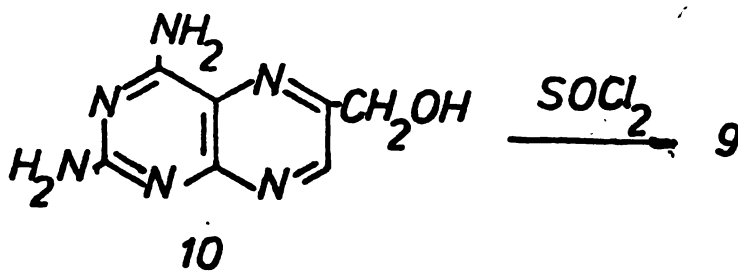
Posibilitatea obținerii concomitente a izomerilor 6- sau 7-substituiți în cazul închiderii inelului pteridinic pornind de la pirimidine (metoda Isay) era cunoscută și discutată în literatura de specialitate /353/. Totuși, s-a arătat într-o serie de cazuri, că în anumite condiții de lucru se poate forma exclusiv un singur izomer. Bazându-ne pe aceste date, s-a încercat în etapa următoare obținerea 6- și 7-MTX izomeric puri, folosind căi de sinteză diferite.

Pentru sinteza acidului N[4-[(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil) amino]benzoil]glutamic (5, Methotrexat, 6-L-MTX, 6, MAB-L-Glu) a fost elaborat un procedeu nou, original /523-526/, utilizând ca intermediar cheie 2,4-diamino-6-clorometil-pteridina (9). Acest din urmă compus este condensat cu acid N[4(metilamino)-benzoil]glutamic (4) /527/ în mediu apos, tamponat, de pH 4. Rezultă un produs brut cu conținut ridicat de 6-MTX care, după purificări corespunzătoare

(prin schimbări de pH și treceri pe coloane cromatografice de celuloză și celuloză-cărbune), conduce la un produs final de puritate ridicată (95%, determinat spectrofotometric). Ulterior, procedeul a fost îmbunătățit prin efectuarea condensării la un pH mai ridicat (cca.7,5), când produsul brut furnizează, după o singură trecere pe coloană de celuloză, produsul final cu puritate de peste 95%, randamentul crescând astfel la 19% /526/.

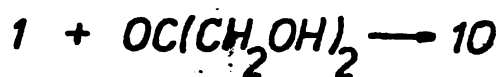


Sinteza 2,4-diamino-6-clorometil-pteridinei (9) a fost efectuată prin clorurarea (cu SOCl_2 , în prezența piridinei) în mediu inert (CCl_4) a 2,4-diamino-6-hidroximetil-pteridinei (10) izomerică pură /523,524,528/.



2,4-Diamino-6-hidroximetil-pteridina (10), lipsită de izomerul 7, a fost obținută printr-o îmbunătățire a procedurii lui Baugh și Shaw /419/ și anume prin reacția dintre 2,4,5,6-tetraaminopiridină (1) și 1,3-dihidroxiacetonă (sub forma combinației sale bisulfite) în mediu apos de acetat de sodiu, în prezența cisteinei și folosind ca agenți oxidanți bioxidul de seleniu și aerul (oxidarea este necesară, deoarece prin condensarea reactanților se formează în prima etapă 7,8-dihidro-derivatul) /523,524/. Produsul de reacție este

impurificat cu 2,4-diamino-6-metil-pteridină, provenit probabil din eliminarea intramoleculară a apei.



În aceste condiții se formează exclusiv izomerul 6, cum s-a verificat prin degradare oxidativă.

Mai târziu, procedeul a fost îmbunătățit, timpul de reacție fiind scurtat la 1,5 h (față de 24 h, în procedeul anterior) (sfârșitul reacției determinându-se spectrofotometric, în u.v.), cantitatea de 6-metil-pteridină din produsul final fiind considerabil redusă /528/.

Pe baza aceluiași procedeu, folosind acizii N[4-(metilamino)-benzoil]-D- și -DL-glutamic, s-au sintetizat 6-D-MTX (6, MAB-D-Glu) și respectiv, 6,DL-MTX (6, MAB-DL-Glu) /523/. Datele analitice ale noilor compuși sintetizați sînt prezentate în Tabelul I.

2.4. Purificarea MTX.

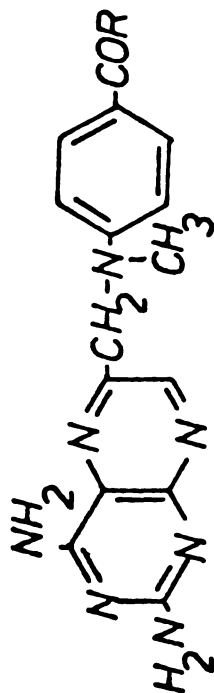
Purificarea produsului brut de reacție conținând 6-MTX merită o atenție specială, dată fiind complexitatea operațiilor respective. Alegerea căii de purificare depinde în cel mai înalt grad de conținutul în 6-MTX a produsului brut și de natura impurităților însoțitoare. Acești factori sînt la rîndul lor, funcție de procedeul de sinteză adoptat.

Astfel, în cazul în care condensarea 2,4-diamino-6-clorometil-pteridinei cu peptida respectivă (L, D sau DL) s-a efectuat la pH 4, purificarea produsului brut rezultat din reacție se face prin următoarele operații succesive:

a) schimbări de pH (dizolvare în apă la pH 10-12, filtrare, neutralizare la pH 7,0, refiltrare, acidulare la pH 3,5-4, filtrarea

Tabelul 1

Analogi dipeptidici ai Methotrexatului



Amino acidul terminal	Formula brută	pt °C	Analiza elementară				R _f	
			Calculat	Găsit	C	N		
Glicina	C ₁₇ H ₁₈ N ₈ O ₃	225 desc.	4,71	4,30	53,43	29,32	28,71	0,40
DL-Alanina	C ₁₈ H ₂₀ N ₈ O ₃ ·H ₂ O	205 desc.	5,56	5,71	50,53	25,93	25,62	0,45
β-Alanina	C ₁₈ H ₂₀ N ₈ O ₃ ·H ₂ O	cca.185	5,56	6,01	50,60	25,93	26,10	0,33
Sarcosina	C ₁₈ H ₂₀ N ₈ O ₃ ·H ₂ O	195 desc.	5,56	5,68	49,63	25,93	26,09	0,53
Acid DL-α-aminobutiric	C ₁₉ H ₂₂ N ₈ O ₃	202 desc.	5,37	5,83	56,09	27,30	26,87	0,53
Acid γ-aminobutiric	C ₁₉ H ₂₂ N ₈ O ₃ ·H ₂ O	cca.155	5,60	5,94	52,83	26,20	25,88	0,39
DL-Valina	C ₂₀ H ₂₄ N ₈ O ₃	215-218	5,66	5,66	56,54	26,42	25,90	0,52
L-Leucina	C ₂₁ H ₂₆ N ₈ O ₃ ·2H ₂ O	cca.198	5,93	6,33	53,00	23,60	23,26	0,56
L-Fenilalanina	C ₂₄ H ₂₄ N ₈ O ₃ ·H ₂ O	193-195	5,31	5,42	59,16	22,85	22,89	0,42
Acid D-Glutamic	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅ ·H ₂ O	208	5,10	5,65	50,53	23,73	23,86	0,57
Acid DL-Glutamic	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅ ·H ₂ O	205	5,10	5,77	51,38	23,73	23,64	0,60

b) trecerea produsului parțial purificat pe o coloană cromatografică de celuloză (raportul dintre produs și umplutură 1 : 50), eluind cu tampon fosfat disodic 0,1 M pH 7,0. Frațiile culese la colectorul de fracțiuni sînt alese pe baza unor criterii spectrofotometrice sau după cromatografierea pe hîrtie Whatman nr.1, descendent, eluind cu același tampon. După unificarea fracțiilor de aceeași puritate și acidulare la pH 3,5-4, se filtrează precipitatul de 6-MTX a cărui puritate a crescut la cca.90%.

În cadrul aceleiași etape de purificare s-au mai încercat de asemenea și alte umpluturi pentru coloanele cromatografice, și anume:

- DEAE-celuloză, eluind cu tampon fosfat disodic 0,05 M pH 8,0;
- celită 535, eluind cu faza organică a amestecului n-BuOH-MeOH-(NH₄)₂CO₃ aq. 0,5% 6 : 1 : 4 ;
- Dowex 1X8 (în acest caz, impuritățile se spală cu tampon acetat de sodiu 1 M pH 6,0 de pe coloană, după care produsul se eluează cu AcCH 1 M).

c) cromatografierea produsului de puritate 90% pe o coloană avînd trei straturi succesive (celuloză, celuloză amestecată cu cărbune activ și celuloză), eluind de această dată cu apă și colectînd o singură fracție. Puritatea produsului atinge după această operație 95%.

În cazul în care reacția de obținere a 6-MTX s-a efectuat la pH 7,5, produsul de reacție rezultat are o puritate suficient de înaltă pentru ca, după numai o singură trecere pe coloană de celuloză în condițiile descrise mai sus (eluind de asemenea cu tampon fosfat disodic 0,1 M pH 7,0), puritatea produsului final să depășească 95%.

1.5.Sinteza intermediarilor.

2,4,5,6-Tetraaminopirimidina (1) a fost preparată conform datelor de literatură /346,427,524/, unele faze fiind îmbunătățite fie prin ridicarea randamentului, fie prin asigurarea reproductibi-

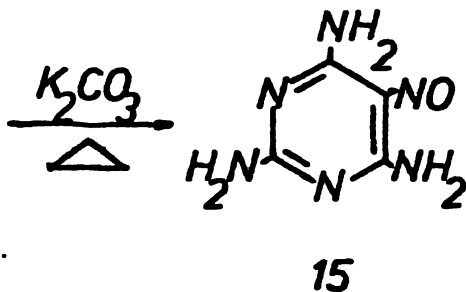
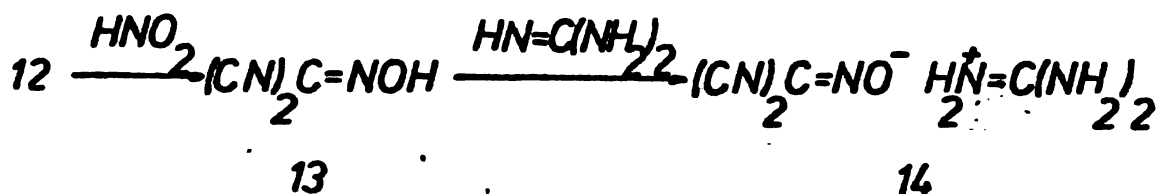
lățății, fie, în sfârșit, printr-o manipulare mai convenabilă.

S-au utilizat astfel două căi de sinteză a acestui compus, ambele folosind ca materie primă malonodinitrilul /441/, preparat la rândul său prin deshidratarea cianacetamidei (12) /441/ cu POCl_3 (cianacetamida se obține prin tratarea cianacetatului de etil cu amoniac /439/). Contrar celor afirmate de literatură, am constatat că reducerea cantității de clorură de sodiu, adăugată cu scopul reținerii acidului fosforic format, are drept consecință o manipulare mai convenabilă a amestecului de reacție.



De la malonodinitril, două căi de sinteză au fost exploatare, și anume:

- transformarea acestuia în izonitrozomalonodinitril (13), prin tratare cu acid azotos, urmat de trecerea într-o sare de amidă (14) la adăugarea carbonatului de guanidină. Ciclizarea termică, în prezența carbonatului de potasiu a intermediarului (14), conduce la 2,4,6-triamino-5-nitrozopiriridina (15) /436/.

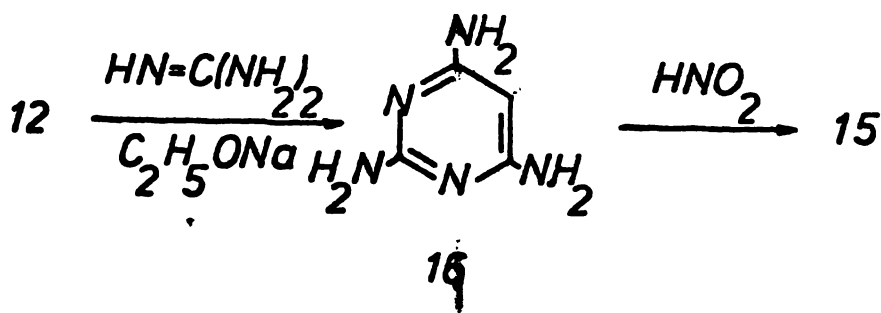


Am constatat că randamentul în compusul (14) nu variază în funcție de natura anionului din sarea de guanidină utilizată (Cl^- , NO_3^- , CO_3^{2-}).

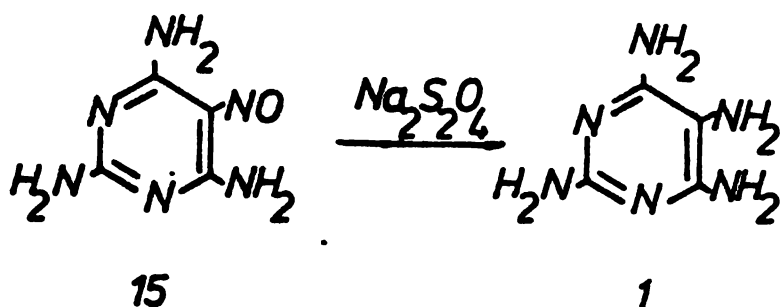
Procedeeul prezentat mai sus reprezintă o ameliorare a unuia

original, care prevedea separarea izonitrozomalonodinitrilului ca sare de argint, urmat de transformarea sa în sare de potasiu, înaintea tratării cu carbonat de guanidină, etape care, așa cum am constatat, nu și-au dovedit utilitatea /437,438/.

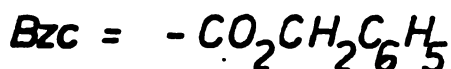
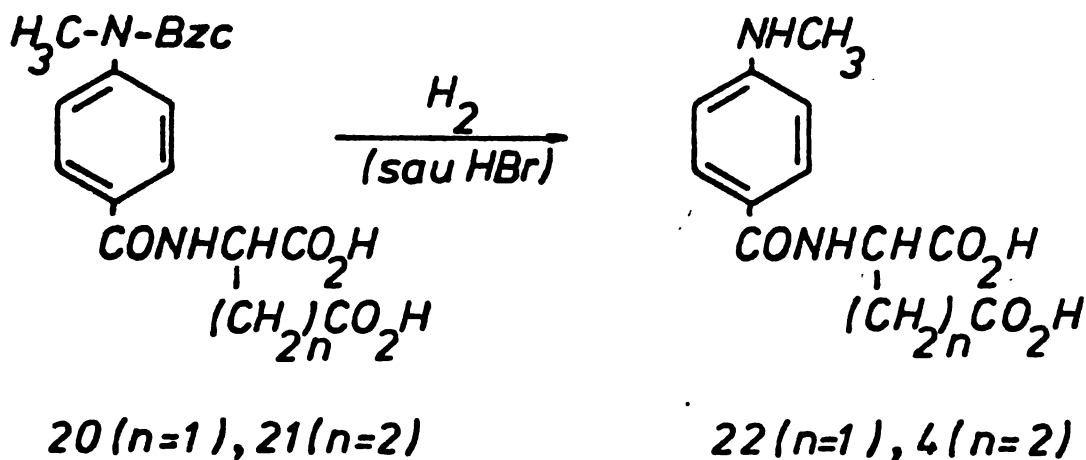
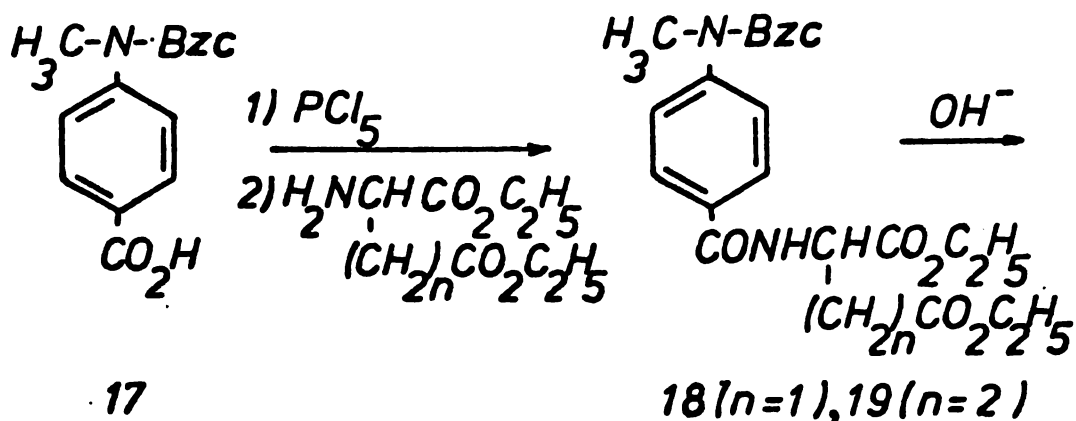
- ciclizarea la 2,4,6-triaminopirimidina (16) prin tratarea cu guanidină în prezența EtONa, urmat de nitrozarea acestuia la 2,4,6-triamino-5-nitrozopirimidină /432/.



Reducerea 2,4,6-triamino-5-nitrozopirimidinei (15) la diclorhidrat de 2,4,5,6-tetraaminopirimidină (1) s-a făcut de asemenea conform unor procedee cunoscute, utilizând în acest scop fie ditionitul de sodiu /427-429/, fie hidrogenarea catalitică (catalizator negrul de paladiu, la presiune și temperatură normală)/434/. Reducerea blândă a compusului (15), urmat de recristalizarea bisulfitei de tetraaminopirimidină astfel obținut din HCl dulce, cu randamente ridicate și reproductibile, la diclorhidrat de tetraaminopirimidină. Acest intermediar prezintă avantajul unei mai bune solubilități în apă, față de sulfatul de tetraaminopirimidină (menționat de obicei în literatură /524/). Se elimină astfel și operația de transformare (cu BaCl₂) a sulfatului în clorhidrat, ce precede reacția de sinteză a 2,4-diamino-6-hidroximetil-pteridinei.



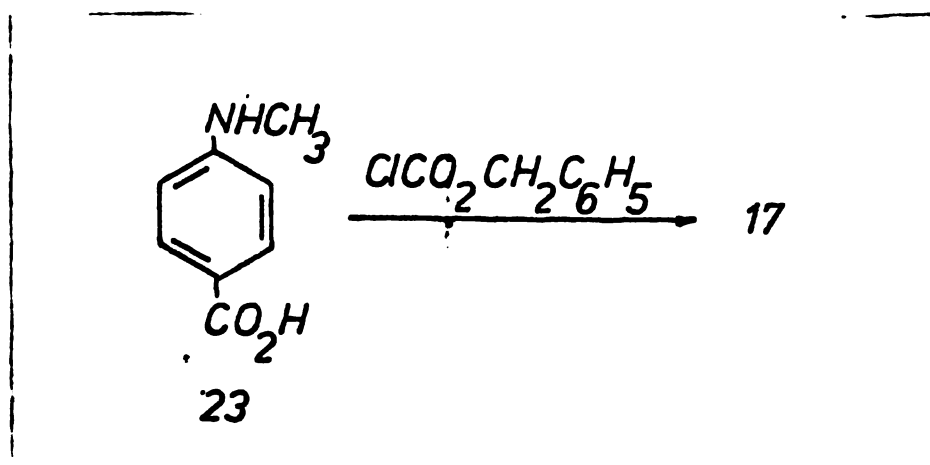
Acidul N[4-(metilamino)-benzoil]glutamic (aspartic) s-a sintetizat în linii generale după schema descrisă în literatură /456/:



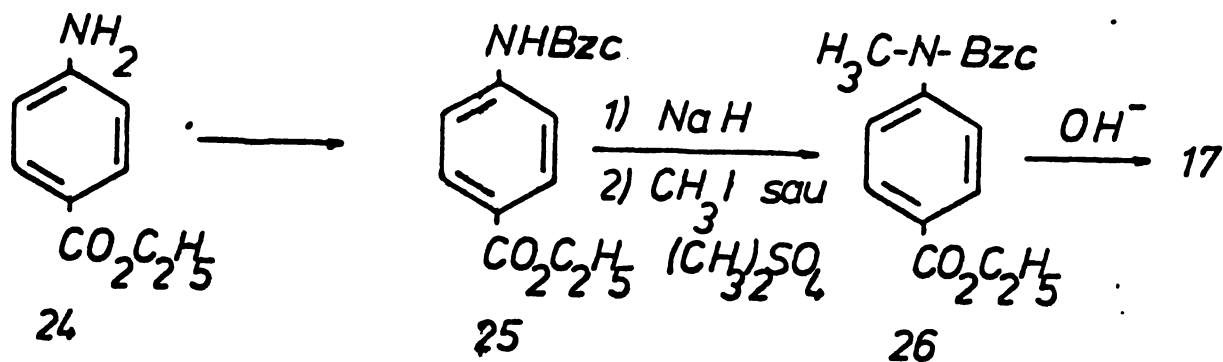
Clorura acidului 4-[metil(benziloxycarbonil)amino]benzoic este cuplată cu ester glutamic sau aspartic, după care esterii dipeptidelor respective (18,19) sînt hidrolizați (NaOH 1 N) la acizii N-benziloxycarbonilici corespunzători (20,21). Deprotejarea acestora se poate realiza fie prin bromoliză /456/ (cînd rezultă bromhidrații sub forma unor solide foarte higroscopice), fie prin hidrogenoliză (catalizator- paladiu pe cărbune 10%), reacția efectuîndu-se la temperatura și presiunea normală. Acest din urmă procedeu a fost aplicat pentru prima dată în laboratorul nostru la această clasă de compuși /524,527/. Rezultă astfel cu randamente ridicate, compuși (4,22) de înaltă puritate, sub forma unor solide ușor de manipulat.

Datele analitice ale noilor dipeptide sînt date în Tabel.2-5.

Acidul 4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoic (17) a fost preparat printr-un procedeu nou, ce constă în efectuarea reacției dintre acidul 4-(metilamino)benzoic (23) și cloroformiat de benzil în mediu de acid acetic-acetat de sodiu. Reacția în aceste condiții are avantajul reproductibilității /524,527/, comparativ cu vechiul procedeu Schotten-Baumann descris în literatură /456/.



Acest din urmă compus (17) a fost de asemenea obținut cu randamente mari la scară de laborator și prin metilarea N-benziloxicarbonil-anestezinei (25) cu iodură sau sulfat de metil, în prezența hidrurii de sodiu, în tetrahidrofuran sau eter. Hidroliza finală a esterului (26) conduce la produsul dorit.

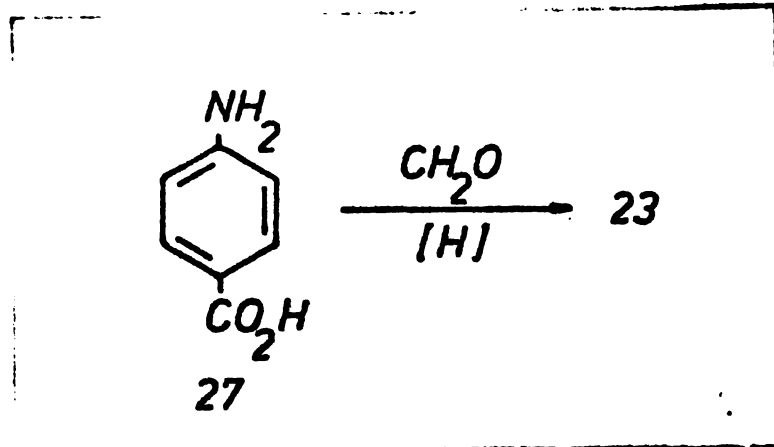


Acidul 4-(metilamino)benzoic (23) a fost preparat pe două căi, și anume:

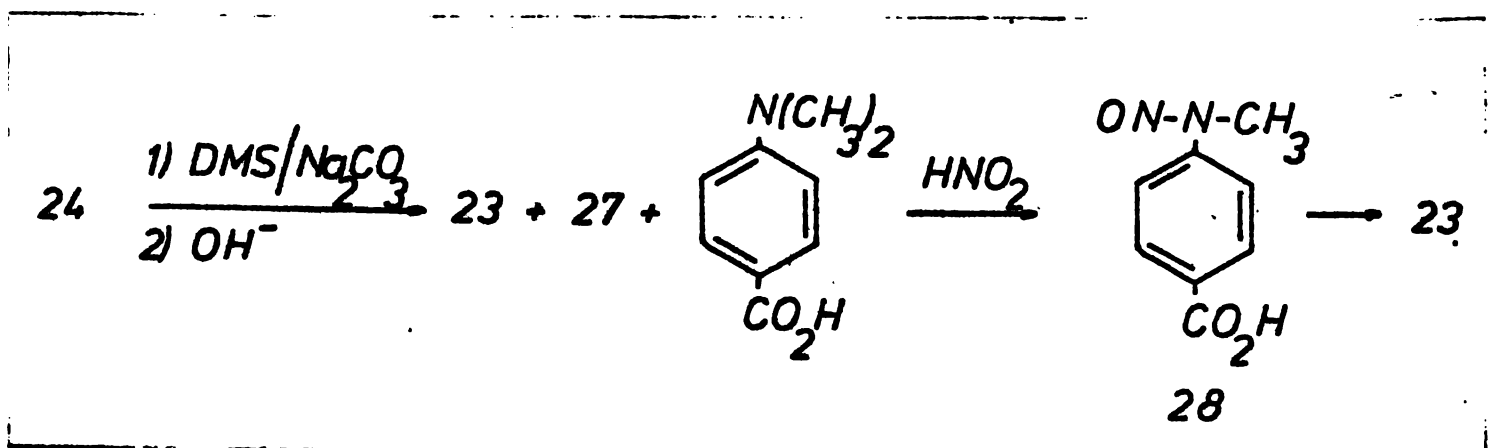
- prin metilarea acidului 4-aminobenzoic (27) cu formaldehidă în mediu puternic reducător (zinc și hidroxid de sodiu)/340/, dar reacția s-a dovedit nereproductibilă pe scară largă;

- printr-un procedeu ce constă în metilarea anestezinei (24) cu dimetilsulfat în soluție apoasă de carbonat de sodiu. Hidroliza amestecului de reacție se efectuează imediat, fără vreo purificare

intermediară, rezultând un amestec ce conține în proporții diferite



teți produșii de metilare posibili, ca și materia primă, și anume acidul 4-aminobenzoic, (27), 4-(metilamino)benzoic (23) și 4-(dimetilamino)benzoic. Prin tratarea acestui amestec cu acid azotos, precipită din mediu acidul 4-N-nitrozo-metilamino-benzoic (28), care astfel este separat de ceilalți produși. Indepărtarea grupei N-nitrozo se face apoi ușor prin reducere cu zinc și hidroxid de sodiu, randamentul global al acestei suite de reacții fiind de 40-45%. Acest procedeu, ce asigură acid 4-(metilamino)benzoic lipsit de acid 4-aminobenzoic, condiție foarte importantă pentru a evita contaminarea cu Aminopterina a produsului final, a fost pus la punct în laboratorul nostru /524/.



Esterii glutamic (L, D și DL) și aspartic (DL) au fost obținuți sub formă de clorhidrați prin două procedee, și anume:

- prin tratarea clorhidraților amino acizilor respectivi cu alcool etilic anhidru, saturat cu HCl gazos, uscat, urmat de îndepărtarea apei prin distilare la sec, după care procesul se reia de câteva ori. Final, esterii (sub formă de clorhidrați) precipită

Tabelul 2

N(Bzc)metilamino-benzoil-amino acid etil ester

Amino acidul	Formula brută	pt °C	Analiza elementară				R _f		
			Calculat	Găsit	C	H			
			C	H	N	C	H	N	
Glicina	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₅	-	64,86	5,95	7,57	64,64	5,89	7,83	0,72
DL-Alanina	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₅	76-7	65,63	6,25	7,29	65,84	6,64	7,31	0,87
β-Alanina	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₅	44-5	65,63	6,25	7,29	65,62	6,64	7,50	0,87
Sarcosina	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₅	-	65,63	6,25	7,29	65,20	6,32	7,45	0,79
Acid DL-α-aminobutiric	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	70-2	66,33	6,53	7,04	66,54	6,82	7,18	0,85
Acid γ-aminobutiric	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	74-5	66,33	6,53	7,04	66,05	6,75	7,17	0,80
DL-Valina	C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₅	-	66,99	6,80	6,80	67,48	6,69	6,43	0,76
L-Leucina	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅	-	67,61	7,04	6,57	68,15	7,54	6,28	0,90
L-Fenilalanina	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₅	60-2	70,43	6,09	6,09	70,49	6,30	5,73	0,88
Acid DL-aspartic	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	78-9	63,16	6,14	6,14	63,91	6,53	5,96	0,92
Acid D-Glutamic	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₅	66-7	63,83	6,38	5,96	64,21	6,73	5,95	0,82
Acid DL-Glutamic	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₅	86-7	63,83	6,38	5,96	64,33	6,75	5,93	0,82

Tabelul 3

N(Bzc)metilamino-benzoil-amino acid hidrazide

Amino acidul	Formula brută	pt °C	Analiza elementară				R _f		
			Calculat		Găsit				
			C	H	N	C	H	N	
Glicina	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄	134-6	60,67	5,62	15,73	60,83	5,88	15,50	0,61
DL-Alanina	C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₄	126-8	61,62	5,95	15,14	61,92	6,40	14,91	0,65
Acid γ-aminobutiric	C ₂₀ H ₂₄ N ₄ O ₄	123-5	62,50	6,25	14,58	62,86	6,74	14,58	0,45
DL-Valina	C ₂₁ H ₂₆ N ₄ O ₄	165-6	63,32	6,53	14,07	63,62	6,83	13,79	0,64
L-Leucină	C ₂₂ H ₂₈ N ₄ O ₄	138-9	64,08	6,80	13,59	63,86	6,71	13,61	0,70
L-Fenilalanina	C ₂₅ H ₂₆ N ₄ O ₄	122-4	67,26	5,83	12,56	67,79	6,16	12,51	0,68

Tabelul 4

N(Bzc)metilamino-benzoil amino acid

Amino acidul	Formula brută	pt °C	Analiza elementară			R _f			
			Calculat	Găsit	N				
			C	H	N				
Glicina	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₅	134-5	63,16	5,26	8,19	63,33	5,60	8,51	0,72
DL-Alanina	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₅	169-171	64,04	5,62	7,87	64,53	6,04	7,93	0,84
β-Alanina	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₅	104-6	64,04	5,62	7,87	64,49	6,09	7,88	0,78
Sarcosina	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₅	137-9	64,04	5,62	7,87	64,02	5,90	7,69	0,70
Acid DL-α-aminobutiric	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₅	120-2	64,86	5,95	7,57	65,23	6,35	7,27	0,84
Acid γ-aminobutiric	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₅	117-8	64,86	5,95	7,57	65,07	6,36	7,60	0,82
DL-Valina	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₅	123-5	65,63	6,25	7,29	65,87	6,47	7,10	0,79
L-Leucina	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	129-130	66,33	6,53	7,04	66,68	6,62	7,08	0,90
L-Fenilalanina	C ₂₅ H ₂₄ N ₂ O ₅	85-6	69,44	5,55	6,48	69,50	5,88	6,52	0,86
Acid DL-aspartic	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₇	106-7	57,42	5,26	6,70	57,41	5,47	6,32	0,64
Acid D-glutamic	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₇ · H ₂ O	138-141	58,33	5,55	6,48	58,68	5,63	6,39	0,70
Acid DL-glutamic	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₇ · H ₂ O	138-9	58,33	5,55	6,48	58,73	5,69	6,50	0,74

Tabelul 5

N-Metilamino-benzoil amino acid

Amino acidul	Formula brută brută	pt °C	Analiza elementară				R _f		
			Calculat		Găsit				
			C	H	N	C	H	N	
Glicina	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	178-180	57,69	5,77	13,46	57,21	5,95	13,11	0,69
DL-Alanina	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃	97-9	59,45	6,30	12,61	59,78	6,11	12,15	0,75
β-Alanina	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃ ·H ₂ O	66	55,00	6,67	11,66	55,23	7,11	11,60	0,75
Sarcosina	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃	133-5	59,45	6,30	12,61	59,60	6,70	12,65	0,65
Acid DL-α-aminobutiric	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	69-70	61,01	6,79	11,86	61,57	7,18	11,60	0,78
Acid γ-aminobutiric	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃ ·H ₂ O	42	56,69	7,09	11,02	56,90	7,09	11,24	0,76
DL-Valina	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃ ·H ₂ O	137	58,21	7,46	10,45	58,79	7,77	10,26	0,84
L-Leucina	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	87	63,64	7,58	10,61	64,18	8,01	10,37	0,86
L-Fenilalanina	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₃	80-2	68,45	6,04	9,40	68,22	6,38	9,34	0,80
Acid DL-aspartic	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₅ ·H ₂ O	114-9	50,70	5,64	9,86	50,30	6,18	9,85	0,58
Acid L-glutamic	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅	87-90	55,72	5,72	10,00	56,40	5,84	9,78	0,64
Acid D-glutamic	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅	90-3	55,72	5,72	10,00	56,28	6,00	9,85	0,64
Acid DL-glutamic	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅ ·H ₂ O	110-5	52,35	6,04	9,40	52,17	6,57	9,21	0,64

1
6
1

Tabelul 6

Esterii etilici ai amino acizilor (clorhidrați)

Amino acidul	Formula brută	pt °C	Solv. recr.	Analiza elementară			R _f estăr (amino acid)	α _D ²³ (H ₂ O)			
				Calculat	Găsit						
				C	H	N	C	H	N		
Glicina	C ₄ H ₉ N O ₂ .HCl	144-5	A	34,41	7,17	10,04	34,98	7,53	10,00	0,64 (0,29)	-
DL-Alanina	C ₅ H ₁₁ N O ₂ .HCl	80-2	B	39,09	7,82	9,12	38,63	7,62	9,19	0,67 (0,37)	-
β-Alanina	C ₅ H ₁₁ N O ₂ .HCl	56	B	39,09	7,82	9,12	39,30	7,42	9,04	0,66 (0,32)	-
Sarcosina	C ₅ H ₁₁ N O ₂ .HCl	122-4	C	39,09	7,82	9,12	39,10	8,12	9,01	0,61 (0,28)	-
Acid DL-α-aminobutiric	C ₆ H ₁₃ N O ₂ .HCl	148-50	C	42,99	8,36	8,36	43,18	7,79	8,28	0,71 (0,45)	-
Acid γ-aminobutiric	C ₆ H ₁₃ N O ₂ .HCl	63-5	B	42,99	8,36	8,36	43,22	8,05	8,47	0,67 (0,45)	-
DL-Valina	C ₇ H ₁₅ N O ₂ .HCl	98-100	B	46,28	8,82	7,72	46,71	9,05	7,57	0,80 (0,60)	-
L-Leucina	C ₈ H ₁₇ N O ₂ .HCl	126-8	B	49,12	9,21	7,16	48,98	8,97	7,11	0,81 (0,65)	+9,8°
L-Fenilalanina	C ₁₁ H ₁₅ N O ₂ .HCl	148-50	C	57,53	6,97	6,10	57,71	7,43	5,90	0,80 (0,66)	-7°
Acid DL-aspartic	C ₈ H ₁₅ N O ₄ .HCl	87-9	C	42,58	7,10	6,21	42,46	7,57	6,31	0,75 (0,34)	-
Acid L-Glutamic	C ₉ H ₁₇ N O ₄ .HCl	107-9	C	45,10	7,52	5,85	45,61	7,71	5,67	0,72 (0,26)	+22,5°
Acid D-Glutamic	C ₉ H ₁₇ N O ₄ .HCl	110-11	C	45,10	7,52	5,85	44,66	7,32	5,86	0,72 (0,26)	-20,5°
Acid DL-glutamic	C ₉ H ₁₇ N O ₄ .HCl	73-5	C	45,10	7,52	5,85	44,65	7,46	5,94	0,72 (0,26)	-

A- alcool etilic; B- acetat de etil; C- cloroform-eter.

la triturare cu eter sau la adăugarea eterului la soluția acestora în cloroforr. Procedul aplicat (conform datelor de literatură) prezintă unele dezavantaje majore și anume: nereproductibilitate, randamente variabile, greutatea saturării alcoolului cu acid clorhidric gazos, în special în cazul preparării unor cantități mari de esteri /460-464/.

- esterificarea în sistem semicontinuu, cu îndepărtarea azeotropă a apei de reacție. Reacția se efectuează în blazul unei coloane de rectificare, folosind drept catalizator acidul p-toluen-sulfonic, apa de reacție fiind îndepărtată continuu pe la capul coloanei ca azeotrop ternar apă-alcool-benzon. Acest procedeu original, pus la punct în laboratorul nostru, înlătură toate dezavantajele arătate anterior /529,530/.

Trebuie menționat că procedul descris mai sus pentru sinteza Methotrexatului (denumire românească- Antifolan) este aplicat la scară pilot în Institutul Oncologic București.

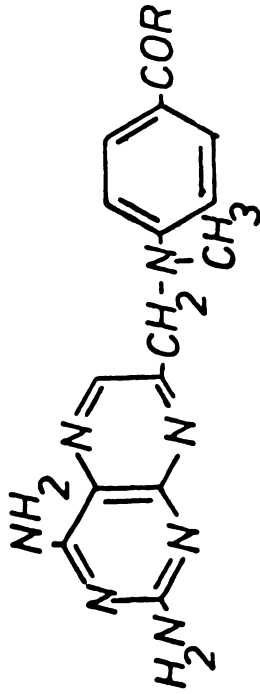
2. Sinteza acidului N[4-[metil-(2',4'-diamino-pteridinil-7'-metil)amino]benzoil]glutamic (7-L-MTX, 7, MAB-L-Glu, 6)

Pentru a verifica ipoteza obținerii unui amestec de izomeri (6- și 7-MTX) prin utilizarea 1,1,3-tricloroacetonei în cadrul procedului Berezovskii /348/, precum și în vederea studiilor privind relațiile structură chimică-activitate biologică în această clasă, s-au întreprins încercări de sinteză a 7-MTX, lipsit de izomerul 6.

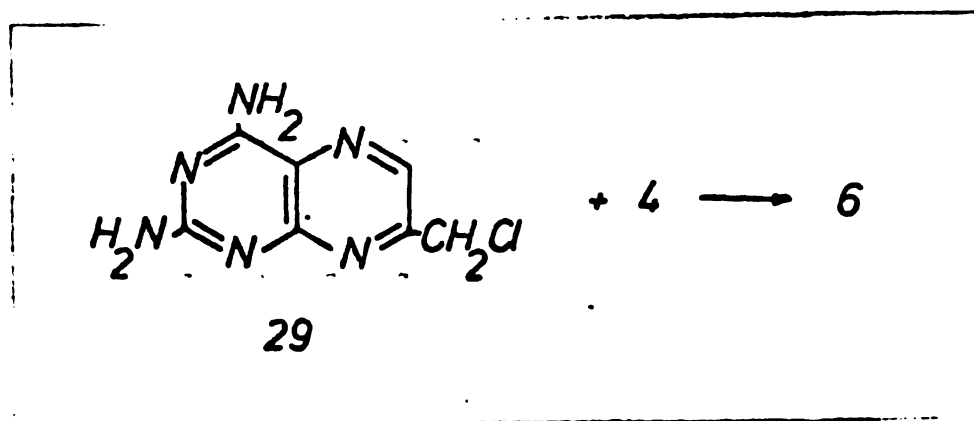
Intermediarul cheie în această sinteză este 2,4-diamino-7-clororetil-pteridina (29), care condensată cu acid N[4-(metilamino)benzoil]glutamic (4) în condițiile descrise pentru 6-MTX conduce la produsul dorit (6) /520,521/.

Tabelul 7

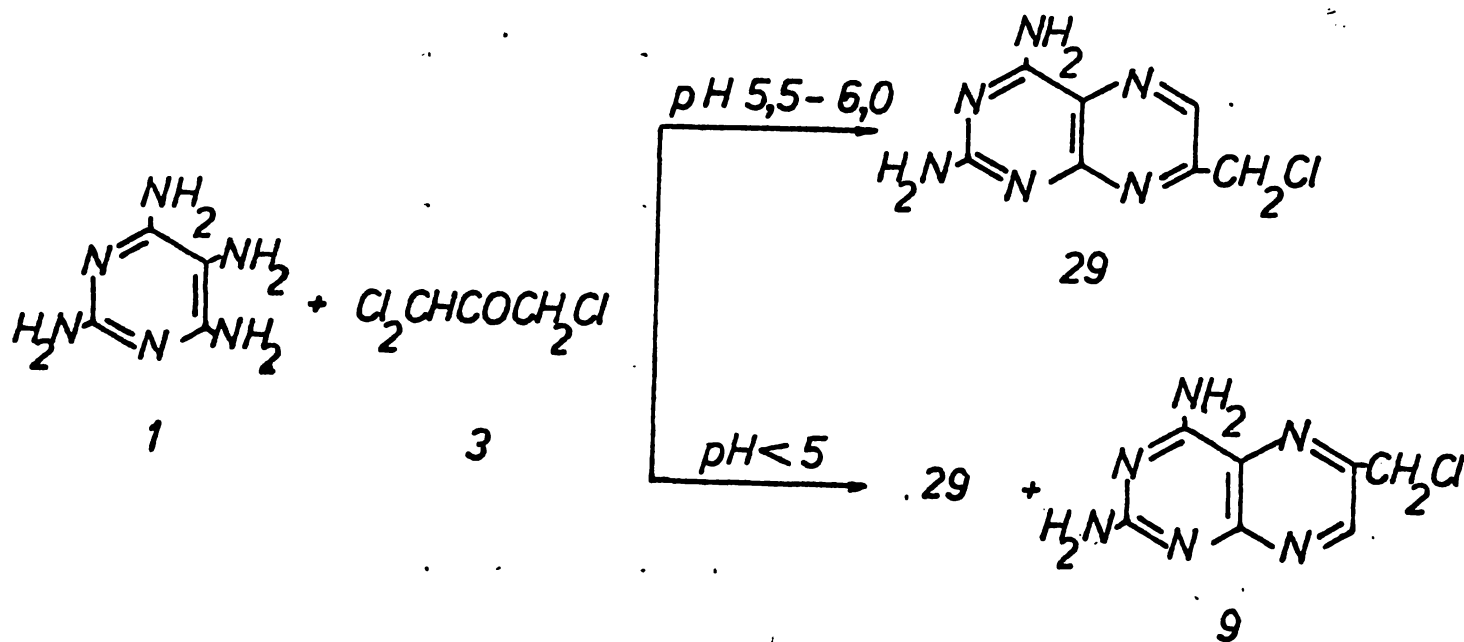
Analogi dipeptidici 7-substituiți.



Amino acidul terminal	Formula brută	pt °C	Calculat			Analiza elementară			R _f
			C	H	N	C	H	N	
Glicina	C ₁₇ H ₁₈ N ₈ O ₃ ·2H ₂ O	244 desc.	48,80	5,26	26,79	48,45	5,26	26,22	0,42
Acid DL-aspartic	C ₁₉ H ₂₀ N ₈ O ₅ ·H ₂ O	>305	50,00	4,82	24,56	50,03	5,12	24,85	0,63
Acid L-glutamic	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅ ·2H ₂ O	203	48,98	5,31	22,86	48,59	5,30	23,19	0,60
Acid D-glutamic	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅ ·2H ₂ O	200	48,98	5,31	22,86	48,70	5,61	22,14	0,51
Acid DL-glutamic	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅ ·H ₂ O	208-12	50,85	5,09	23,73	50,05	5,45	23,45	0,64



2,4-Diamino-7-clorometil-pteridina (29) (necunoscută în literatură) a fost obținută prin condensarea 2,4,5,6-tetraaminopirimidinei (1) cu 1,1,3-tricloroacetonă (3). În această reacție, condițiile de pH sînt critice. Astfel, la pH 5,5-6,0 se formează exclusiv izomerul 7, în timp ce la pH < 5,0 rezultă un amestec de 2,4-diamino-6- (2) și -7-clorometil-pteridină (29), fapt dovedit prin oxidarea și hidroliza produsului de reacție.



7-MTX (6) preparat și caracterizat pentru prima oară în laboratorul nostru (vezi Tabelul 7) ne-a confirmat ipotezele emise asupra procedurii Berezovskii /520-522/.

Ulterior, structura 6-MTX și 7-MTX a fost confirmată și prin spectroscopie R.M.N.

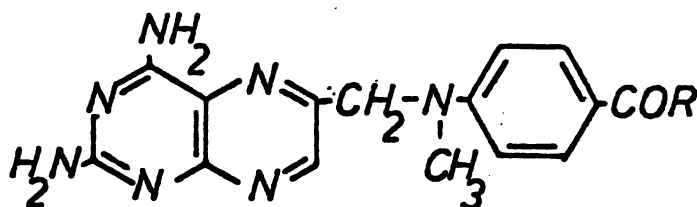
Utilizînd în reacția de condensare cu 2,4-diamino-7-clorometil-pteridina acizii N[4-(metilamino)benzoil]-D- și -DL-glutamic și -DL-aspartic, s-au preparat 7-D- și 7-DL-MTX, precum și acidul

N{4-[metil-(2',4'-diamino-pteridinil-7'-metil)amino] benzoil} -DL-aspartic (7, MAB-DL-Asp, 32). Purificarea acestor compuși s-a făcut asemănător cu cea a 6-MTX /524/.

Datele analitice ale noilor compuși sintetizați sînt prezentate în Tabelul 7.

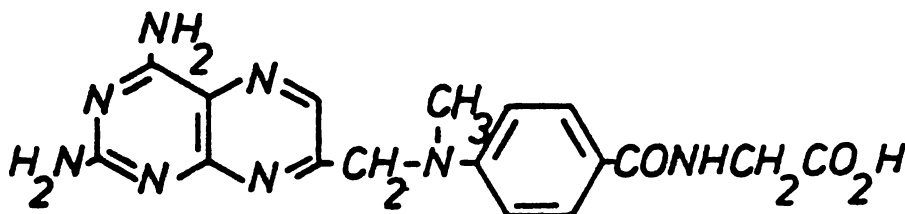
3. Sinteza analogilor dipeptidici ai acidului folic.

Au fost sintetizați /531/ următorii compuși cu formula generală:

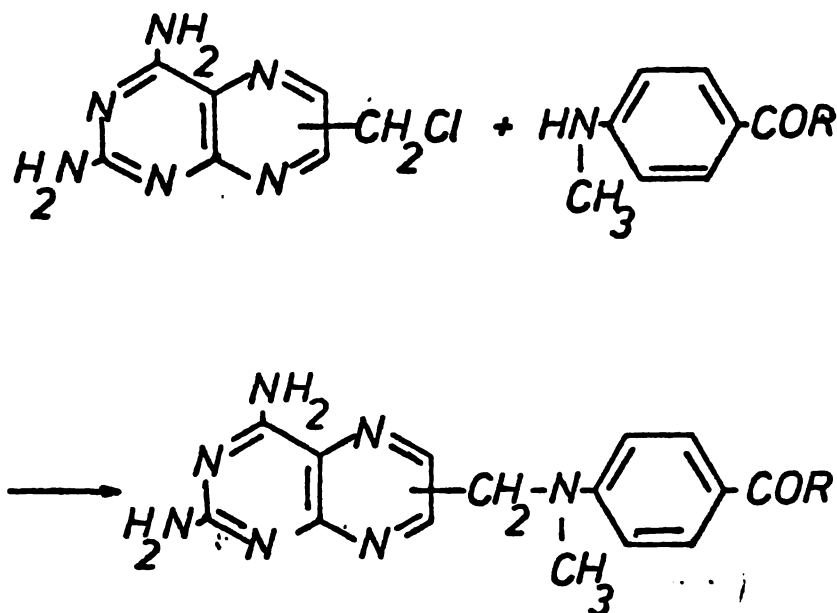


Compusul	R	Amino acidul terminal
6, MAB-Gly (33)	NHCH ₂ CO ₂ H	glicina
6, MAB-DL-Ala (34)	NHCH(CH ₃)CO ₂ H	DL-alanina
6, MAB-β-Ala (35)	NH(CH ₂) ₂ CO ₂ H	β-alanină
6, MAB-Sar (36)	N(CH ₃)CH ₂ CO ₂ H	sarcosina
6, MAB-DL-Abu (37)	NHCH(CH ₂ CH ₃)CO ₂ H	DL-amino-butiric
6, MAB-γ-Abu (38)	NH(CH ₂) ₃ CO ₂ H	γ-amino-butiric
6, MAB-DL-Val (39)	NHCH[CH(CH ₃) ₂]CO ₂ H	DL-valina
6, MAB-L-Leu (40)	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO ₂ H	L-leucina
6, MAB-L-Phe (41)	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO ₂ H	L-fenilalanina

precum și 7, MAB-Gly (42) :



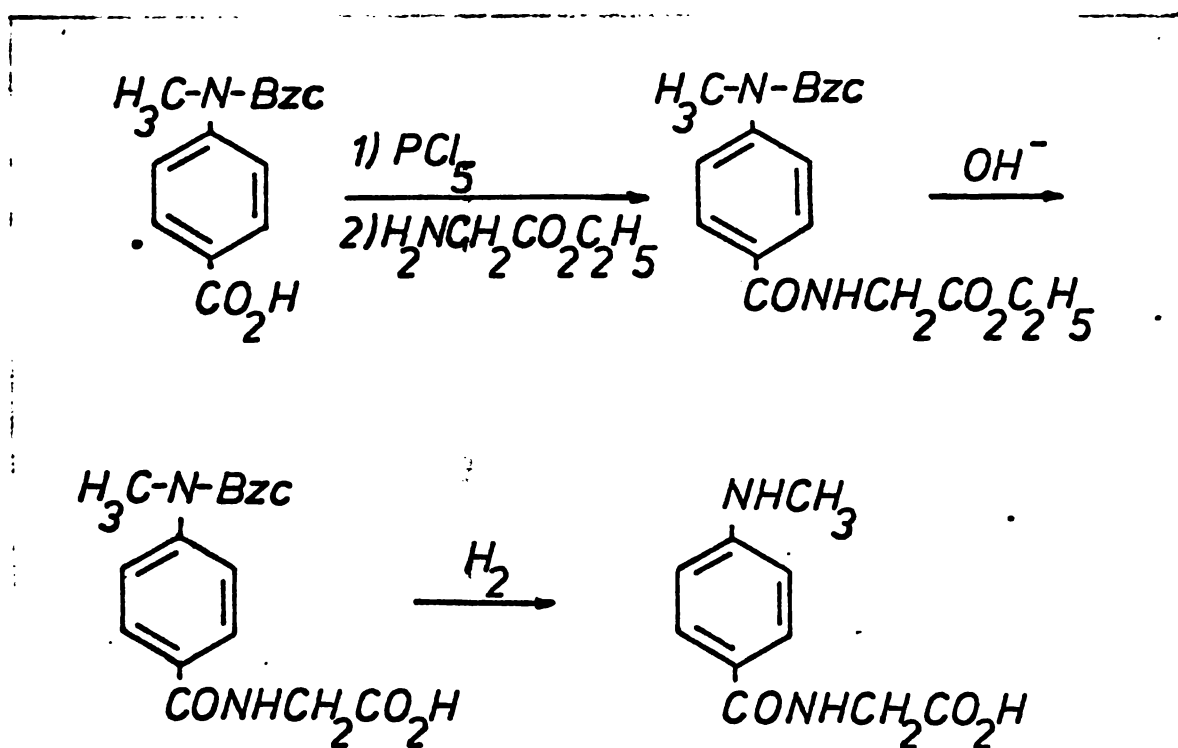
Procedeul general de lucru este cel descris la sinteza Methotrexatului și constă în condensarea 2,4-diamino-6- (sau 7-) -clorometil-pteridinei cu peptidele corespunzătoare în mediu apos, la pH 7,5, menținut prin adăugare intermitentă de bicarbonat de sodiu solid.



Purificarea produșilor rezultați din această reacție se realizează în general prin cromatografiere pe coloană de celuloză, în condițiile descrise anterior. Excepție fac compușii 6,MAB-β-Ala (35) și 6,MAB-δ-Abu (38), la care purificarea se realizează prin transformarea lor în săruri de magneziu (cu oxid de magneziu), recristalizarea acestora din apă și retransformarea lor în acizii liberi. De altfel, de slaba solubilitate a sărurilor de sodiu a acestor doi compuși (35,38) trebuie să se țină seama chiar la sintetizarea lor, preferându-se menținerea pH-ului la 7,5 cu bicarbonat de amoniu și verificând prezența produsului final nu numai în soluția mură a amestecului de reacție, ci și în precipitatul rămas după filtrare, constând în cea mai mare parte din hidroximetil-pteridină.

Datele analitice ale noilor compuși sintetizați sînt prezentate în Tabelele 1 și 7.

Dipeptidele corespunzătoare se prepară /531/ de asemenea după procedeul descris anterior, de exemplu în cazul glicinei:



Purificarea esterilor de dipeptide se realizează din acetat de etil-eter de petrol iar cea a peptidelor N-benziloxicarbonilate prin extracția soluției lor în acetat de etil cu bicarbonat de sodiu aq. saturat. Din aceasta se precipită apoi prin acidulare, dipeptidele N-benziloxicarbonilate.

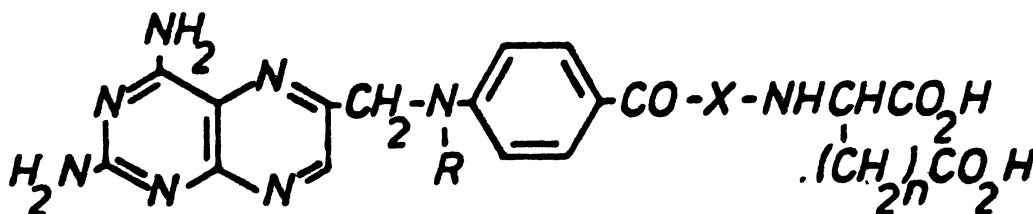
Deoarece mulți esteri de dipeptide N-benziloxicarbonilate rezultă ca uleiuri, pentru caracterizarea lor corespunzătoare au fost transformate în derivați hidrazidici prin tratare cu hidrat de hidrazină.

Datele analitice ale tuturor dipeptidelor sintetizate sînt prezentate în Tabelele 2-5.

Esterii etilici ai amino acizilor /530,531/ (sub formă de clorhidrați) au fost preparați folosind metoda descrisă în cazul esterilor glutamic și aspartic, ce permite obținerea constantă de randamente superioare (85-90%). Sfîrșitul reacției se determină prin cromatografierea unei probe din blaz, comparativ cu materia primă (TLC Kieselgel, n-BuOH-AcOH-AcOEt-H₂O 1:1:1:1, dezvoltarea cu soluție alcoolică de ninhidrină 0,2%). Pentru probele analitice, esterii pot fi recristalizați din sistemele reacționate în Tabelul 6 (în care se prezintă și datele analitice respective).

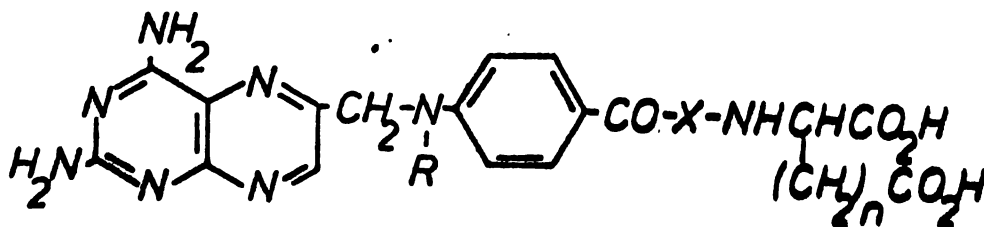
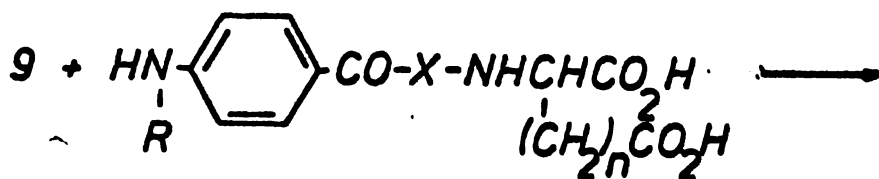
4. Sinteza analogilor tripeptidici ai acidului folic.

Au fost preparați /532/ următorii compuși cu formula generală:



Corpusul	R	n	X	Amino acidul intercalat
6,AB-Gly-L-Glu(43)	H	2	NHCH ₂ CO	glicina
6,AB-Gly-DL-Asp(44)	H	1	NHCH ₂ CO	glicina
6,AB-Gly-L-Glu(45)	CH ₃	2	NHCH ₂ CO	glicina
6,AB-Gly-DL-Asp(46)	CH ₃	1	NHCH ₂ CO	glicina
6,AB-DL-Ala-L-Glu(47)	CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	DL-alanina
6,AB-Sar-L-Glu(48)	CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	sarcosina
6,AB-L-Leu-L-Glu(49)	CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	L-leucina
6,AB-L-Phe-L-Glu(50)	CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L-fenil-alanina
6,AB-L-Phe-DL-Asp(51)	CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L-fenil-alanina

S-a adoptat și aici procedeul general de sinteză descris la prepararea 6-MTX și anume condensarea dintre 2,4-diamino-6-clorometil-pteridină și tripeptidele respective, în mediu apos la pH 7,5 ,

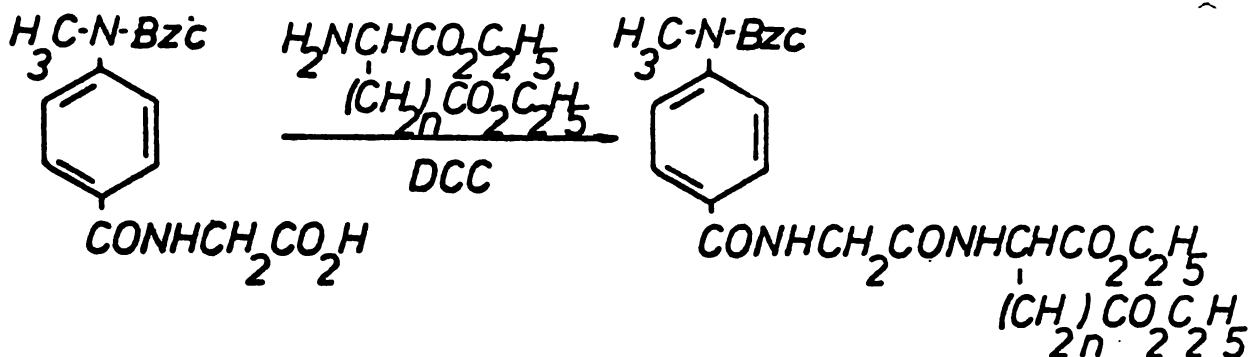


valoarea acestuia fiind menținută constantă prin adăugare de bicarbonat de sodiu solid.

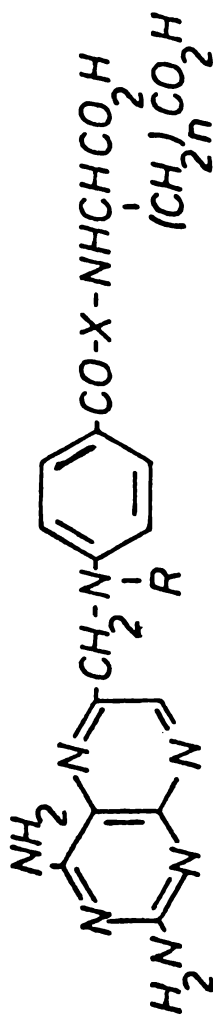
Purificarea acestor compuși este dependentă de natura radicalului R. Astfel, când $R = CH_3$, se aplică procedeul descris anterior de cromatografie pe coloană de celuloză, eluind cu tampon fosfat disodic pH 7,0. Alegerea fracțiilor ce conțin produsul dorit se face pe baza datelor cromatografice (cromatografie pe hîrtie Whatman Nr.1, descendent, eluind cu același tampon).

În schimb, când $R = H$, deoarece valoarea R_f a analogilor MTX scade mult, suprapunîndu-se peste zona pteridinelor ce-i impurifică, prima cromatografie pe coloană de celuloză este urmată de o a doua trecere pe coloană de Sephadex G-10 (eluent- apa), prelucrarea fracțiilor făcîndu-se în mod obișnuit. Purificarea pe coloană de Sephadex G-10 este justificată de existența unor diferențe apreciabile de greutate moleculară între 6-hidroxi-metil-pteridină (principala impuritate a produsului final, $M = 184$) și analogii tripeptidici ($M = 500+700$).

Prepararea peptidelor /532/ se face puțin deosebit de procedeul descris anterior, în sensul că se utilizează dicitclohexilcarbodiimida (DCC) drept agent de condensare. Reacția se efectuează în acetat de etil, acetat de etil-dimetilformamidă sau tetrahidrofuran (THF). Procedeul reclamă utilizarea esterului glutamic (aspartic) sub formă de bază liberă, aceștia obținîndu-se prin tratarea suspensiei clorhidraților respectivi în acetat de etil cu



Analogi tripeptidici ai Methotrexatului



R	n	X	Formula brută	pt °C	Calculat			Analiza elementară Găsit			R _f
					C	H	N	C	H	N	
H	1	NHCH ₂ CO	C ₂₀ H ₂₁ N ₉ O ₆ ·2H ₂ O	> 300	46,24	4,82	24,27	46,68	5,19	24,14	0,20
H	2	NHCH ₂ CO	C ₂₁ H ₂₃ N ₉ O ₆ ·H ₂ O	210 desc	48,93	4,85	24,46	49,20	4,50	24,26	0,21
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	C ₂₁ H ₂₃ N ₉ O ₆ ·2H ₂ O	> 310	47,28	5,07	23,64	47,65	5,10	23,90	0,68
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	C ₂₂ H ₂₅ N ₉ O ₆ ·2H ₂ O	240	48,26	5,30	23,03	48,88	5,78	22,81	0,68
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	C ₂₃ H ₂₇ N ₉ O ₆ ·2H ₂ O	195-7	49,20	5,53	22,45	50,23	5,91	22,37	0,64
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	C ₂₃ H ₂₇ N ₉ O ₆ ·2H ₂ O	186-8	49,20	5,53	22,45	49,48	5,33	22,28	0,70
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	C ₂₆ H ₃₃ N ₉ O ₆	185-7	55,03	5,82	22,22	55,29	6,27	21,70	0,66
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	C ₂₈ H ₂₉ N ₉ O ₆ ·2H ₂ O	cca. 210	53,93	5,30	20,22	54,41	5,24	19,50	0,64
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	C ₂₉ H ₃₁ N ₉ O ₆ ·H ₂ O	230-5	56,22	5,33	20,36	56,60	5,53	20,60	0,65

trietilamină și evaporarea solventului. După filtrarea diciclohexilureei (DCU), soluția de peptidă în acetat de etil (în cazul în care reacția s-a efectuat în THF, solventul se evaporă la sec, sub vid, iar peptida se reia cu acetat de etil) se spală cu HCl 1 N (eventual se filtrează DCU formată din excesul de DCC), apă, soluție apoasă, saturată de NaHCO_3 și din nou cu apă. Concentrarea soluției și adăugarea eterului de petrol duce la separarea peptidei. Repetarea purificării, sau în unele cazuri trecerea pe coloană cromatografică de oxid de aluminiu bazic (eluent- alcoolul metilic absolut) conduce la produse de puritate analitică. În cazul N-benzil(benziloxycarbonil)amino]benzoil]glicil-L-glutaratului de dietil, reacția de sinteză este prezentată mai sus (pag.75).

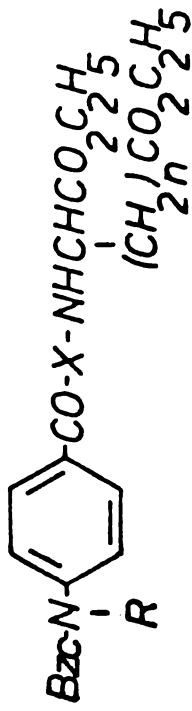
Hidroliza soluției metanolice de ester se conduce în mod obișnuit (intii la 0° , apoi la temperatura camerei) cu NaOH 1 N, determinând cromatografic sfârșitul reacției (TLC, Kieselgel, eluent: $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ 4:1:1). După diluare cu apă și acidulare (pH 2), produsul final care depune se purifică prin dizolvare în acetat de etil, extracție cu NaHCO_3 aq. saturat, separarea stratului apos, agitarea acestuia cu cărbune timp de 12 h, filtrare și precipitare cu acid clorhidric.

În sfârșit, hidrogenoliza tripeptidelor N-benziloxycarbonilate în soluție de metanol, la temperatură și presiune normală, cu catalizator paladiu pe cărbune 10% conduce la tripeptidul final, care se separă sub forma unor solide albe, lamelare, după filtrarea catalizatorului și îndepărtarea solventului prin distilare în vid. Sfârșitul reacției se determină cu ajutorul soluției de hidroxid de bariu (ce indică absența CO_2 în hidrogenul din vasul de reacție)

Datele analitice ale noilor compuși preparați (tripeptide și analogi tripeptidici de MTX) sînt prezentate în Tabelele 8-11.

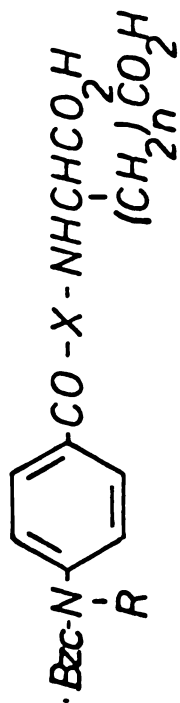
Tabelul 9

Esteri tripeptide N-benziloxycarbonilate



R	n	X	Formula brută	pt °C	Analiza elementară			R _f			
					Calculat	Găsit					
			C	H	N	C	H	N			
H	1	NHCH ₂ CO	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₈	139-40	60,12	5,81	8,42	60,10	6,00	8,43	0,78
H	2	NHCH ₂ CO	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₈	68	60,82	6,04	8,18	61,31	6,55	8,20	0,77
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₈	-	60,82	6,04	8,18	60,32	6,38	8,20	0,70
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₈	-	61,48	6,26	7,97	61,88	6,82	7,84	0,69
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₈	-	62,11	6,47	7,76	62,60	6,68	7,60	0,80
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₈	-	62,11	6,47	7,76	62,44	6,80	7,60	0,80
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	C ₃₁ H ₄₁ N ₃ O ₈	72-4	63,81	7,03	7,20	64,14	7,48	7,35	0,66
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	C ₃₃ H ₃₇ N ₃ O ₈	93-4	65,67	6,14	6,97	65,89	6,60	6,97	0,67
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	C ₃₄ H ₃₉ N ₃ O ₈	102-4	66,13	6,32	6,81	66,07	6,48	6,81	0,66

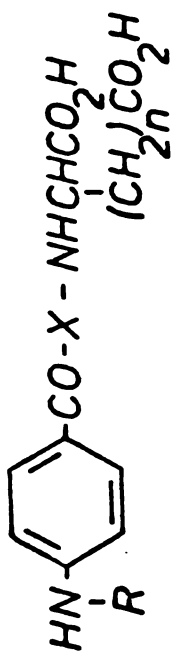
Tripeptide N-benziloxycarbonilate.



R	n	X	Formula brută	pt °C	Analiza elementară			R _f			
					Calculat	Găsit	N				
			C	H	C	H	N				
H	1	NHCH ₂ CO	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₈	198-200	56,88	4,74	9,48	57,18	5,08	9,57	0,57
H	2	NHCH ₂ CO	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₈ ·H ₂ O	170-2	55,58	5,26	8,84	55,92	5,03	8,74	0,63
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₈	161-3	57,77	5,03	9,19	57,96	5,26	9,15	0,57
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	C ₂₃ H ₂₅ N ₃ O ₈ ·H ₂ O	89-91	56,85	5,52	8,58	56,96	5,84	8,47	0,61
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₈	81-2	59,38	5,57	8,66	59,14	5,89	8,80	0,67
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₈	137-9	59,38	5,57	8,66	60,00	6,01	8,47	0,65
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₈ ·H ₂ O	108-110	59,45	6,42	7,71	59,83	6,62	7,63	0,80
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	C ₂₉ H ₂₉ N ₃ O ₈ ·H ₂ O	168-171	61,59	5,49	7,44	62,04	5,51	7,24	0,72
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	C ₃₀ H ₃₁ N ₃ O ₈	90-2	64,17	5,53	7,49	64,39	5,66	7,54	0,77

Tabelul 11

Tripeptide



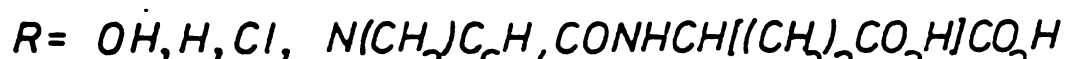
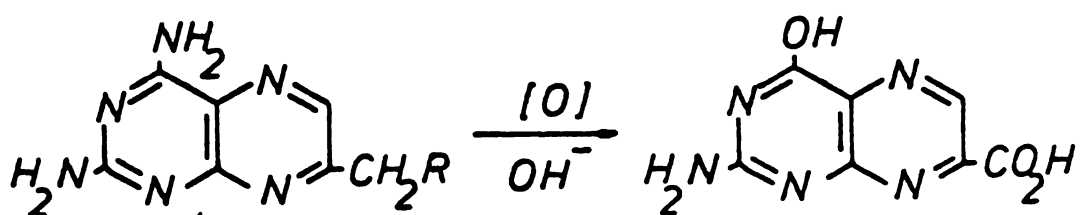
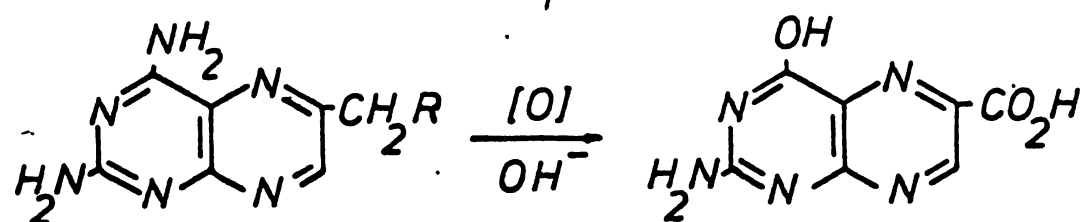
R	n	X	Formula brută	pt °C	Analiza elementară						R _f
					Calculat			Găsit			
					C	H	N	C	H	N	
H	1	NHCH ₂ CO	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₆ ·H ₂ O	122-5	47,71	5,20	12,84	48,01	5,68	12,86	0,35
H	2	NHCH ₂ CO	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₆ ·H ₂ O	138-40	49,26	5,57	12,32	49,61	5,89	12,49	0,43
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₆ ·H ₂ O	127-30	49,26	5,57	12,32	49,82	6,01	12,08	0,36
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	C ₁₅ H ₁₉ N ₃ O ₆ ·H ₂ O	102-5	50,70	5,72	11,83	50,77	6,38	11,66	0,55
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₆ ·H ₂ O	134-6	52,03	6,23	11,38	52,02	6,44	11,40	0,62
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	C ₁₆ H ₂₁ N ₃ O ₆	85-8	54,90	5,71	12,00	54,58	6,26	12,02	0,55
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	C ₁₉ H ₂₇ N ₃ O ₆ ·H ₂ O	165-8	55,47	7,06	10,22	55,91	7,40	10,35	0,73
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₆	132	61,02	5,57	10,16	61,37	6,19	10,16	0,61
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₆ ·H ₂ O	106	59,33	6,07	9,44	59,61	6,49	9,35	0,71

III. DETERMINARI STRUCTURALE ALE NOILOR COMPUSI.

1. Reacții de degradare.

S-a menționat în capitolele precedente că la închiderea ciclului pteridinic pornind de la o 4,5-diaminopirimidină, există posibilitatea apariției de izomeri de poziție, adică a compușilor 6 și/sau 7-substituiți. Literatura furnizează numeroase exemple în acest sens. În cazul MTX, această posibilitate a fost pentru prima oară pusă în evidență de către noi la evaluarea procedurii Berezovskii de preparare a MTX /348/. Ulterior, am precizat că pH-ul la care se efectuează reacția între 2,4,5,6-tetraaminopirimidină și 1,1,3-tricloracetonă este critic, din punct de vedere al produșilor de reacție rezultați, arătând că nu este posibil ca pe această cale să se formeze izomerul 6-substituit pur /533/.

O primă verificare experimentală a acestor afirmații s-a făcut prin oxidarea și hidroliza compușilor 6- și 7-substituiți rezultați



din diverse reacții de condensare /340,493/. Această reacție conduce la acizii 2-amino-4-hidroxi-pteridinil-6 (și/sau 7)-carboxilici, ușor de separat cromatografic /533/ și de identificat spectrofotometric în u.v. /340/, fiind cunoscuți în literatura de specialitate. Datele analitice ale acizilor pteridinil-carboxilici sînt prezentate mai jos.

Tabelul 12

Caracteristici analitice ale acizilor pteridinil-
-6(și 7)-carboxilici.

Compus	R_f ¹⁾	Fluorescența spotului. (λ 360 nm)	λ (nm) KOH 0,1 N
7	0,15	albastră	263,363
8	0	verde	257,371

1) Cromatografie pe hirtie, eluent- BuOH-AcOH-HCOOH-H₂O 1:1:1:1

Aceste reacții de degradare, aplicate produșilor de reacție obținuți prin diverse procedee de preparare a Methotrexatului, ne-au permis fundamentarea următoarelor concluzii:

- procedeeul Seeger /1/ (cu 2,3-dibrompropionaldehidă) conduce exclusiv la formarea izomerului 6, anume 6, MAB-Glu;

- procedeeul lui Berezovskii /348/ (cu 1,1,3-tricloracetona) generează un amestec al celor doi izomeri, 6, MAB-Glu și 7, MAB-Glu (ultimul fiind în proporție de cca.40%, conform datelor de activitate biologică);

- prin condensarea tetraaminopirimidinei cu 1,3-dihidroxiacetona, în condițiile expuse în partea experimentală, se formează exclusiv 2,4-diamino-6-hidroximetil-pteridină;

- prin condensarea tetraaminopirimidinei cu 1,1,3-tricloracetona la pH 5,5-6,0 se formează exclusiv 2,4-diamino-7-clorometil-pteridină.

Aceste concluzii au fost confirmate ulterior prin spectrometrie R.M.N.

2. Spectre R.M.N.

Spectrometria de-rezonanță magnetică nucleară a fost larg utilizată pentru studii structurale în clasa pteridinelor /534-547/. De o mare importanță, legat de domeniul antifolicelor, a fost demonstrarea, prin această metodă, că acidul dihidrofolinic (DHF) este de fapt acid 7,8-dihidrofolinic /538/. De asemenea, s-a arătat că grupa N¹⁰-metil în acidul 10-metil-folic nu pare să împiedice rotația în jurul legăturii C-N, aceasta fiind consecință a asocierii moleculare /538/.

În ceea ce ne privește, studiile R.M.N au ajutat la lămurirea și totodată confirmarea poziției restului peptidic pe nucleul pteridinic. Datele de literatură /534,538,547/ indică că deplasarea chimică δ (ppm) a protonilor C₆-H este mai mică decât a protonilor C₇-H. Rezultatele obținute din studiul izomerilor 6 și 7 ai Methotrexatului sînt reproduse mai jos.

Tabelul 13

Deplasările chimice (C₇-H și C₆-H)
în analogii de Methotrexat

Compusul	δ (ppm)
6, PAR-L-Glu (C ₇ -H)	9,01 (1H, s) ^{a)}
7, PAR-L-Glu (C ₆ -H)	8,51 (1H, s) ^{a)}
7, PAR-DL-Asp (C ₆ -H)	8,21 (1H, s) ^{b)}

^{a)} în DMSO-d₆; ^{b)} în DMSO.

Se observă concordanța cu rezultatele prezentate în literatură și de asemenea cu cele obținute prin degradare chimică. Aceste date au permis să se aprecieze corectitudinea căilor de sinteză alese pentru cele două serii de compuși 6- și 7-substituiți pe nucleul pteridinic.

3. Spectre de masă.

S-au efectuat spectrele de masă ale 6, MAB-L-Glu și 7, MAB-L-Glu. Datorită joasei volatilități a acestor compuși, picul molecular nu apare, iar domeniul $m/e < 160$ nu este concludent pentru scopuri analitice.

4. Spectre de ultraviolet.

4.1. Peptide.

Sînt cunoscute numeroase încercări de corelare a structurii peptidelor și proteinelor cu spectrele lor u.v. Dintre primele, se pot cita cele ale lui Anslow și Nassar /548/ care au atribuit banda de la 280 nm, observată în spectrul unor proteine naturale, absorbției legăturii peptidice. Ulterior s-a demonstrat că banda respectivă caracterizează absorbția cromoforului fenilic din amino acizii aromatici (fenilalanină, tirozină, triptofan) /549-551/ conținuți în proteina respectivă. Conform datelor actuale, absorbția legăturii peptidice este caracterizată printr-o bandă situată la cca. 200 nm, atunci cînd nu suferă conjugare /552-555/.

Cromoforul $C = O$ absoarbe în două domenii:

- banda intensă $\pi - \pi^*$ în domeniul 180-190 nm ($\log \epsilon$ 4,0 pentru cetonă, ureide, etc);
- banda slabă $n - \pi^*$, interzisă în regiunea 270 nm ($\log \epsilon$ 1,0)

Aceste benzi nu pot fi puse în evidență cu mijloacele tehnice obișnuite și din acest motiv, în peptidele nearomatice, absorbția cromoforului $C = O$ (amidic) nu poate fi pusă în evidență.

În cazul derivaților aromatici, spectrele se complică datorită intervenției absorbției caracteristice nucleului benzenic /556/:

- banda E (două tranziții permise $\pi - \pi^*$) 180-220 nm (ϵ 2,6-6.10³);
- banda B (tranziție $\pi - \pi^*$) 250-290 nm (10² -10³);

- banda X (ce apare în cazul conjugării cu un substituent, tranziție $\pi - \pi^*$) 220-250 nm ($1,0 - 3,0 \cdot 10^4$).

Analiza compușilor noștri relevă că spectrul lor u.v. este datorat structurii benzenice 1,4-disubstituite /557/. Interacțiunea dintre substituenți (cea mai mare fiind aceștia au efecte electronice contrare) rezultă clar din examinarea benzii B a compușilor prezentați în Tabelul 14.

Tabelul 14

Banda B a unor derivați
ai acidului benzoic

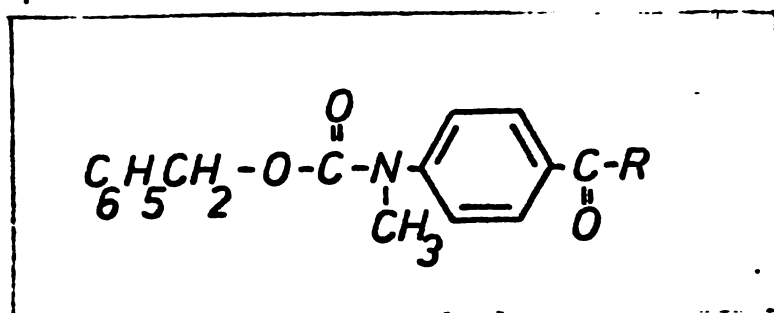
Compusul	λ (nm)	log ϵ
Anilină	280	3,15
Acid benzoic	270	2,90
Acid 4-aminobenzoic	294	4,23
Acid 4-metilaminobenzoic	303	4,27
Acid N-nitrozo-metilamino benzoic	293	4,08
Acid 4[metil-(benziloxicar- bonil)-amino]benzoic	260	4,01

Această comportare se menține și în cazul di- și tripeptidelor. Ea se caracterizează prin următoarele efecte:

$-\lambda_{max}$ a benzii B crește după îndepărtarea grupei benziloxi-carbonil cu cca. 40 nm, fiind însă mai mică în cazul seriei acidului 4-aminobenzoic, comparativ cu 4-metilamino-analogii corespunzători. Este evident că prin benziloxicarbonilare, datorită efectului -E al acestei grupe, scade bazicitatea azotului (din grupa 4-amino) și implicit scade densitatea de electroni a nucleului benzenic, disponibili pentru o tranziție de tip $\pi - \pi^*$. În seria 4-metilamino-derivaților, efectul +I al grupei metil contracarează parțial acest efect.

Tabelul 15

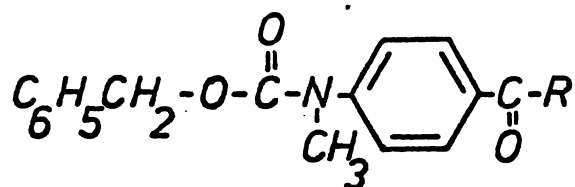
Esteri de dipeptide N-benziloxicarbonilate.



R	Config. amino acidului	Solvent	Spectrul u.v. λ_{max} (nm)	$\log \epsilon$
$\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	-	EtOH	270	4,21
$\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	DL	EtOH	260	4,19
$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	-	EtOH	260	4,19
$\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	-	EtOH	250	4,14
$\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	DL	MeOH	260	4,09
$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	-	MeOH	260	4,10
$\text{NHCH}[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	DL	EtOH	260	4,25
$\text{NHCH}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	L	MeOH	260	4,09
$\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	L	MeOH	260	4,25
$\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5)\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	DL	EtOH	262	4,22
$\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5]\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	D	EtOH	260	4,21
$\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5]\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	DL	MeOH	260	4,11

Tabelul 16

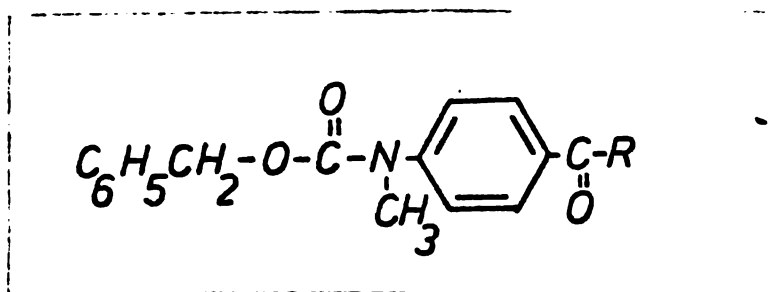
Dipeptid-hidrazide.



R	Config. amino acidului	Solvent	Spectral u.v. λ_{max} (nm)	log ϵ
NHCH ₂ CONHNH ₂	-	EtOH	262	4,24
NHCH(CH ₃)CONHNH ₂	DL	EtOH	261	4,29
NH(CH ₂) ₃ CONHNH ₂	-	MeOH	249	4,12
NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CONHNH ₂	L	MeOH	260	4,14
NHCH[CH(CH ₃) ₂]CONHNH ₂	DL	EtOH	260	4,28
NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CONHNH ₂	L	EtOH	264	4,19

Tabelul 17

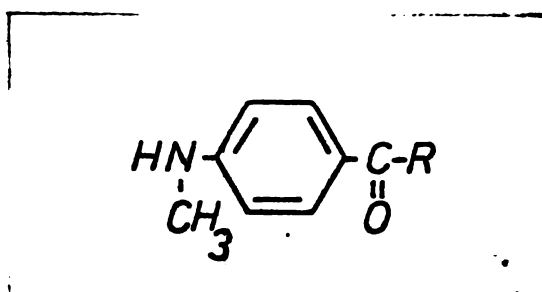
Dipeptide N-benziloxicarbonilate.



R	Config. amino acidului	Solvent	Spectral u.v. λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$
$\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$	-	EtOH	260	4,25
$\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{H}$	DL	MeOH	262	4,03
$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	-	EtOH	261	4,22
$\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	-	EtOH	250	4,29
$\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{H}$	DL	MeOH	259	4,12
$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$	-	MeOH	258	4,17
$\text{NHCH}[\text{CH}(\text{CH}_3)_3]\text{CO}_2\text{H}$	DL	MeOH	258	4,13
$\text{NHCH}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2]\text{CO}_2\text{H}$	L	EtOH	260	4,28
$\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{CO}_2\text{H}$	L	EtOH	260	4,21
$\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})\text{CO}_2\text{H}$	DL	MeOH	260	4,12
$\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}_2\text{H}$	DL	MeOH	260	4,28
$\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}_2\text{H}$	D	MeOH	260	4,11

Tabelul 18

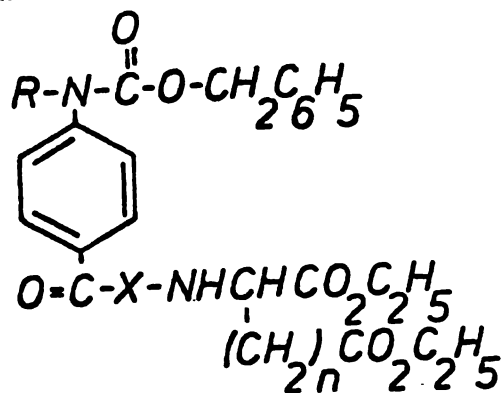
Dipeptide.



R	Config. amino acidului	Solvent	Spectral u.v. λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$
NHCH ₂ CO ₂ H	-	EtOH	296	4,22
NHCH(CH ₃)CO ₂ H	DL	MeOH	297	4,07
NH(CH ₂) ₂ CO ₂ H	-	MeOH	294	3,89
N(CH ₃)CH ₂ CO ₂ H	-	EtOH	287	4,13
NHCH(CH ₂ CH ₃)CO ₂ H	DL	MeOH	297	4,21
NH(CH ₂) ₂ CO ₂ H	-	MeOH	295	4,06
NHCH[CH(CH ₃) ₂]CO ₂ H	DL	MeOH	294	3,98
NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO ₂ H	L	MeOH	297	4,06
NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO ₂ H	L	MeOH	299	4,10
NHCH(CH ₂ CO ₂ H)CO ₂ H	DL	MeOH	300	3,69
NHCH[(CH ₂) ₂ CO ₂ H]CO ₂ H	L	MeOH	283	4,02
NHCH[(CH ₂) ₂ CO ₂ H]CO ₂ H	D	EtOH	288	4,03
NHCH[(CH ₂) ₂ CO ₂ H]CO ₂ H	DL	MeOH	300	3,60

Tabelul 19

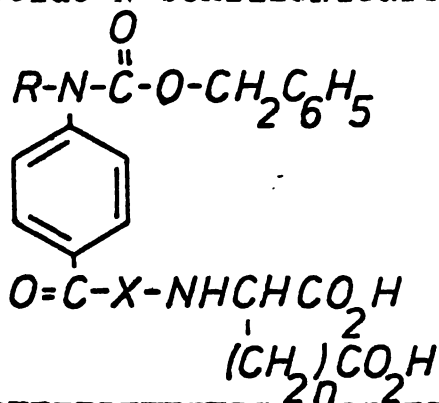
Tripeptid-esteri N-benziloxycarbonilați.



R	n	X	Config. amino acizilor	Solvent	Spectral u.v. λ_{max} (nm)	$\log \epsilon$
H	1	NHCH ₂ CO	-,DL	EtOH	268	4,48
H	2	NHCH ₂ CO	-,L	EtOH	268	4,53
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	-,DL	MeOH	262	4,16
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	-,L	MeOH	261	4,09
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	DL,L	MeOH	260	4,12
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	-,L	MeOH	250	4,01
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	L,L	MeOH	259	4,13
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L,DL	MeOH	261	4,10
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L,L	MeOH	260	4,11

Tabelul 20

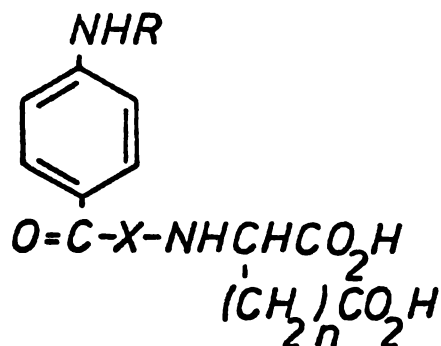
Tripeptide N-benziloxycarbonilate



R	n	X	Config. arinc scizilor	Solvent	Spectral u.v. λ_{max} (nm) log ϵ
H	1	NHCH ₂ CO	-,DL	MeCH	268 4,39
H	2	NHCH ₂ CO	-,L	MeCH	266 4,37
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	-,DL	MeCH	260 4,08
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	-,L	MeCH	260 4,11
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	DL,L	MeCH	260 4,11
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	-,L	MeCH	249 4,02
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CE(CH ₃) ₂]CO	L,L	MeCH	262 4,16
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L,DL	MeCH	261 4,12
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L,L	MeCH	261 4,12

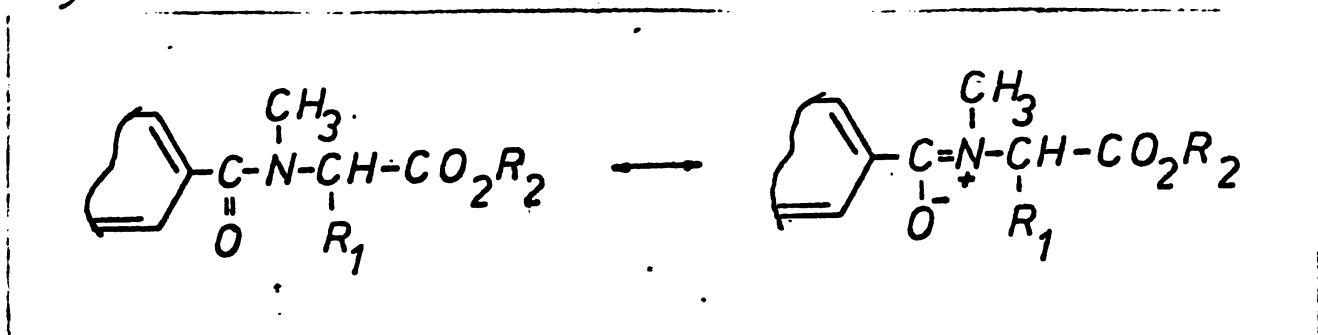
Tabelul 21

Tripeptide



R	n	X	Config. amino acizilor	Solvent	Spectral u.v. λ_{max} (nm) $\log \epsilon$
H	1	NHCH ₂ CO	-,DL	MeOH	285 3,89
H	2	NHCH ₂ CO	-,L	MeOH	285 3,32
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	-,DL	MeOH	302 3,75
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	-,L	MeOH	300 3,99
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	DL,L	MeOH	302 3,50
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	-,L	MeOH	282 4,09
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	L,L	MeOH	300 3,67
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L,DL	MeOH	302 4,03
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L,L	MeOH	302 3,81

- λ_{\max} al benzii B pentru peptidele conținând sarcosină (di- sau tripeptide) este mai mică cu 7-15 nm comparativ cu ceilalți compuși. Aceasta s-ar putea atribui contribuției mai reduse decât în cazul derivaților nesubstituiți pe atomul de azot a formelor cu sarcini despărțite. Fenomenul se datorește efectului spectral de " anticonjugare " ce apare la înlocuirea unui atom de hidrogen cu o grupă CH_3 în astfel de funcțiuni.



De menționat că în unele cazuri s-a evidențiat la N-(benziloxi-carbonil)-analogii și banda E; 206 nm (4,48) care, așa cum era de așteptat, se deplasează după deprotejare la 217 nm.

4.2.Pteridine.

Pteridina este caracterizată printr-o structură de electroni considerabil mai localizată (datorită atomilor de azot din ciclu) decât cea a naftalinei /558-561/. Din acest motiv, sistemul benzilor de absorbție în u.v. va prezenta similități și diferențe față de cel al omologului homocromatic. În plus, există posibilitatea apariției unor tranziții suplimentare $n-\pi^*$ datorate electronilor neparticipanți ai atomilor de azot. S-a constatat totuși că, în linii mari, naftalina și pteridina au spectre similare în regiunea 200-320 nm, constând în general din trei benzi /558/ :

- banda de la lungimea de undă cea mai mare din spectrul u.v. al naftalinei (320 nm, ϵ 250) are un corespondent la pteridină de intensitate mare (ϵ 7080), probabil datorat tocmai contribuției unor tranziții $n-\pi^*$;

280 nm la 235 nm (bandă $\pi-\pi^*$);

- pteridina prezintă o bandă suplimentară la 380 nm de intensitate joasă, datorată unei tranziții $n-\pi^*$, bandă care dispare în soluții acide datorită protonării atomilor de azot din ciclu (fapt ce confirmă natura ei).

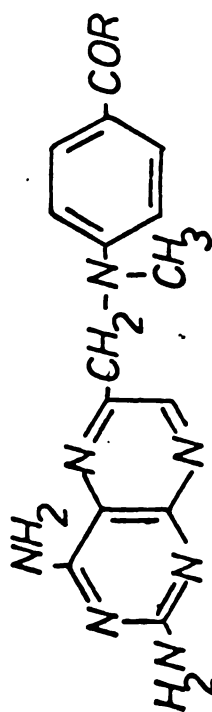
În general, substituenții nucleului pteridinic lasă neschimbată sau exercită un efect hipsocrom asupra poziției benzii $n-\pi^*$, exercitând însă un efect batocrom asupra benzii $\pi-\pi^*$.

Cea mai probabilă localizare a electronilor neparticipanți responsabili pentru banda $n-\pi^*$ este N^8 al nucleului, astfel încât este de așteptat ca substituenții din poziția 7 să exercite un efect hipsocrom și hipercrom mai mare asupra acestei benzi, decât atunci când sînt plasați mai departe. Se remarcă totuși și contribuția altor atomi de azot la tranziția $n-\pi^*$, prin interacțiunea cu N^6 , aceasta fiind mai efectivă între atomii N^5-N^8 decât între N^1 și N^3 .

Foarte puține investigații spectrale au avut ca obiect acidul folic și analogii săi /562,563/. Un studiu comparativ al contribuției nucleului pteridinic și a celui de acid 4-aminobenzoic în spectrul u.v. al acidului folic a arătat că absorbția pînă la 250 nm și peste 350 nm poate fi atribuită nucleului pteridinic, în timp ce maximum de la 281 nm este dat de suma absorbțiilor restului de acid 4-aminobenzoic și a ciclului pteridinic. Contribuțiile acestora pot fi separate în soluții alcaline, cînd apar două benzi la 258 și 282 nm.

Thiéry /563/, studiind spectrul u.v. al acidului folic (molecula acestuia fiind considerată alcătuită din două părți, pteridina și acidul 4-aminobenzoil-glutamic, notate respectiv cu A, B iar ansamblul cu AB) și al celor două părți constituate A și B, a observat că există o deplasare batocromă a ansamblului AB față de A + B, implicînd formarea unor legături de hidrogen intramoleculare în acest fenomen. În mediu bazic, concluziile sale privind zona

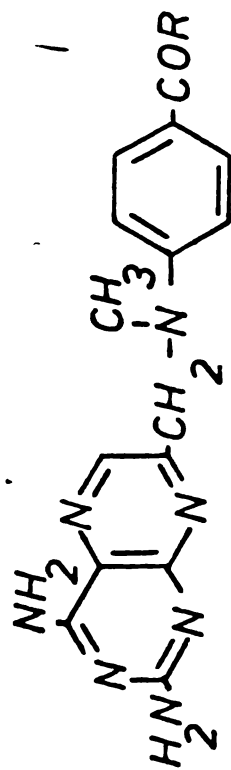
Analogi dipeptidici ai Methotrexatului.



Compusul	R	Config. amino acidului	HCl 0,1 N	λ_{max} (nm) (log ϵ)	NaOH 0,1 N
6, MAB-Gly	NHCH ₂ CO ₂ H	-	243 (4,22), 305 (4,27)	259 (4,29), 301 (4,26), 375 (3,79)	1
6, MAB-DL-Ala	NHCH(CH ₃)CO ₂ H	DL	248 (4,24), 307 (4,28)	248 (4,39), 302 (4,37), 375 (3,84)	95
6, MAB-β-Ala	NH(CH ₂) ₂ CO ₂ H	-	245 (4,19), 300 (4,20)	260 (4,39), 300 (4,35), 375 (3,81)	1
6, MAB-Sar	N(CH ₃)CH ₂ CO ₂ H	-	246 (4,35), 297 (4,20)	260 (4,42), 280sh(4,29), 375 (3,87)	
6, MAB-DL-Abu	NHCH(CH ₂ CH ₃)CO ₂ H	DL	245 (4,20), 308 (4,27)	259 (4,36), 303 (4,35), 375 (3,82)	
6, MAB-γ-Abu	NH(CH ₂) ₃ CO ₂ H	-	245 (4,12), 300 (4,09)	260 (4,37), 300 (4,34), 375 (3,81)	
6, MAB-DL-Val	NHCH[CH(CH ₃) ₂]CO ₂ H	DL	244 (4,24), 308 (4,17)	258 (4,40), 300 (4,37), 370 (3,91)	
6, MAB-L-Leu	NH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO ₂ H	L	245 (4,25), 308 (4,32)	259 (4,41), 303 (4,40), 375 (3,79)	
6, MAB-L-Phe	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO ₂ H	L	245 (4,20), 308 (4,23)	260 (4,36), 304 (4,33), 375 (3,85)	
6, MAB-D-Glu	NHCH[(CH ₂) ₂ CO ₂ H]CO ₂ H	D	244 (4,36), 306 (4,38)	258 (4,39), 303 (4,35), 372 (3,96)	
6, MAB-DL-Glu	NHCH[(CH ₂) ₂ CO ₂ H]CO ₂ H	DL	244 (4,35), 306 (4,46)	258 (4,47), 302 (4,44), 372 (3,99)	

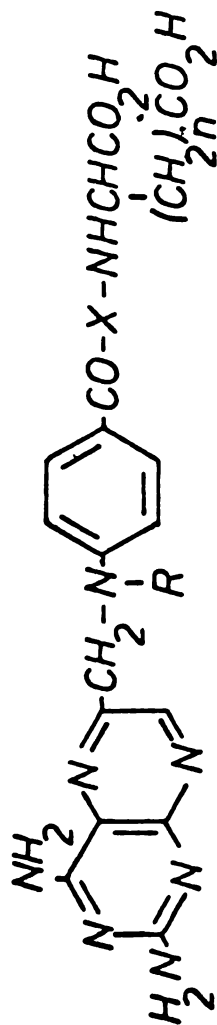
Tabelul 23

Analogi dipeptidici 7-substituiți.



Compusul	R	Config. amino acidului	HCl 0,1 N	λ_{max} (nm)	(log ϵ)	NaOH 0,1 N
7, MAB-Gly	NHCH ₂ CO ₂ H	-	243 sh (4,17), 305 (4,35)	257 (4,30), 301 (4,28), 370 (3,61)		
7, MAB-DL-Asp	NHCH(CH ₂ CO ₂ H)CO ₂ H	DL	240 sh (4,29), 310 (4,41)	258 (4,43), 298 (4,41), 368 (4,19)		
7, MAB-L-Glu	NHCH[(CH ₂) ₂ CO ₂ H]CO ₂ H	L	244 sh (4,26), 312 (4,38)	258 (4,46), 303 (4,45), 370 (4,13)		
7, MAB-D-Glu	NHCH[(CH ₂) ₂ CO ₂ H]CO ₂ H	D	238 sh (4,30), 306 (4,50)	256 (4,45), 300 (4,43), 368 (4,08)		
7, MAB-DL-Glu	NHCH[(CH ₂) ₂ CO ₂ H]CO ₂ H	DL	238 sh (4,28), 306 (4,41)	258 (4,42), 302 (4,39), 370 (4,07)		

Analogi tripeptidici ai Methotrexatului.



Compusul	R	n	X	Config. amino acizilor	HCl 0,1 N	NaOH 0,1 N	λ_{max} (nm)(log ϵ)
6,AB-Gly-DL-Asp	H	1	NHCH ₂ CO	- , DL	240sh(4,22), 290(4,24)	284(4,35), 370(3,86)	260(4,39), 284(4,35), 370(3,86)
6,AB-Gly-L-Glu	H	2	NHCH ₂ CO	- , L	246 (4,35), 295(4,37)	283(4,31), 373(3,89)	259(4,35), 283(4,31), 373(3,89)
6,MAB-Gly-DL-Asp	CH ₃	1	NHCH ₂ CO	- , DL	240 (4,31), 308(4,35)	306(4,47), 368(4,10)	258(4,47), 306(4,47), 368(4,10)
6,MAB-Gly-L-Glu	CH ₃	2	NHCH ₂ CO	- , L	244 (4,38), 310(4,38)	308(4,46), 372(4,09)	258(4,58), 308(4,46), 372(4,09)
6,MAB-DL-Ala-L-Glu	CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	DL, L	245 (4,25), 309(4,31)	309(4,38), 375(3,89)	259(4,38), 309(4,38), 375(3,89)
6,MAB-Sar-L-Glu	CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	- , L	246 (4,21), 290(4,03)	290(4,16), 370(3,70)	260(4,29), 290(4,16), 370(3,70)
6,MAB-L-Leu-L-Glu	CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	L, L	245 (4,21), 308(4,23)	309(4,30), 375(3,81)	259(4,30), 309(4,30), 375(3,81)
6,MAB-L-Phe-L-Glu	CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L, L	242 (4,45), 302(4,45)	304(4,51), 366(4,08)	258(4,53), 304(4,51), 366(4,08)
6,MAB-L-Phe-DL-Asp	CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	L, DL	245 (4,22), 310(4,29)	309(4,37), 375(3,89)	259(4,38), 309(4,37), 375(3,89)

benzilor de la 282 nm coincide cu cea menționată anterior. Ca urmare a studiilor u.v. și a altor metode aplicate, Thiéry ajunge la concluzia că în acidul folic legăturile de hidrogen puternice care apar, fac ca nucleul benzenic să se suprapună peste cel pteridinic, rezultând astfel o structură secundară /563/.

Analiza spectrelor compușilor noștri conduce la concluzii concordante cu datele de literatură, și anume:

- banda din domeniul 370-380 nm apare exclusiv în mediu bazic și pare mai intensă la 7-MTX- derivați;

- maximul de la 240 nm din spectrul derivaților 6-substituiți în HCl 0,1 N este schimbat în umăr la cei 7-substituiți și suferă o mică deplasare hipsocromă;

- analogii di- și tripeptidici cu sarcosină prezintă o deplasare hipsocromă a benzii de la 300 nm comparativ cu cea observată la peptidele respective.

5. Spectre de infraroșu.

Dată fiind complexitatea spectrelor pteridinelor (și analogilor acidului folic) ca și a peptidelor intermediare, analiza spectrelor i.r. ale acestora a cuprins exclusiv tipurile de vibrații ce au servit la identificarea și caracterizarea lor. Din motive de sistematizare ce țin de practica curentă s-a preferat studiul anumitor tipuri de vibrații și al variației acestora în toată seria compușilor investigați și nu invers, cum se practică de obicei.

Vibrația de întindere $\nu_{C=O}$.

a) Acizii alifatici saturați prezintă o bandă puternică, caracteristică vibrației $\nu_{C=O}$ de valență la 1725-1700 cm^{-1} /564/. La fel se comportă și acizii dicarboxilici având cele două grupări carboxilice depărtate (ca în acidul aspartic și glutamic). Această

bandă este prezentă în acizii aromatici (cu grupa CO_2H legată direct de nucleu) la frecvențe mai joase, între $1700-1680 \text{ cm}^{-1}$ /564/.

Peptidele sintetizate au prezentat, în concordanță cu datele de literatură, frecvențe în general cuprinse în domeniile de mai sus, către limita superioară a domeniului. Unii derivați au atins chiar 1740 cm^{-1} . În cazul analogilor di- și tripeptidici ai Methotrexatului, această vibrație se regăsește în general sub forma unui umăr de intensitate medie pe banda foarte puternică a vibrației de întindere $\text{C} = \text{N}$ (în unele cazuri se separă ca un maxim de intensitate medie).

Acizii 4-amino- și 4-metilamino-benzoici prezintă această bandă în domeniul așteptat, dar se deplasează cu cca. 45 cm^{-1} spre frecvențe mai mari după benziloxycarbonilare.

b) Esterii alifatici normali prezintă o absorbție atribuibilă vibrației $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ la o frecvență superioară acizilor corespunzători, în domeniul $1750-1735 \text{ cm}^{-1}$ /564/.

Compușii preparați s-au încadrat în general în aceste limite. Unii au depășit domeniul ($1725, 1760 \text{ cm}^{-1}$) dar au avut totuși frecvențe superioare acizilor corespunzători.

c) Benziloxycarbonil-derivații amino acizilor aromatici, ai di- și tripeptidelor ($\text{RNHCCOR}'$) prezintă această bandă în domeniul $1710-1690 \text{ cm}^{-1}$. Compușii noștri, cu mici abateri, s-au încadrat între aceste limite.

d) Banda amidă I ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$) foarte intensă, caracteristică amidelor secundare din legăturile peptidice se situează între $1680-1630 \text{ cm}^{-1}$ /564-567/. Asupra originii acestei benzi au existat discuții, acum fiind acceptată contribuția exclusivă a grupării carbonilice /564/. Faptul că absorbția este la o frecvență mai mică decât aceea a grupării carbonil din cetone se datorește contribuției crescute (față de cetone) a formelor cu sarcini despărțite.

Peptidele sintetizate de noi prezintă această bandă amidă I în domeniul citat. În cazul analogilor de Methotrexat, umărul in-

tens ce apare în domeniul $1685-1660 \text{ cm}^{-1}$ pe banda foarte puternică a vibrației $C = N$ (a nucleului pteridinic) poate fi atribuit acestei vibrații.

Vibrații de întindere ν_{C-O} .

a) Conform datelor de literatură, acizii carboxilici prezintă această bandă în domeniul $1320-1210 \text{ cm}^{-1}$, dar nu există unanimitate asupra acestor limite, după alți autori putând fi atribuită celei mai intense benzi a spectrului între $1600-700 \text{ cm}^{-1}$. Această bandă este de fapt o cuplare a modului $C - O$ și deformația OH în plan /564/.

În cazul di- și tripeptidelor, această bandă, identificată pe baza observației privind intensitatea ei, s-a situat în general între $1190-1160 \text{ cm}^{-1}$. Analogii di- și tripeptidici de Methotrexat au banda ν_{C-O} în domeniul $1220-1205 \text{ cm}^{-1}$, frecvența coborând la $1200-1190 \text{ cm}^{-1}$ în analogii lipsiți de grupa N -metil.

b) Esterii prezintă această bandă în domeniul $1300-1000 \text{ cm}^{-1}$, considerându-se absorbția ν_{C-O} ca cea mai intensă din regiunea menționată. Nici această bandă nu rezultă dintr-o vibrație de întindere $C - O$ pură /564/.

În compușii noștri, banda atribuită vibrației ν_{C-O} pe baza intensității ei deosebite, apare în domeniul $1180-1160 \text{ cm}^{-1}$ pentru majoritatea peptidelor, cu excepția 4-amino-benzoil-derivaților, ce absorb la $1230-1225 \text{ cm}^{-1}$. În aceeași regiune se situează și vibrația $C - O$ a esterilor amino acizilor (clorhidrați).

Vibrația de întindere OH .

Pentru acizii carboxilici sînt caracteristice următoarele domenii /564/:

- OH liber	$3560-3500 \text{ cm}^{-1}(m)$
- OH legat	$2700-2500 \text{ cm}^{-1}(w)$

Majoritatea compușilor sintetizați au prezentat o bandă largă

de intensitate foarte slabă la cca. 2500 cm^{-1} , cu excepția unora care au prezentat și o absorbție în jurul valorii de 3500 cm^{-1} .

Deformații OH în afara planului.

Domeniul de frecvențe pentru deformația OH din gruparea carboxilică este între 940-900 cm^{-1} și are o intensitate variabilă, fiind uneori nedetectabilă.

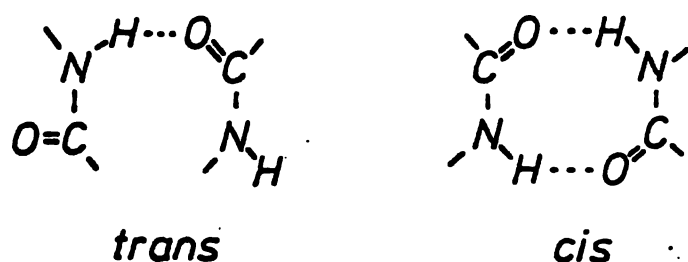
In general compușii noștri s-au încadrat în aceste limite.

Vibrația de întindere N-H.

a) Amidele secundare prezintă benzi de absorbție ($\nu_{\text{N-H}}$) în următoarele regiuni /564, 567/:

-NH liber	trans	3460-3400 cm^{-1} (r)
	cis	3440-3420 cm^{-1} (m)
-NH legat	trans	3320-3270 cm^{-1} (r)
	cis	3180-3140 cm^{-1} (m)

Cele două tipuri de legături de hidrogen care pot să apară sînt:



Atribuirile sînt totuși dificile datorită caracterului larg al benzilor de absorbție, în special în KBr. De altfel, în stare solidă, benzile apar puternic deplasate (cca. 80-100 cm^{-1}) față de poziția lor în CHCl_3 sau în CCl_4 . O complicație suplimentară intervine în cazul compușilor cu grupe CO_2H liberă ce absorb în domenii apropiate.

Majoritatea compușilor peptidici prezintă benzi atât în domeniul vibrațiilor NH liber, cât și legat. Dipeptidele deprotejate

eu acoastă bandă în zona NH liber, greu de atribuit datorită ν_{OH} . În general însă este dificil de precizat modul de legare NH, tendința fiind spre zona NH liber. În concluzie, la di- și tripeptidele sintetizate de noi, absorbțiile din domeniile 3380-3290 cm^{-1} (respectiv la cca. 3440 cm^{-1} în soluție) au fost atribuite vibrațiilor ν_{N-H} .

În cazul analogilor de Methotrexat, domeniul este acoperit de vibrația de întindere ν_{N-H} a celor două grupe amino primare (aflate în poziția 2 și 4 pe nucleul pteridinic).

b) Aminele primare prezintă două benzi în domeniul 3500-3300 cm^{-1} de intensitate medie, cea de la frecvență mai mare fiind asociată modului de întindere asimetric, iar cealaltă modului simetric. Cele două frecvențe sînt legate prin relația /564/:

$$\nu_{sim} = 345,53 + 0,876 \nu_{as}$$

Autorii precizează o deviație standard de 4,8 cm^{-1} . Relația este valabilă pentru frecvențe N-H liber, dar nu dă rezultate în cazul în care N-H este legat. Această bandă este greu de atribuit în compuşii noştri, fiind dificil de deosebit de vibrația similară din amide.

c) Aminele secundare prezintă numai o singură absorbție de întindere N-H în domeniul 3500-3300 cm^{-1} . Astfel, acidul 4-metilaminobenzoic are această bandă la 3455 cm^{-1} . Și această bandă se suprapune cu domeniul ν_{N-H} din amide secundare, deci nu este utilizabilă /564/.

d) În cazul clorhidraților aminelor, banda NH_3^+ se deplasează la 3130-3030 cm^{-1} , fiind de intensitate medie, cea normală pentru aminele primare (3500-3300 cm^{-1}) dispărînd /564/. Clorhidrații esterilor amino acizilor sintetizați prezintă această bandă la 3000-2970 cm^{-1} .

Clorhidrații aminelor secundare prezintă această bandă la frecvențe mai coborîte. Astfel, esterul sarcosinei (clorhidrat) absoarbe la 2710 cm^{-1} .

Vibrația de deformare N-H.

a) Aminele primare prezintă această bandă în domeniul 1650-1590 cm^{-1} , fiind de intensitate medie-puternică. Deoarece se suprapune cu vibrația corespunzătoare din amide, nu poate fi atribuită cu precizie /564/.

Clorhidrații aminelor primare absorb la 1660-1610 cm^{-1} (w) și 1550-1485 cm^{-1} (v)

b) Aminele secundare prezintă aceeași bandă în domeniul 1650-1550 cm^{-1} , fiind în general slabă ca intensitate /564/. Această bandă este intensificată când atomul de azot este legat direct de nucleul aromatic. Astfel, acidul 4-metilamino-benzoic are frecvența acestei vibrații la 1545 cm^{-1} (s). Nici această bandă nu este utilizabilă în prezența grupării amidice secundare.

Clorhidrații aminelor secundare /564/ (în cazul nostru, esterul sarcosinei) prezintă o singură bandă la 1645 cm^{-1} (clorhidratul esterului sarcosinei- 1630 cm^{-1} , w).

c) Amidele secundare prezintă această bandă (așa-numita "amidă II") în regiunea 1550 cm^{-1} , fiind de intensitate mare /564-569/. Deși originea acestei benzi este mult controversată, ea este considerată drept o vibrație de deformare în plan $\delta_{\text{N-H}}$ (deoarece lipsește în amidele terțiare). O altă explicație ar fi atribuirea benzii unei întinderi C-N, în care legătura C-N are un caracter considerabil de dublă legătură, datorită rezonanței cu grupa carbonil. În sfârșit, o a treia explicație constă în cuplarea vibrațiilor NH și CCN în opoziție de fază /564/. Aceeași cuplare (dar de data aceasta în fază) conduce la banda "amidă III", preponderent fiind însă modul CCN. Această din urmă bandă este situată la cca. 1290 cm^{-1} și este de intensitate medie /564,567/.

Ambele aceste benzi (amidă II și III) au fost identificate în compușii sintetizați (peptide și analogi de lehotrexat), în domeniul 1565-1490 cm^{-1} (amidă II) și 1305-1270 cm^{-1} (amidă III).

Atribuirea benzilor ce apar în domeniul 1500-1400 cm^{-1} este destul de dificilă, deoarece în același domeniu sînt situate și vibrațiile $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ale nucleului aromatic (1504-1493 cm^{-1})/564/. Există însă o serie de argumente pentru atribuirea benzii relativ intense de la 1520-1500 cm^{-1} vibrației \int_{NH} , și anume:

- într-o serie de carbamați alifatici și cicloalifatici de forma RNHCOCR_1 , în care banda intensă ce apare în domeniul 1510-1490 cm^{-1} este sigur atribuibilă acestei vibrații;

- deuterarea unor dipeptide (Tabelul 25) deplasează această bandă la 1455-1432 cm^{-1} , fără a-i schimba intensitatea. În jurul valorii de 1500 cm^{-1} rămîne după deuterare o bandă slabă ce ar putea fi atribuită vibrației $\nu_{\text{C}=\text{C}}$.

Tabelul 25

Deplasarea unor benzi la deuterare.

Compusul	Solvent	Variația frecvenței la deuterare			
N{4[metil-(Bzc)-amino] benzoil} -aminobutirat de etil.	CCl_4	1545 m	1510 s	-	3380 m
	CCl_4 ($\text{D}_2\text{O}, \text{HCl}$)	-	1510 w	1455 s	-
N{4[metil-(Bzc)-amino] benzoil} -L-glutamat de dietil	CCl_4	1540 m	1505 s	-	3380 w
	CCl_4 ($\text{D}_2\text{O}, \text{HCl}$)	-	1502 m	1432 s	-
N{4[metil-(Bzc)-amino] benzoil} glicina	CHCl_3	1540 m	1512 vs	-	3400 w
	CHCl_3 ($\text{D}_2\text{O}, \text{HCl}$)	-	1508 w	1450 vs	-
N{4[metil-(Bzc)-amino] benzoil} -L-fenil-alanina	CHCl_3	1540 m	1505 vs	-	3440 w
	CHCl_3 ($\text{D}_2\text{O}, \text{HCl}$)	-	1505 w	1440 s	-

Mai greu de atribuit este banda ceva mai slabă decît precedenta din domeniul 1560-1530 cm^{-1} care dispare de asemenea la deuterare, fără a putea fi identificată ulterior. Noi am atribuit-o de asemenea unei benzi amidă II, conform literaturii /564/.

Este probabil ca banda ce apare și în derivații de Methotrexat în domeniul $1520-1495\text{ cm}^{-1}$ să aibă o origine similară (amidă II).

Benzile amidă III au apărut în derivații noștri în domeniul $1310-1280\text{ cm}^{-1}$.

Vibrația de întindere C-N.

Aminele primare aromatice prezintă o bandă puternică la $1340-1250\text{ cm}^{-1}$ atribuită vibrației de întindere $\nu_{\text{C-N}}$ /564/.

În analogii de Methotrexat di- și tripeptidici, banda ce apare la $1390-1340\text{ cm}^{-1}$ (m-s) ar putea fi atribuită vibrației $\nu_{\text{C-N}}$ a aminei primare (din poziția 2 și 4 de pe nucleul pteridinic). Această bandă este observabilă chiar și în pteridinele simple ($1370-1360\text{ cm}^{-1}$).

Vibrațiile nucleului aromatic.

Compușii sintetizați conțin nucleee aromatice hidrocarbonate (mono și 1,4-disubstituite), precum și heterociclii aromatici (pteridine 2,4,6- și 2,4,7-trisubstituite). Prezentarea absorbțiilor i.r. ale acestora se va face separat, pentru nucleul benzenic și cel pteridinic.

Nucleul benzenic.

Vibrația de întindere =C-H.

Absorbția de întindere =C-H a compușilor aromatici duce la apariția mai multor benzi caracteristice de intensitate slabă în regiunea 3030 cm^{-1} /564/, una dintre acestea fiind uzual de intensitate mai mare decât a celorlalte. Aceste benzi, alături de absorbțiile din regiunile $1625-1575\text{ cm}^{-1}$ și $1504-1493\text{ cm}^{-1}$ sînt în general suficiente pentru stabilirea prezenței unui nucleu aromatic în compusul respectiv.

Toate peptidele sintetizate de noi prezintă 1-3 benzi în regiunea 3000 cm^{-1} . Nu au putut fi evidențiate însă în analogii de Methotrexat.

Vibrația de întindere C=C.

Compușii aromatici prezintă patru benzi ce sînt atribuite acestui mod de vibrație /564/:

- cca. 1600 cm^{-1} (v)
- cca. 1500 cm^{-1} (v)
- cca. 1580 cm^{-1} (m)
- cca. 1450 cm^{-1} (m)

În derivații noștri, au fost identificate și tabelate toate aceste benzi, cu mențiunea că cea de la cca. 1500 cm^{-1} este acoperită de banda amidă II, așa cum am arătat prin deuterare.

a) Banda de la 1600 cm^{-1} . Pentru mulți compuși aromatici, ea se produce în domeniul 1625-1575 cm^{-1} dar în general este situată la cca. 1600 cm^{-1} . Această bandă nu dă decît foarte rar informații despre natura și poziția substituenților /564/.

Toți compușii sintetizați prezintă această bandă în domeniul 1620-1595 cm^{-1} , fiind de intensitate m-vs. Ea a fost de asemenea identificată și în analogii de Methotrexat (unde este posibilă separarea de absorbția $\nu_{\text{C=N}}$ din pteridină de la 1640 cm^{-1}).

b) Banda de la 1580 cm^{-1} . Această bandă, uzual de intensitate foarte slabă în compușii aromatici, este utilă pentru detecția conjugării cu nucleul, deoarece atașarea directă a grupei carbonil de înel o intensifică.

c) Banda de la 1525-1475 cm^{-1} are o comportare asemănătoare celei de la 1600 cm^{-1} /564/.

În compușii noștri, această bandă este acoperită de banda intensă amidă II, de care se separă doar prin deuterare (Tabelul 25). După operația de deuterare, în locul benzii intense de la cca. 1500 cm^{-1} rămîne o bandă slabă care poate fi acum atribuită nucleului benzenic.

d) Banda de la cca. 1450 cm^{-1} , datorată vibrațiilor de schelet, este situată în domeniul 1470-1439 cm^{-1} /564/ și se regăsește

în toți compușii sintetizați, fiind de intensitate variabilă.

Alte vibrații.

Au fost identificate în compușii noștri, vibrațiile de la $860-800\text{ cm}^{-1}$, caracteristice nucleelor având doi atomi de hidrogen adiacenți (deci pentru compuși para-substituiți). Cealaltă zonă, $1225-950\text{ cm}^{-1}$, caracteristică de asemenea compușilor aromatici 1,4-disubstituiți, nu este utilizabilă. Peptidele prezintă această absorbție în domeniul $870-835\text{ cm}^{-1}$, în porțiunea inferioară situându-se peptidele neprotejate ($845-835\text{ cm}^{-1}$). Această bandă a fost de asemenea identificată și în analogii di- și tripeptidici de Methotrexat.

Dintre cele două absorbții ($770-730\text{ cm}^{-1}$ și $710-690\text{ cm}^{-1}$) caracteristice benzenului monosubstituit (prezent în benziloxi-carbonil-derivați) numai prima a putut fi ușor identificată în compușii noștri, fiind situată în domeniul $765-740\text{ cm}^{-1}$.

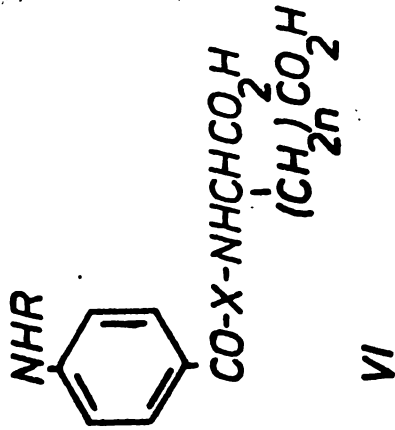
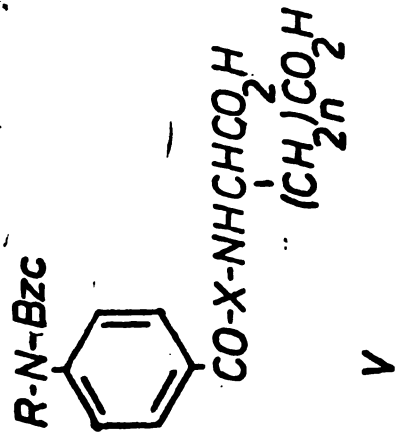
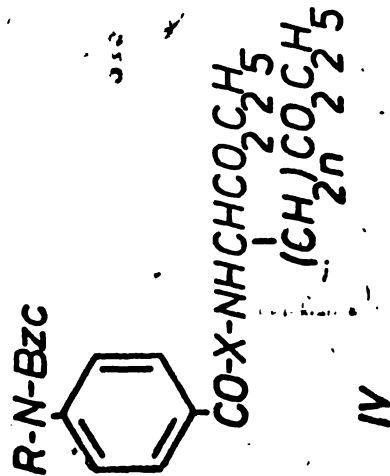
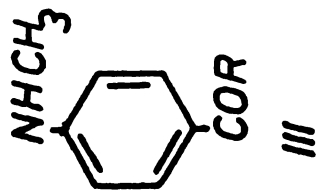
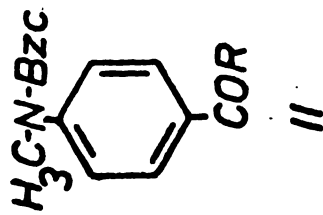
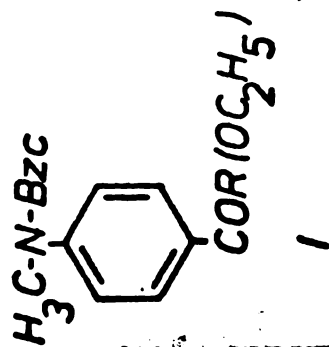
Nucleul pteridinic.

Foarte puține lucrări au fost consacrate studiului i.r. al pteridinelor. În afara datelor de literatură, în aprecierea benzilor ne-am bazat în special pe spectrele pteridinelor simple sintetizate de noi, ce reprezintă un material mai ușor interpretabil. Ca și în cazul spectrelor u.v., studiul spectrului i.r. al naftalinei a furnizat o serie de informații utile.

Vibrații de întindere $\nu_{\text{C=N}}$ și $\nu_{\text{C=C}}$.

În spectrul pteridinelor sînt prezente trei benzi în domeniile $1610-1565\text{ cm}^{-1}$, $1570-1545\text{ cm}^{-1}$ și $1560-1515\text{ cm}^{-1}$ /558/. Primele două benzi au fost regăsite și în spectrul analogilor de Methotrexat. Astfel, la $1650-1640\text{ cm}^{-1}$ apare cea mai intensă bandă din spectrul acestui tip de compuși, inclusiv la 2,4-diaminele-pteridinelor simple. Ea este ușor de recunoscut și caracterizează bine aceste structuri.

Notatiile formulelor generale
ale peptidelor



Tabelul 26

Clorhidrații esterilor de amino acizi

Amino acidul	$\nu_{C=O}$	ν_{C-O}	$\nu_{NH_3^+}$	$\nu_{NH_2^+}$	$\nu_{NH_3^+}$	$\nu_{NH_2^+}$	$\nu_{NH_3^+}$	$\nu_{NH_2^+}$
Glicina	1750 vs	1265 vs	2895 s,br	-	-	-	1585 m	-
DL-Alanina	1750 vs	1253 s,1212 s	2970 s,br	-	-	-	1590 m	-
β -Alanina	1733 vs	1232 s	2990vs,br	-	1630 w	-	1580 m	-
Sarcosina	1750 vs	1240 s	-	2710 vs	1630 w	-	-	1630 w
Acid DL- α -aminobutiric	1730 vs	1220 vs	2920vs,br	-	-	-	1590 m	-
Acid γ -aminobutiric	1730 vs	1242 s	3000vs,br	-	-	-	1580 m	-
DL-Valina	1750 vs	1240 vs	2900vs,br	-	-	-	1580 w	-
L-Leucina	1747 vs	1225 vs	2980vs,br	-	1605 w	-	1580 w	-
L-Fenilalanina	1752 vs	1255 vs	2850vs	-	1605 w	-	1585 w	-
Acid DL-aspartic	1750 vs	1250 vs,br	3000vs,br	-	-	-	1590 m	-
Acid L-glutamic	1745 vs	1235 s	3000vs,br	-	-	-	1595 w	-
Acid D-glutamic	1748 vs	1235 vs	3000vs,br	-	-	-	1592 s	-
Acid DL-glutamic	1755 vs	1225 s,1252 s	2900 s,br	-	-	-	1595 m	-

Tabelul 27

Derivații simpli de acid amino-benzoic.

	C=O	C-O	Acid Ester	OH	NH	NH	Amidă III	N-NO	=C-H	C = C	2H	Benzen			
	Acid	Acid	Carb. Ester								adiac. substit.	mon			
Acid 4-metilamino-benzoic	1675s	-	1178s	2560m, br	3455s	1545s	1295s	-	3030w	1605s	1495m	1440u, m	1580u, m	835s	-
Acid N-(benziloxi-carbonil)metilamine-benzoic	1720s	1700s	1175s	2575m	-	-	1300s	-	3050w	1612s	1520m	1440s	1580w	865s	740s
Acid N-(benziloxi-carbonil)amino benzoic	1720s	1690s	1240s	2560m	3340s	1550s	-	-	3040w	1620s	1510m, u	1420s	-	860m	745s
N-(benziloxicarbonil)amino-benzoat de etil	1740s	1700s	1230m	-	3310s	1540s	1300s	-	3030w	1605s	1502w	1420s	-	862m	755s
Acid N-nitrozo-metilamino-benzoic	1690s	-	1200s	2560m	-	-	1295-	1400s	3060w	1610s	1510w	1430m	1590u, w	860m	-
			1220s				1315ds		3080w			1450m			
												1480w			
												1470s			

Frecvențe de întindere $\nu_{C=O}$ în dipeptide (I, II, III).

Amino acidul terminal	Ester			Acid			Carbamat		Amidă I	
	I	II	III	I	II	III	I	II	II	III
Glicina	1750 s	1720 vs	1740 s	1715 vs	1700 s	1672 s	1655 s	1640 s,u		
DL-Alanina	1760 s	1745 s	1725 s	1710 vs	1720 vs	1650 s	1660 s	1630 s,u		
β -Alanina	1740 s,u	1710 s,u	1730 s	1715 vs	1695 vs	1650 s	1635 s	1650 s,br		
Sarcosina	1750 s	1730 m,u	1725 m	1715 vs	1705 vs	1648 vs	1625 s,u	1640 m,u		
Acid DL- α -aminobutiric	1742 s	1725 s,u	1720 m	1712 vs	1705 vs	1635 s	1620 vs	1635 m,u		
Acid γ -aminobutiric	1730 vs	1715 vs	1720 s,u	1720 vs	1700 s,u	1635 s	1627 vs.	1630 s		
DL-Valina	1725 vs	1720 vs	1710 m	1705 vs	1710 s,u	1660 s	1630 vs	1650 vs		
L-Leucina	1725 vs	1720 s,u	1740 m	1710 vs	1700 vs	1662 s	1650 vs	1645 s,u		
L-Fenilalanina	1730 s,u	1725 vs	1730 m,u	1705 vs	1690 s	1665 s	1660 vs	1640 s,u		
Acid DL-aspartic	1740 s	1725 vs	1730 vs	1720 vs	1705 vs	1640 vs	1645 vs	1650 s		
Acid L-glutamic	1755 s	1730 s	1730 s	1710 vs	1695 s	1635 vs	1645 vs	1640 s,u		

Frecvențe de întindere $\nu_{C=O}$ în tripeptide (IV, V, VI).

R	n	X	Ester		Acid		Carbamat		Amidă I		
			IV	V	V	VI	IV	V	IV	V	VI
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	1745 vs	1740 vs	1730 s	1715 s	1720 vs	1645 s	1650 vs	1650 s,br	
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	1740 vs	1740 vs	1710 s,u	1715 s,u	1710 vs	1670 s	1650 s	1650 vs	
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	1740 s	1720 vs	1730 s	1705 vs	1710 vs	1660 s	1670 s	1650 s,br	
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	1740 vs	1725 s,u	1730 s	1710 vs	1715 vs	1690 vs	1645 s,br	1650 s	
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	1740 vs	1740 s,u	1740 s,br	1710 vs	1715 vs	1660 s	1630 s	1670 s	
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	1755 s	1740 s	1740 s	1710 s,u	1715 vs	1635 s	1670 s	1680 s,br	
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	1750s	1740 s,u	1730 s	1720 vs	1720 vs	1695 vs	1670 s	1650 vs	
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)	1745 vs	1740 vs	1733 s	1715 s	1710 s	1660 vs	1630 s	1635 s	
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)	1735 vs	1740 s,u	1730 s	1705 s	1718 vs	1635 vs	1682 s	1640 s,u	

Dipeptide (I,II,III)

Amino acidul terminal	C-O			OH			Deform.OH in afara planului		
	I	II	III	II	III	III	II	III	III
Glicina	1165 vs 1212 s	1185 vs 1200 s	1195 vs 1235 s	2500 br	2500 br	2500 br	890 w	897 w	
DL -Alanina	1175 vs 1220 s	1180 vs 1260 s	1195 s 1225 s	2500 br	-	-	945 m	930 w	
-Alanina	1160 vs 1190 s	1170 s 1230 s	1200 m	2500 br	-	-	945 m	935 w	
Sarcosina	1165 vs 1205 m	1155 s 1255 vs	1178 s 1230 m	2500 br	-	-	970 m	885 w 930 w	
Acid DL- -aminobutiric	1173 vs 1222 vs	1170 vs 1200 s	1190 s	2500 br	-	-	910 w 955 w	-	
Acid -aminobutiric	1178 s 1190 s	1177 vs 1190 s,u	1200 m	-	-	-	945 w	-	
DL-Valina	1162 s	1155 s	1195 s	-	2500 br	-	-	910 w 940 w	
L-Leucina	1175 vs 1205 m	1220 s 1175 vs	1220 m 1170 m	-	2500 br	-	940 w	930 w	
L-Fenilalanina	1160 vs 1200 m	1205 s 1155 vs	1200 s	-	2500 br	-	910 w	950 w	
Acid DL-aspartic	1210 m 1180 vs	1230 m 1175 vs	1230 m	3530 m	2500 br	-	910 m	950 w	
Acid L-Glutamic	1210 s 1175 vs 1205 s	1215 s 1165,1180 d,vs	1200 s	3520 m	2500 br	-	910 w 950 w	950 m	

R	n	X	ν_{C-O}						ν_{OH}						Deform.OH in afara planului		
			IV	V	VI	V	VI	V	V	VI	V	VI	V	V	VI		
H	1	$NHCH_2CO$	1230 vs	1250 s,u 1235 s	1235 s	2500 br	2500 br	2500 br	945 m	92-							
H	2	$NHCH_2CO$	1225 vs	1230 vs	1240 s	-	-	-	945 m	-							
CH_3	1	$NHCH_2CO$	1160 vs	1183 s	1230 s,br	2500 br	2500 br	2500 br	915 v	-							
CH_3	2	$NHCH_2CO$	1205 s	1215 m	1200 s	-	-	-	940 v								
CH_3	2	$NHCH(CH_3)CO$	1220 m	1215 m	1230 s,br	-	-	-	910 v								
CH_3	2	$N(CH_3)CH_2CO$	1170 vs	1160 vs	1230 s,br	-	-	-	910 v								
CH_3	2	$N(CH_3)CH_2CO$	1210 s,br	1215 m	1220 s	-	-	-	-								
CH_3	2	$NHCH_2CH(CH_3)_2CO$	1160 vs	1183 s	1195 s	2500 br	2500 br	2500 br	915 v								
CH_3	1	$NHCH(CH_2C_6H_5)CO$	1230 s	1220 m	1195 s	-	-	-	920 v								
CH_3	2	$NHCH(CH_2C_6H_5)CO$	1160 vs	1165 vs	1195 s	-	-	-	920 v								
CH_3	2	$NHCH(CH_2C_6H_5)CO$	1220 m,br	1210 m	1195 s	-	-	-	915 v								

114

Dipeptide (I,II,III).

	NH			Amidă II			Amidă III		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Glicina	3380 w	3340 v	3420 m,u	1510 s	1515 s	1525 s	1285 m,br	1280 vs	1290 m
DL-Alanina	3350 m	3400 m	3370 s,br	1540 m	1560 m	1555 s,u	1310 m	1300 s	1320 m
β-Alanina	3380 s	3335 m		1522 s	1530 s	1515 s	1285 m	1285 m	1275 m
Sarcosina	-	3335 s	3380 s	1560 s	1550 s	1550 s	1310 v	1310 v	1345 m
			3430 s	1510 s	1515 s	1510 m	1280 m,br	1300 m	1285 m
			3390 m,u	1550 m	1560 s	1560 s	1310 s	1300-1305	1310 m
			3410 m	-	1560 s	1280 m,br	1305 m	d,s	1285 v
Acid DL-α-aminobutiric	3320 m	3325 m	3380 m,br	1507 s	1512 s	1515 s	1282 m	1285 w	1300 m
				1552 m	1545 m	1550 m	1310 s	1318 m	1300,w,br
Acid γ-aminobutiric	3305 s	3388 s	3450 m,br	1505 s	1515 s	-	1285 m,u	1280 s	-
				1548 m	1565 m		1305 s	1310 s	
DL-Valina	3440 m	3350 s	3350 m,br	1500 s	1505 s	1505 s	1270 s	1285 m	1280 m
				1530 m,u	1540 s	1560 m		1305 m	
L-Leucina	3440 m	3345 m	3390 m,br	1500 s	1520 s	1532 s	1280 s	1280 m	1285 m
				1530 m	1545 m	1555 m,u	1280 s	1305 m	
L-Fenilalanina	3440 m	3330 m	3400 m,br	1495 vs	1495 m	1510 s,u	1305 m	1300 m	1285 m
				1515 m	1522 m	1520 m	1280 m	1280 m	1310 w
Acid DL-aspartic	3320 m	3350 m	3400 m,br	1520 m	1520 s	1520 s	1300 m,u	1280 m	1280 m
				1540 s	1560 s	1560 s,u	1310 m	1310 m	
Acid L-glutamic	3320 m	3350 m	3420 m	1510 s	1510 s	1520 s	1270 m	1285 m	1280 m
				1540 s	1540 s	1540 s,u	1310 m	1310 s	

INSTITUTUL NAȚIONAL
TIMIȘOARA
BIBLIOTECA CENTRALĂ

Tripeptide (IV, V, VI).

X	NH	Amidă II			Amidă III				
		IV	V	VI	IV	V	VI		
1	NECH ₂ CO	3370 m 3430 w	3370 s 3410 m	3360-3400 m, br	1510 m 1540 vs	1510 s 1540 vs	1280 m 1300 m	1275 m 1310 m, u	1300 m
2	NECH ₂ CO	3350 m 3430 w	3350 m, br 3360 m	3350 m, br	1510 m, u 1540 vs	1510 m, u 1540 vs	1310 m, u 1300 m	1310 m, u 1280 s, u	1300 m
3	NECH ₂ CO	3300- 3400 m	3350 m, br 3410 w	3370 m, br m, br	1500 s 1535 m, u	1505 s 1550 vs	1300 m 1275 s	1280 s, u 1305 m	-
3	NECH ₂ CO	3350- 3400 m	3350 m, br 3410 w	3370 m, br m, br	1505 s 1540 s	1505 s 1540-50	1275 s 1305 m	1260 m	1260 m
3	NECH(CH ₃)CO	3350- 3420 m, br	3320 m, br 3420 m, br	3400 m, br	1505 s 1540 s, u	1505 s 1540-50	1280 s, u 1305 m	1280 m 1305 m	1290 m, u
3	N(CH ₃)CH ₂ CO	3330m, br	3440 m	3400 m, br	1505 m, u 1520 s	1510 m 1540 m, br	1270 s, br	1275 s	1275 m, br
3	NECH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	3330 m	3410 m	3320 m, br	1505 m 1555 s	1510 s 1540-60	1270 s	1270 m, u	1285 m, u
3	NECH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	3330 m, br	3330m, br	3340 m, br	1510 s 1550 s	1505 vs 1540 s	1280 m, br	1275 m	1280 m
3	NECH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	3330 m, br	3300m, br	3350 m, br	1505 m 1540 s	1508 s 1550 s	1270 s 1315 m	1275 m 1305 m	1280 m

Dipeptide (I,II,III)

γ C=C

Amino acidul terminal	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Glicina	1610 m	1615 m	1615 vs	1510 s	1515 s	1525 s	1445 m	1445 m	1430 m	1580 w,u	1580 w,u	1580w,u
DL-Alanina	1630 m	1630 m	1610 vs	1522 s	1530 s	1515 s	1455-70	1465 m	1455 w	1585 w,u	1580 w,u	1570w
β -Alanina	1615 m	1610 m	1615 vs	1510 s	1515 s	1510 m	^{d,m} 1450 m	1445 m	1460 m	1580 w,u	1570 w,u	1580s
Sarcosina	1617 m	1590 vs 1600 s,u	1615 vs	1485 m	1485 m	1495 m	1445 m	1445 m	1455 m	1580 w,u	1565 m	1590s
Acid DL- α -aminobutiric	1617 m	1605 s,u	1610 vs	1507 s	1512 s	1515 s	1450 m	1450 m	1450 m	1575 w,u	1570 w	1570m
Acid γ -aminobutiric	1605 m	1615 s,u	1620 vs	1505 s	1515 s	-	1480 w	1455 m	1460 m	-	1570 w,u	1570w
DL-Valina	1605 m	1605 m	1615 vs	1500 s	1505 s	1505 s	1450-60	1445-55	1470 m,u	1570 w,u	1580 w,u	1580 s,u
L-Leucina	1605 m	1615 m	1625 vs	1500 s	1520 s	1532 s	^{d,m} 1450-60	1455 m	1450-65	1580 w	1580 w,u	1580 m,u
L-Fenilalanina	1605 m	1595 s	1615 vs	1495 vs	1495 m	1510 s,u	^{d,m} 1450-60	1455 m	1460 w	1575 w	1580 w,u	1580 m,u
Acid DL-aspartic	1615 m	1620 s	1615 vs	1520 m	1520 s	1520 s	^{d,m} 1445 m	1455 m	-	1580 w,u	1585 m	
Acid L-Glutamic	1610 m	1615 m	1610 vs	1510 s	1510 s	1520 s	1440 m	1445 m	1445 m	1580 w,u	1585 w,u	

Tripeptide (IV, V, VI).

↘ C=C

R	X	IV	V	VI	IV	V	VI	IV	V	VI	IV	V	VI
H	1 NHCH ₂ CO	1615 m	1615s	1620 vs	1510m [*]	1505m [*]	1510s [*]	1460w	1450m	1420m	-	1590m,u	-
H	2 NHCH ₂ CO	1600 m	1615m	1610 s	1510m	1510m	1510s	1460w	1460w	1420m	-	1600m,u	1580m
CH ₃	1 NHCH ₂ CO	1600 m	1620s	1610 vs	1500s	1505s	1510s,u	1442m	1442m	1420m	1575 m,u	1575w,u	1575m,u
CH ₃	2 NHCH ₂ CO	1610 m	1612s	1615 vs	1505s	1505s	1510s	1450m	1445-55 ^{d,m}	1455m	1575 w,u	1580m,u	1580m
CH ₃	2 NHCH(CH ₃)CO	1608 m	1612s	1610 s	1505s	1506s	1510s	1450m	1455m	1460m	1575 w,u	1570m,u	1560m
CH ₃	2 N(CH ₃)CH ₂ CO	1615 m	1610m	1620 vs	1505m,u	1490m	1500s	1455m	1445m	1460m	1580 w,u	1570m,u	1560m,br
CH ₃	2 NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	1610 m	1615m	1605m,u	1505m	1510s	1510m	1445-	1445-60	1460m	1580 w,u	1560m	1560s
CH ₃	1 NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	1610 m	1610s	1615s	1510s	1505vs	1510m	1450m	1455s	1450m	1580 w,u	1560m	1560m,u
CH ₃	2 NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	1610 m	1610s	1615 vs	1505m	1508s	1508s	1450m	1450m	1460m	1575 w,u	1570m,u	1555s,u

* Suprapusă cu banda "Amidă II".

Tabelul 36

Dipeptide (I,II,III).

Amino acidul terminal	$\nu = C-H$						Deform.afara planului		Benzen mono substituit	
	I		II		III	2H adiacenți		I	II	
	I	II	I	II	III	I	II	III	I	II
Glicină	3030 w	3030 w	3030 w,u	860 m	860 m	840 m	725 m	740 m	740 m	740 m
DL-Alanina	3030 v	3070 v	3050 w,u	865 m	870 m	840 m	740 m	730 m	740 m	745 m
β -Alanina	3040 v	3075 v		860 m	865 m	845 m	740 m	745 m	745 m	745 m
Sarcosina	3040 v	3070 v		855 m	860 m	840 m	-	730 m	740 m	750 m
	3015 v	3035 v		868 m	853 m	835 m	735 m	740 m	750 m	750 m
Acid DL- α -aminobutiric	3070 v	3060 w		860 m	862 m	-	752 m	770 m	770 m	770 m
	3040 v	3070 v		860 m	860 m	840 m	-	740 m	750 m	760 m
Acid γ -aminobutiric	3070 w	3040 v		860 m	860 m	840 m	-	740 m	750 m	760 m
	3035 v	3070 w		860 m	860 m	840 m	-	740 m	750 m	760 m
DL-Valina	3030 w	3030 w		860 m	860 m	840 m	-	740 m	750 m	760 m
	3070 v	3050 v		860 m	860 m	840 m	-	740 m	750 m	760 m
L-Leucina	3030 v	3030 v		860 m	860 m	840 m	-	740 m	750 m	760 m
L-Fenilalanina	3030 v	3030 w	3035 w	860 m	860 m	840 m	-	740 m	750 m	760 m
	3070 v	3060 w	3070 w	860 m	860 m	840 m	-	740 m	750 m	760 m
Acid DL-aspartic	3045 w	3050 w	3050 w	852 m	865 m	850 m	755 m	772 m	772 m	772 m
	3080 w	3040 v	3050 w	855 m	865 m	840 m	755 m	772 m	772 m	772 m
Acid L-glutamic	3040 v	3050 w	3050 w	855 m	865 m	840 m	755 m	772 m	772 m	772 m
	3080 v	3050 w	3050 w	855 m	865 m	840 m	755 m	772 m	772 m	772 m

Tripeptide (IV,V,VI).

R	n	X	Deform. in afara plan. 2H adiacenți						Benzen mono substituit		
			IV	V	VI	IV	V	VI	IV	V	
H	1	NHCH ₂ CO	3040 w	3040 w,br	3030 w,br	860 m	860 m	850 m	860 m	745 m	740 m
H	2	NHCH ₂ CO	3070 w	3030 w	3020 m	860 m	860 m	850 m	860 m	750 m	750 m
CH ₃	1	NHCH ₂ CO	3030 w,br	3070 w	3080 m	860 m	860 m	845 m	860 m	-	760 m
CH ₃	2	NHCH ₂ CO	3035 w	3030 w	3050 w,br	860 m	860 m	845 m	860 m	755 m	765 m
CH ₃	2	NHCH(CH ₃)CO	3035 w,br	3040 w,br	3060 w,br	860 m	860 m	850 m	860 m	-	765 m
CH ₃	2	N(CH ₃)CH ₂ CO	3030 w	-	3040 w,br	860 m	860 m	840 m	860 m	-	745 m
CH ₃	2	NHCH[CH ₂ CH(CH ₃) ₂]CO	3070 w	3050 w,br	3050 w,br	860 m	860 m	840 m	860 m	745 m	740 m
CH ₃	1	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	3040 w	3050 w,br	3030 w	865 m	860 m	840 m	860 m	745 m	750 m
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	3080 w	3030 w	3070 w	860 m	865 m	835 m	860 m	750 m	745 m
CH ₃	2	NHCH(CH ₂ C ₆ H ₅)CO	3035 w	3070 w	3070 w	860 m	860 m	835 m	860 m	750 m	745 m

128

Tabelul 38

Analogi dipeptidici de Methotrexat.

Compusul	Acid	$\nu_{C=O}$	Amidă I	ν_{C-O}	ν_{NH}	Amidă III	ν_{CN}
6, MAB-Gly	1700 m,u	1660 s,u	1215 s	3200 s	3350 s	1305 m	1380 s
6, MAB-DL-Ala	1720 m,u	1670 s,u	1210 s	3200 s	3340 s	1310 m	1365 s
6, MAB- β -Ala	1710 m,u	1680 s,u	1212 s	3210 s	3350 s	1310 m	1370 s
6, MAB-Sar	1705 m,u	1680 s,u	1210 s	3220 s	3350 s	1315 m	1380 s
6, MAB-DL-Abu	1720 m,u	1685 s,u	1210 s	3220 s, br	3350 s	1310 m	1375 s
6, MAB- γ -Abu	1710 m,u	1680 s,u	1210 s	3200 s	3340 s	1310 m	1370 s
6, MAB-DL-Val	1725 m,u	1660 s,u	1195 s	-	3350 s	1280 m	1340 s
6, MAB-L-Leu	1720 m,u	-	1210 s	3210 s	3340 s	1300 m	1340 m
6, MAB-L-Phe	1730 m,u	1680 s,u	1210 s	3220 s	3340 s	-	1340 m,u
6, MAB-L-Glu	1730 m,u	1685 s,u	1210 s	3200 s	3350 s	1300 m	1340 m,u
6, MAB-D-Glu	1730 m,u	1680 s,u	1210 s	3200 s	3350 s	1300 m,u	1370 m
6, MAB-DL-Glu	1730 m,u	1685 s,u	1210 s	3200 s	3340 s	1310 m	1370 m
7, MAB-Gly	1700 m,u	1685 s,u	1210 m	-	3350 s	1300 m	1380-400 d, m
7, MAB-DL-Asp	1740 m,u	1685 s,u	1210 m	-	3350 s	1300 m	1390 m
7, MAB-L-Glu	1710 m	-	1210 m	-	3400 s	1300 m	1390 m
7, MAB-D-Glu	1710 m,u	1685 s,u	1210 m	-	3350 s	1300 m	1385-400 d, m
7, MAB-DL-Glu	1720 m,u	1680 s,u	1210 m	-	3350 s	1295 m,u	1380-400 d, m

Tabelul 39

Analogi tripeptidici de Methotrexat.

Acid	$\nu_{C=O}$	Amidă I	ν_{C-O}		ν_{N-H}	Amidă III	ν_{C-N}
2,4-Diamino-6-metil-pteridina	-	-	-	3190 s	3350 s	1300 vw	1360 s
2,4-Diamino-6-hidroxi-metil-pteridina	-	-	1210 s	3200 s	3330 s	1300 vw	1370 s
6,AB-Gly-DL-Asp	1730 m,u	1685 s,u	1190 s	-	3350 s	1310 m	1350 m 1380 m
6,AB-Gly-L-Glu	1725 m,u	1685 s,u	1200 m	-	3350 s	1310 m	-
6,MAB-Gly-DL-Asp	1725 m,u	1680 s,u	1215 m	-	3400 s	1305 m	-
6,MAB-Gly-L-Glu	1720 m	1680 s,u	1210 m	-	3350 s 3480 s	1310 m	1330 m,u 1375 m
6,MAB-DL-Ala-L-Glu	1720 m	1670 s	1215 m	-	3350 s	1310 m,u	1375 m
6,MAB-Sar-L-Glu	1730 m,u	1680 s,u	1205 m	3200 s	3340 s	-	1355 m
6,MAB-L-Leu-L-Glu	1728 m,u	1680 s,u	1215 m	3190 m,br	3340 s	1300 m	1345 m
6,MAB-L-Phe-DL-Asp	1730 m	1680 s,u	1210 m	-	3340 s	-	1370 m
6,MAB-L-Phe-L-Glu	1730 m,u	-	1220 m	-	3350 s	1310 m	1380 m

Tabelul 40

Analogi dipeptidici de Methotrexat.

	C=N		Amidă II		Amidă II		Vibrațiile scheletului pteridinic			Deformații în afara pl., 2H adiacenți		1 H (C ₆ , C ₇ H)
	C=N											
,MAB-Gly	1645 vs	1610 vs	1555 s	1510-20	1450 s	810 w	930 w	1000 w	840 m	-	-	-
,MAB-DL-Ala	1645 vs	1610 vs	1550 s	1510 vs ^{d,s}	1455 s	820 w	930 w	1005 w	835 m	870 vw	870 vw	870 vw
,MAB-β-Ala	1640 vs	1615 vs	1560 s	1510 s	1450 s	820 w	925 w	1005 w	840 m	860 w,u	860 w,u	860 w,u
,MAB-Sar	1650 vs	1610 vs.	1560 s	1495 s	1450 s	820 w	930 w	1000 w	835 m	-	-	-
,MAB-DL-Abu	1640 vs,u	1615 vs	-	1510 s	1450 s	820 vw	930 w,br	-	835 m	860 w,u	860 w,u	860 w,u
,MAB-γ-Abu	1640 vs,u	1615 vs	1560 s	1510-20 ^{d,s}	1450 s	820 w	930 w	1005 vw	835 m	-	-	-
,MAB-DL-Val	1640 vs,u	1610 vs	1555 s,u	1510-20 ^{d,s}	1440 m,u	-	-	-	840 m	-	-	-
,MAB-L-Leu	1645 vs,u	1615 vs	1560 m	1510 s	1450 m	-	930 w	1010 w	835 m	-	-	-
,MAB-L-Phe	1640 vs,u	1615 vs	1560 m,br	1510 s	1455 m	820 w	925 w,br	1020 w,br	835 m	-	-	-
,MAB-L-Glu	1645 vs	1610 vs	1560 m	1510 s	1450 m	820 w	930 w	1010 w	835 m	855 w	855 w	855 w
,MAB-D-Glu	1645 vs	1605 vs	1560 m	1510 s	1450 m	820 w	930 w	1010 w	835 m	855 w	855 w	855 w
,MAB-DL-Glu	1640 vs	1605 vs	1550 m	1510 s	1450 m	820 w	930 w	1010 vw	840 m	855 w	855 w	855 w
,MAB-Gly	1650 vs	1610 vs	1555 m	1510-20 ^{d,s}	1450 m	820 w	945 w	1000 w	835 m	-	-	-
,MAB-DL-Asp	1650 vs	1615 vs	1560 m	1515 s	1450 m	815 w	945 w	1025 w	835 m	-	-	-
,MAB-L-Glu	1640 vs	1610 vs	1555 m	1510 s	1450 m	-	945 w	1025 w	835 m	-	-	-
,MAB-D-Glu	1640 vs	1610 vs	1555 m	1510-20 ^{d,s}	1450 m	815 w	945 w	1025 w	835 m	-	-	-
,MAB-DL-Glu	1640 vs	1605 vs	1550 m	1510 s	1450 m	810 w	945 w	-	835 m	-	-	-

Analogi tripeptidici de Methotrexat.

	Cac, c=N		Amidă II Amidă II				Vibrațiile scheletului pteridinic		Deformații în afara planului 2H, adiacenți	l H
	C=N									
,4-Diamino-6-metil-pteridina	1640 vs	1600 s,u	1550 s	1515 m	1455 s	815 w	970 v	1040 v	-	860 vw
,4-Diamino-6-hidroxi-metil-pteridina	1640 s,u	1600 s,u	1550 s	1515 m	1455 m	815-30v,d	970 w	1010 w	-	860 vw
,AB-Gly-DL-Asp	1640 vs	1600 vs	1560 m	1520 s	1455 m	815 w	895 w	1000 v	840 w	-
,AB-Gly-L-Glu	1640 vs	1600 vs	1560 m,u	1520 s	1450 m	-	-	-	-	-
,MAB-Gly-DL-Asp	1640 vs	1610 vs	1550 m	1520 s	1450 m	820 w	-	1000 v	840 m	-
,MAB-Gly-L-Glu	1645 vs	1610 vs	1550 m	1520 s	1450 m	820 w	920 v	1010 v	845 m	-
,MAB-DL-Ala-L-Glu	1645 vs	1610 vs	1560 m	1510 s	1460 m	820 w	925 vw	1010 vw	835 m	-
,MAB-Sar-L-Glu	1650 s	1615 vs	1550 m	1495 m	1460 m	820 w	930 v	-	830 m	-
,MAB-L-Leu-L-Glu	1640-50 _{d,vs}	1615 vs	1555 m	1500 m	1455 m	820 w	930 v	1010 v	835 m	-
,MAB-L-Phe-DL-Asp	1650 vs	1615 vs	1540 m	1510 s	1460 m	820 w	920 v,br	-	835 m	-
,MAB-L-Phe-L-Glu	1660-1610 vs,br		1560-1520 s,br	1460 m	1460 m	820 w	-	-	840 m	-

A doua bandă, situată în cazul compușilor noștri la 1560-1550 cm^{-1} este de intensitate m-s și este probabil suprapusă peste banda de origine incertă identificată la peptide.

Nu s-a separat banda de la 1560-1515 cm^{-1} , ea fiind probabil suprapusă pe banda amidă II, caracteristică peptidelor din domeniul 1510-1500 cm^{-1} și pe banda $\nu_{\text{C=C}}$ a nucleului benzenic.

În general este însă dificil de separat benzile $\nu_{\text{C=C}}$ și $\nu_{\text{C=N}}$.

Alte vibrații de schelet.

În literatură /558/ se menționează un grup de trei benzi la 822, 933 și 1015 cm^{-1} atribuite vibrațiilor de schelet ale nucleului pteridinic, care au fost în general regăsite și în compuși sintetizați de noi.

Vibrații de întindere C-H.

Acestui mod de vibrație i-au fost atribuite în pteridinele 2,4,6- și 2,4,7-trisubstituite, benzile din domeniul 870-855 cm^{-1} (lit./558/ 900-860 cm^{-1}). Intensitatea este foarte slabă și, din acest motiv, banda nu apare în toți compușii investigați.

6.3 Spectre de dicroism circular.

Este surprinzător cât de neglijate au fost investigațiile privind configurația absolută a moleculelor analogilor de acid folic în literatură. Metodele fizico-chimice capabile să dea informații în acest sens (dispersia optică rotatorie, dicroismul circular, etc) nu par să fi fost aplicate în această clasă. O singură lucrare determină spectrul de dicroism circular (DC) al acidului folic și tiofolic, menționându-se că Aminopterina sintetizată după procedeul Taylor este racemizată /570/.

tură sînt extrem de puține și au fost obținute folosind alte metode fizice. Pe baza acestor date, se consideră actualmente că două modele ce descriu structura acidului folic în soluții apoase sînt susținute sub aspect experimental, și anume:

- fie existența unor dimeri tip "sandwich", în care două molecule de acid folic practic extinse sînt suprapuse "cap-la-coadă" /571/;

- fie posibilitatea plierii moleculei la nivelul elementului de structură C^9-N^{10} /563/.

Adoptarea unuia dintre aceste modele poate fi de o mare importanță teoretică și practică.

În cadrul lucrării de față au fost studiate, folosind determinările DC, o serie de derivați, și anume: Methotrexatul (6, MAB-L-Glu, 6-L-MTX) și antipodul său (6, MAB-D-Glu, 6-D-MTX), precum și izomerii de poziție 7, MAB-L-Glu și 7, MAB-D-Glu.

Analiza spectrelor DC relevă următoarele caracteristici:

- toți compușii studiați prezintă patru benzi DC:

I	380 nm
II	290-300 nm
III	250-260 nm
IV	200-220 nm

Dintre acestea au putut fi măsurate cu precizie benzile II și III.

- benzile (II și III) compușilor investigați sînt toate pozitive, indiferent de configurația L sau D a restului de acid glutamic terminal.

- se obțin valori $\Delta \epsilon$ foarte mari, fiind cuprinse între 11+22. Acidul folic însuși are $\Delta \epsilon = 1,2$, în concordanță cu literatura /570/.

- izomerii 7-MTX prezintă, față de 6-MTX, o deplasare batocromă de 10-15 nm.

Cea mai surprinzătoare comportare o reprezintă efectul Cotton pozitiv prezentat de ambii analogi L și D, precum și valoarea foar-

te mare pentru $\Delta \epsilon$.

Explicația acestui fenomen poate fi dată dacă se admite, cum de altfel a fost anterior sugerat în cazul acidului folic, că molecula acestui tip de compuși nu este alungită în sensul sistemelor componente ci pliată, astfel încât nucleul benzenic ajunge deasupra celui pteridinic (cele două nuclee făcând un unghi de cca. 20°).

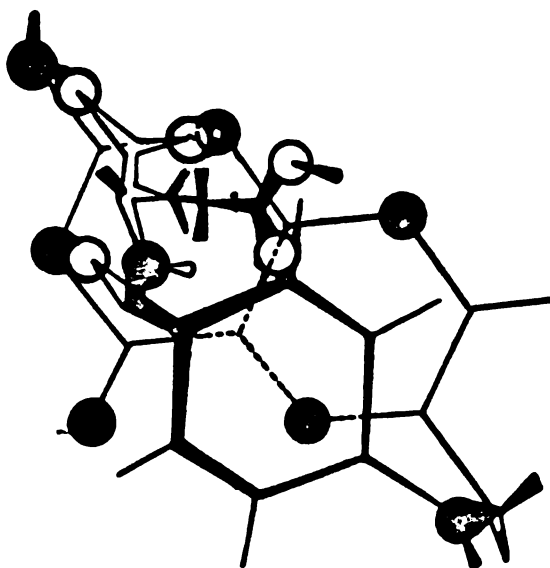
Analiza unor modele spațiale a 6-L-MTX relevă că grupările carboxilice ajung în dreptul grupărilor amino a nucleului pteridinic. În felul acesta, structura secundară pliată a 6-L-MTX este ținută în această stare datorită legăturilor de hidrogen puternice ce apar. Valoarea mare pentru $\Delta \epsilon$ pledează tocmai pentru o asemenea structură.

Mai mult, o asemenea structură pliată, menținută în această stare prin legături de hidrogen puternice, în care peste nucleul pteridinic există o punte, generează chiralitate planară, ca în cazul compușilor ansa. Mai departe, înseamnă că de fapt ar trebui să existe câte două perechi de izomeri pentru MTX:

- pentru 6-L-MTX: L-R(planar) și L-S(planar)

și respectiv:

- pentru 6-D-MTX: D-R(planar) și D-S(planar)



Efectul Cotton foarte puternic, măsurat la 250-260 nm, este determinat probabil de chiralitatea planară a nucleului pteridinic. Acest efect acoperă pe acela mult mai slab de la 300 nm. În plus, dacă se admite că prin sinteză rezultă compuși de chiralitate planară identică (de exemplu R), adică:

- pentru 6-L-MTX L-R(planar)

- pentru 6-D-MTX D-R(planar)

și dacă avem în vedere contribuția importantă a chiralității planare față de cea centrală (L sau D), se explică și faptul că cei doi compuși au efecte Cotton cu același semn.

Dovada hotărâtoare ar fi însă izolarea celor două specii diastereoizomere.

Din păcate însă, în literatură nu se menționează o asemenea situație în clasa analogilor de acid folic, ceea ce face ca cele de mai sus să nu reprezinte decât o ipoteză de interpretare a spectrelor DC.

7. Cromatografia.

Cromatografia s-a utilizat în mai multe scopuri:

- controlul desfășurării reacțiilor;
- verificarea purității compușilor;
- alegerea fracțiilor rezultate în urma purificării pe coloane cromatografice a analogilor de Methotrexat.

De asemenea, cromatografia (pe coloane) a fost utilizată la purificarea diversilor compuși.

Aspectele concrete privind aplicarea cromatografiei au fost expuse la capitolele respective, precum și la partea experimentală.

IV. ACTIVITATEA BIOLOGICA A NOILOR ANALOGI DI- SI TRIPEPTIDICI AI ACIDULUI FOLIC.

Așa cum am arătat anterior, singurul mod accesibil la ora actuală de abordare rațională a proiectării acestui gen de compuși îl reprezintă exploatarea relațiilor mai mult sau mai puțin empirice dintre structura lor chimică și activitatea biologică /290,572-580/. Aceasta constă în corelarea a două grăpuri de mărimi: pe de o parte parametrii structurali sau fizico-chimici iar pe de altă parte, parametrii biologici.

Din păcate, în cazul particular al antimetaboliților pteridinici ai acidului folic, nici una dintre aceste categorii de parametri nu este ușor accesibilă. Astfel, parametrii biologici pe care putem să-i determinăm (DL_{50} , CTS sau ICT) reprezintă rezultatul unei acțiuni globale a compusului respectiv asupra unui organism viu, răspuns în esență polimediat. Mai mult, determinarea acestor parametri suferă de un grad de imprecizie destul de ridicat, specific experimentului biochimic. Pe de altă parte, parametrii structurali semnificativi, datorită complexității moleculei, sînt dificil de determinat, de interpretat sau nu reflectă integral zona "activă" a moleculei.

Menționăm că au existat și unele încercări de corelări cantitative între densitățile de electroni ai atomilor de azot din nucleul pteridinic pe de o parte și acțiunea asupra DIFR, pe de altă parte. Rezultatele obținute nu au fost însă concludente.

În introducerea de la partea a II-a a lucrării am arătat obiectivele propuse în vederea lămuririi pe cît posibil, a unor as-

recte calitative privind relațiile dintre structura chimică și activitatea biologică a acestor compuși, insistând asupra elucidării rolului zonei peptidice, mai puțin studiată în literatura de specialitate.

Alegerea structurilor ce ulterior au fost sintetizate se bazează pe următoarele considerente:

- susterul 2,4-diamino-pteridinic a fost păstrat intact, deoarece este considerat aproape în unanimitate ca servind la legarea de DHFR;

- menținerea ca amino acid terminal (în cazul analogilor tripeptidici) a acidului glutamic (aspartic), implicat în transportul activ al acestor compuși;

- investigarea rolului centrului de asimetrie din restul peptidic, al importanței grupelor α și γ -carboxilice, precum și a dimensiunilor catenei peptidice asupra activității biologice, în raport cu compusul de bază.

Antagoniștii acidului folic preparați au fost testați:

a) in vitro, prin măsurarea inhibiției:

- creșterii microorganismului *Streptococcus faecalis*
- dihidrofolat reductazei (DHFR)
- replicării adenovirusului

b) in vivo, prin:

- determinarea toxicității (DL_{50})
- măsurarea inhibiției creșterii unor tumori experimentale, transplantate pe șoareci sau șobolani (leucemie L 1210 și carcinosarcom Walker 256)

1. Testarea activității in vitro a noilor analogi ai acidului folic cu structură pteridinică.

1.1. Acțiunea asupra microorganismului *S. faecalis*.

Pentru evaluarea activității asupra acestui microorganism, s-a utilizat mediul de cultură pentru acid folic /581/ modificat /582/ (în vederea transformării sale într-un mediu solid).

Rezultatele au fost exprimate prin măsurarea diametrului zonei de inhibiție microbiană (cm), în funcție de cantitatea de substanță (μg) /290,579,580/.

Din rezultatele obținute se poate constata că toți derivații au o activitate antibacteriană mai mult sau mai puțin semnificativă, indiferent de configurația L sau D a carbonului asimetric din restul de acid glutamic, atât în cazul compușilor 6-, cât și 7-substituiți pe nucleul pteridinic. O scădere mai accentuată a activității antibacteriene se observă la compușii în care numărul de amino acizi este mai mare, dar în special la 7,MAB-D-Glu. De remarcat activitatea ridicată a 6,MAB-L-Glu (MTX), 6,MAB-D-Glu și a 6,MAB-DL-Glu. Faptul sugerează că toți compușii testați prezintă o activitate antifolică, microorganismul utilizat necesitând această vitamină. Nu s-a putut evidenția nici o relație directă între activitatea antibacteriană pe de o parte și toxicitatea (DL_{50}) sau acțiunea asupra L 1210 și W 256 pe de altă parte.

1.2. Inhibarea dihidrofolat reductazei (DHFR).

S-a determinat inhibarea acestei enzime de către Methotrexat și analogii acestuia. Reacția catalizată de DHFR este următoarea:



determinându-se experimental (spectrofotometric) variația coeficientului de extincție (la 340 nm) în urma transformării NADPH_2 în NADP și a DHF în THF (la această lungime de undă THF nu absoarbe) /583/. Se lucrează cu enzimă extrasă din ficat de șobolan /129, 244,584/. Astfel, după omogenizarea ficatului în mediu de tampon fosfat disodic 0,1 M pH 7,3 și separarea supernatantului prin centrifugare (la 8000 rot/min), din acesta din urmă enzima se separă prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu (DHFR este conți-

Tabelul 42

Acțiunea analogilor MTX asupra *S. faecalis*.

Corpusul	Cantitatea de substanță (μg)					
	100	50	10	1	0,5	0,1
	Diametrul haloului (cm)					
6, MAB-Gly	3,3	2,8	2,5	2,2	2,2	2,0
6, MAB-DL-Ala	3,6	3,4	3,1	2,4	2,4	2,2
6, MAB-β-Ala	2,9	2,7	2,7	2,4	2,0	2,0
6, MAB-Sar	2,3	2,0	2,0			
6, MAB-DL-Abu	3,0	3,0	3,0	2,5	2,0	
6, MAB-γ-Abu	3,2	3,1	2,7	2,5	2,2	1,9
6, MAB-DL-Val	3,1	2,9	2,5	2,0	1,9	
6, MAB-L-Leu	3,0	2,9	2,8	2,5	2,0	
6, MAB-L-Phe	3,2	3,2	2,6	2,4	1,9	1,9
6, MAB-L-Glu	4,0	4,0	4,0	4,0	3,4	3,2
6, MAB-D-Glu	4,0	3,8	3,6	3,3	3,2	2,7
6, MAB-DL-Glu	3,9	3,8	3,6	3,5	3,4	2,7
7, MAB-Gly	2,0	2,0				
7, MAB-DL-Asp	3,5	3,3	3,2	2,6	2,6	2,0
7, MAB-L-Glu	3,1	3,1	2,6	2,6	2,1	
7, MAB-D-Glu	2,2					
7, MAB-DL-Glu	3,2	3,1	2,8	2,4	2,3	
6, AB-Gly-DL-Asp	2,3	2,1				
6, AB-Gly-L-Glu	2,8	2,7	2,4			
6, MAB-Gly-DL-Asp	3,0	3,0	2,5	2,0	2,0	1,8
6, MAB-Gly-L-Glu	2,8	2,8	2,3	2,1	2,0	1,8
6, MAB-DL-Asp-L-Glu	3,1	3,0	2,4	2,1	2,1	
6, MAB-Sar-L-Glu	3,3	3,0	2,5	2,4	1,9	1,9
6, MAB-L-Leu-L-Glu	3,3	3,1	2,9	2,2	2,1	2,1
6, MAB-L-Phe-DL-Asp	3,0	2,8	2,8	2,1	2,0	
6, MAB-L-Phe-L-Glu	3,3	3,2	2,8	2,5	2,4	2,2

nută în fracția care depune la o concentrație de 35-85% sulfat de amoniu). Excesul de sare se îndepărtează prin desalifiere pe coloană de Sephadex G-25, rezultând astfel o soluție de enzimă parțial purificată, stabilă pentru cea. 6 luni (la -10°C). Purificări mai avansate se obțin prin cromatografii pe coloane de Sephadex G-75 /585/, DEAE-celuloză /585-587/, etc. iar final prin cromatografie de afinitate /139,585,588,589/. Se determină apoi activitatea specifică a enzimei (A) /590/ cu relația:

$$A = \frac{\mu\text{M substrat redus}}{\text{mg proteină} \times \text{min}}$$

Conținutul în proteină totală se stabilește prin măsurarea absorbției la 280 nm, utilizând drept etalon albumina de ser uman /591, 592/. În sfârșit, se determină inhibiția DHFR de către MTX și analogii săi, utilizând procedeul folosit la măsurarea activității enzimei, adăugând de această dată și diferite cantități de antagonist /393/. Rezultatele, exprimate în raport cu Methotrexatul, sînt reproduse în Tabelul 43 și sugerează următoarele concluzii:

- inhibiția DHFR crește cu lungirea catenei amino acidului terminal, în cazul analogilor dipeptidici ai Methotrexatului;
- la o anumită mărime a amino acidului terminal se obțin inhibiții superioare capului de serie;
- mărirea distanței între gruparea amino și carboxil, micșorează inhibiția acestei enzime;
- în seria analogilor 7-substituiți pe nucleul pteridinic, inhibițiile reduse ale DHFR reflectă lipsa de activitate obținută in vivo cu acești compuși;
- analogii 6,7-AB-D- și -DL-Glu se comportă invers față de enzimă, în raport cu acțiunea antitumorală;
- în general, nu pot fi obținute corelații între acțiunea asupra DHFR și activitatea față de L 1210 ;
- în seria analogilor tripeptidici, compusul cel mai activ

Tabelul 43

Acțiunea asupra dihidrofolat reductazei.

Compusul	$I_{50}/I_{50}(\text{MTX})$
6,MAB-Gly	67,8
6,MAB-DL-Ala	2,5
6,MAB- β -Ala	5,45
6,MAB-Sar	97
6,MAB-DL-Abu	1,46
6,MAB- γ -Abu	44,5
6,MAB-DL-Val	2,6
6,MAB-L-Leu	0,46
6,MAB-L-Phe	1,03
6,MAB-L-Glu(MTX)	1,0
6,MAB-D-Glu	3,7
6,MAB-DL-Glu	1,25
7,MAB-Gly	274
7,MAB-L-Glu	1050
7,MAB-D-Glu	73
7,MAB-DL-Glu	355
6,AB-Gly-DL-Asp	162
6,AB-Gly-L-Glu	110
6,MAB-Gly-DL-Asp	15,1
6,MAB-Gly-L-Glu	21,7
6,MAB-DL-Ala-L-Glu	4,55
6, MAB-Sar-L-Glu	42,6
6,MAB-L-Leu-L-Glu	8,0
6,MAB-L-Phe-DL-Asp	33,3
6,MAB-L-Phe-L-Glu	11,2

asupra tumorilor experimentale, este și cel mai slab inhibitor al DHFR;

- se pare că analogii tripeptidici de Methotrexat lipsiți de grupa N¹⁰-metil sînt considerabil mai puțin inhibitori ai enzimei.

Cele de mai sus indică slaba corelație între rezultatele determinărilor in vitro (asupra DHFR) și in vivo (asupra tumorilor experimentale) și sugerează implicarea altor moduri de intervenție a antifolicelor, în primul rînd a mecanismului de transport.

1.3. Acțiunea asupra adenovirusului.

6, MAB-L-Glu (MTX), 6, MAB-D-Glu și 7, MAB-L-Glu provoacă inhibiția multiplicării adenovirusului /594/. De notat că în acest sistem și 7, MAB-L-Glu este deosebit de activ, ceea ce sugerează un mecanism diferit de acțiune în cazul adenovirusului, comparativ cu testele bacteriene și cele de inhibiție a unor tumori experimentale (L 1210 și W 256).

2. Testarea in vivo a activității noilor analogi ai acidului folic cu structură pteridinică.

2.1. Toxicitatea (DL₅₀).

Toxicitatea a fost determinată pe șobolani Wistar de ambele sexe în greutate de 80-100 g. Calcularea valorii DL₅₀ s-a făcut prin metoda Cornfield-Mantel /595/, înregistrîndu-se mortalitatea la 14 zile de la administrarea substanțelor. Rezultatele obținute sînt reproduse în Tabelul 44.

Se poate constata că valoarea toxicității nu depinde de configurația D sau L a carbonului asimetric din restul de acid glutamic (în cazul MTX). Surprinzătoare este însă valoarea dublă a DL₅₀ în cazul racemicului /290,578/.

Acest parametru este foarte sensibil în raport cu poziția ca-

teori peptidice pe nucleul pteridinic (în 6- sau 7-^HTX)/520,522/. Astfel, 7,^HAB-L-Glu este de peste 35 ori mai puțin toxic decât 6,^HAB-L-Glu. O constatare similară se înregistrează atât în cazul acțiunii asupra sistemului hematopoietic, 6-^HTX fiind puternic leucopenizant, în timp ce 7-^HTX nu prezintă acest efect, cât și asupra mucoaselor. De altfel, aceste efecte secundare (leucopenie, toxicitate asupra mucoaselor) lipsesc și la restul compușilor sintetizați (indiferent dacă sînt 6- sau 7-substituiți) cu excepția surprinzătoare a 6,^HAB-Gly, de altfel total inactivă asupra L 1210 /290,531/. Această observație pune sub semnul întrebării aprecierea că o activitate antifolică este însoțită întotdeauna și de o acțiune puternic inhibitoare asupra măduvei.

În seria analogilor di- și tripeptidici, toxicitatea exprimată prin DL₅₀ este coborîtă, în unele cazuri DL₅₀ depășind chiar 1000mg/kg /290,531,532,579,580/.

Nu se observă de asemenea nici o corelație între toxicitate și inhibiția L 1210 și W 256.

2.2. Acțiunea asupra unor neoplazii experimentale.

2.2.1. Acțiunea asupra L 1210.

Activitatea noilor compuși a fost studiată asupra leucemiei limfoide acute L 1210 /596/, pe șoareci inbred DBA/2. S-au inoculat intraperitoneal 10^6 celule leucemice, tratamentul începînd la 24 h după această operație. Se calculează creșterea timpului de supraviețuire (CTS) a animalelor tratate față de martori (Tabelul 44).

Din datele obținute rezultă că existența acidului glutamic terminal este de o importanță deosebită, pentru o activitate anti-leucemică marcată. Înlocuirea sa cu alți amino acizi scade mult sau chiar anulează activitatea față de acest sistem. Grupa α -CO₂H pare mai importantă decât cea γ , observîndu-se o oarecare tendință de restaurare a activității, odată cu creșterea mărimii amino aci-

Activitatea anticanceroasă a analogilor MTX.

Compusul	DL ₅₀ mg/Kg	L 1210		W 256	
		Doza(mg/Kg) x nr.admin.	CTS %	Doza(mg/Kg) x nr.admin.	CTS %
6,MAB-Gly	250	23 x 7	0	-	-
6,MAB-DL-Ala	349	23 x 6	0	-	-
6,MAB- β -Ala	250	25 x 6	19	-	-
6,MAB-Sar	400	50 x 6	0	-	-
6,MAB-DL-Abu	925	80 x 9	16	60 x 14	47
6,MAB- γ -Abu	106	10 x 8	0	8 x 14	55
6,MAB-DL-Val	200	20 x 7	0	-	-
6,MAB-L-Leu	710	90 x 9	24	-	-
6,MAB-L-Phe	500	45 x 10	14	40 x 7	58
6,MAB-L-Glu(MTX)	18	0,5 x 10	134	5 x 1	80
6,MAB-D-Glu	17	0,5 x 10	87	7 x 1	56
6,MAB-DL-Glu	34,6	0,5 x 10	150	7 x 1	95
7,MAB-Gly	250	50 x 8	20	-	-
7,MAB-DL-Asp	200	40 x 8	0	40 x 14	29
7,MAB-L-Glu	691	20 x 8	30	50 x 13	33
7,MAB-D-Glu	500	70 x 5	0	-	-
7,MAB-DL-Glu	470	45 x 10	38	45 x 12	35
6,AB-Gly-DL-Asp	200	40 x 10	69	60 x 14	55
6,AB-Gly-L-Glu	400	23 x 6	14	18 x 13	30
6,MAB-Gly-DL-Asp	500	100 x 8	40	100 x 13	41
6,MAB-Gly-L-Glu	830	100 x 8	0	-	-
6,MAB-DL-Ala-L-Glu	500	50 x 6	19	-	-
6,MAB-Sar-L-Glu	1000	100 x 6	0	-	-
6,MAB-L-Leu-L-Glu	500	50 x 8	0	-	-
6,MAB-L-Phe-DL-Asp	1000	100 x 7	0	-	-
6,MAB-L-Phe-L-Glu	500	50 x 10	25	-	-

cali (la păstrarea grupării α - CC_2H) /531/. De asemenea se constată o scădere marcată a activității antileucemice la analogii 7-substituiți /290, 520, 522, 524, 572-580/. Activități scăzute se observă și în cazul analogilor tripeptidici (cu excepția 6, AB-Gly-DL-Asp) ce prezintă o activitate interesantă asupra L 1210 /290, 532, 577, 579, 580/. De remarcat este faptul că derivații de MTX la care acidul L-glutamic este înlocuit cu D- sau DL-glutamic își păstrează activitatea, uneori (în cazul 6, AB-DL-Glu) chiar și-o ridică /290, 524, 525, 578/.

2.2.2. Acțiunea asupra carcinosarcomului Walker 256.

Această tumoră a fost transplantată subcutanat pe șobolani Wistar, tratamentul începând la 7 zile de la grefarea tumorii, când aceasta este constituită. Se determină inhibiția creșterii tumorii (ICT), în raport cu animalele din lotul de control (netratate) (Tabelul 44).

Se poate constata că toți analogii di- sau tripeptidici ai acidului folic sînt moderat sau slab activi față de această tumoră, indiferent de toxicitatea asupra gazdei a compusului respectiv sau de activitatea asupra L 1210. Chiar derivații 7-substituiți prezintă un oarecare grad de activitate asupra carcinosarcomului W256. Între compușii testați, analogul racemic al Methotrexatului este cel mai activ (depășind chiar Methotrexatul). Acest lucru ar putea constitui o calitate, în special pentru compușii puțin toxici și neleucopenizanți /520, 522, 524, 531, 532, 578-580/.

Constatări privind activitatea biologică a noilor analogi ai acidului folic sintetizați.

1. Pentru activitatea biologică în sisterele de testare utilizate (L 1210, W 256) rezultă că configurația centrului de asimetrie din restul de acid glutamic nu este foarte importantă. Mai mult,

este surprinzătoare activitatea mai ridicată a racemicului (6,7-MAB-DL-Glu) comparativ cu cea a izomerului L (6,7-MAB-L-Glu). Explicația acestui fapt este dificil de dat, fenomenul fiind legat probabil de configurația intrinsecă a moleculei. Prin metode fizice s-a demonstrat că molecula acestui tip de compuși poate adopta în soluție o asemenea conformație, încât datorită rotației libere între atomii C⁹-N¹⁰, inelul benzenic să ajungă deasupra celui pteridinic, planele acestora făcând un unghi de cca. 20°. Mai este de asemenea posibil în soluție ca două molecule să se așeze cu inelul benzenic al uneia, deasupra inelului pteridinic al celeilalte, în acest fel grupările carboxil ale celor două molecule fiind la distanța maximă. Este deci posibil ca o conformație de acest tip să apară și în cazul compusului racemic 6,7-MAB-DL-Glu discutat.

Recent, prin studii DC asupra 6-L-MTX și 6-D-MTX a fost confirmată existența unei structuri secundare în cazul acestor compuși asemănătoare cazului acidului folic. Mai mult, această structură pliată, în care peste inelul pteridinic plan se găsește o punte, este stabilizată prin legături de hidrogen puternice între cele două grupări carboxil ale acidului glutamic terminal și grupările amino de pe nucleul pteridinic. Această structură secundară trebuie să fie responsabilă de activitatea biologică a acestor compuși.

2. Existența unui rest de acid glutamic legat direct de acidul 4-amino-benzoic pare necesară pentru o activitate biologică ridicată. Nici înlocuirea lui cu alți amino acizi (vezi analogii dipeptidici), nici separarea lui de acidul 4-amino-benzoic (ca în analogii tripeptidici) prin intercalarea unui amino acid suplimentar nu aduce activitatea la nivelul aceleia a Methotrexatului. Păstrarea acidului glutamic terminal în analogii tripeptidici ai acidului folic, pune sub semnul întrebării implicarea acestui amino acid exclusiv în transportul activ, dată fiind slaba activitate a unor asemenea compuși.

constata o oarecare tendință de creștere a activității cu mărirea amino acizilor (în cazul păstrării grupei α -CO₂H), aceasta rămânând totuși cu mult sub valoarea MTX.

4. Nu se poate face o discriminare netă între rolul grupărilor α și γ -carboxilice, deși se pare că grupa α -CO₂H (vezi compusul 6,MAB-DL-Abu) este mai importantă decât γ -CO₂H(6,MAB- γ -Abu). Comparând acești doi compuși cu 6,MAB-L-Glu (în care avem ambele grupări α și γ -CO₂H), se observă necesitatea prezenței concomitente a ambelor grupări în aceeași moleculă, pentru o activitate antileucemică marcată. Trebuie totuși remarcată toxicitatea asupra măduvei a 6,MAB-Gly, comparativ cu MTX, fapt neobservat la restul compușilor.

5. Lungirea porțiunii peptidice prin introducerea unui amino acid suplimentar între restul de acid 4-amino-benzoic și cel de acid glutamic (aspartic) nu pare să aducă avantaje, cu toată menținerea în partea finală a celor doi amino acizi dicarboxilici, prin această modificare rezultând o scădere a toxicității, inclusiv a efectelor secundare, dar și a activității biologice în sistemele utilizate pentru testare. Trebuie totuși remarcată activitatea 6,AB-Gly-DL-Asp, comparabilă cu a Aminopterinei (și cca. jumătate din cea a Methotrexatului) fără a prezenta însă toxicitatea și efectele secundare ale acestora.

6. Schimbarea locului de atașare a restului peptidic pe nucleul pteridinic (din poziția 6 în 7) duce la compuși având toxicitatea redusă, dar și o activitate mult diminuată asupra leucemiei L 1210 și carcinosarcomului W 256. Acest fapt, ca și lipsa de activitate a unor analogi ai Methotrexatului având substituite în poziția 7, grupe mici (OH, CH₃), permite să se aprecieze importanța atomului C⁷ liber. Astfel, alături de grupările 2,4-diamino și atomul N¹, lipsa oricărui substituent pe atomul C⁷ pare a avea o semnificație deosebită în conferirea unei activități biologice corespunzătoare pentru acest tip de compuși și în sisteme-

le de testare utilizate.

In încheiere, trebuie menționat că, deși compușii testați prezintă practic activități biologice reduse (cu excepția 6,AB-DL-Glu și 6,AB-Gly-DL-Asp), s-a reușit elucidarea câtorva aspecte importante privind rolul porțiunii peptidice a analogilor acidului folic cu structură pteridinică, în conferire unor proprietăți farmacologice potrivite, pentru proiectarea de noi compuși potențial anticanceroși. Din nou se pune problema găsirii unor metode de testare corespunzătoare pentru a putea aprecia corect calitatea substanțelor sintetizate.

C O N C L U Z I I

În prima parte a lucrării este prezentat stadiul actual al cunoștințelor noastre în domeniul activității anticancerogene a antimetaboliților pteridinici ai acidului folic, reprezentând o sinteză a acestei probleme complexe, expuse de noi pe larg într-o serie de cinci articole publicate. Nici partea consacrată metodelor de sinteză aplicate în clasa analogilor acidului folic nu a fost tratată într-o amploare comparabilă în literatura de specialitate. S-au dezvoltat în mod critic, în special părțile direct implicate sau legate de metodologia folosită la sinteza noilor compuși din partea II-a a lucrării, trecându-se în revistă și alte metode care nu au fost încercate de noi.

Partea a II-a a lucrării cuprinde sinteză, studiul fizico-chimic și biologic al unor noi analogi di- și tripeptidici ai acidului folic.

În cursul lucrărilor de sinteză s-au preparat o serie de intermediari și compuși finali noi, nedescrși în literatură și anume:

- derivați ai unor dipeptide (esteri de dipeptide și dipeptide N-benziloxycarbonilate, dipeptide) (36 compuși noi);
 - derivați ai unor tripeptide (esteri de tripeptide și tripeptide N-benziloxycarbonilare, tripeptide) (27 compuși noi);
 - analogi dipeptidici ai acidului folic (11 compuși noi);
 - analogi tripeptidici ai acidului folic (9 compuși noi);
 - analogi 7-substituiți ai acidului folic (5 compuși noi).
- S-au preparat de asemenea un număr de compuși cunoscuți, fie

prin procedee noi sau îmbunătățite.

S-a reușit sinteza analogilor de acid folic izomeric puri (6- sau 7-substituiți pe nucleul pteridinic).

S-au pus la punct și s-au îmbunătățit o serie de procedee de sinteză, cum ar fi:

- esterificarea azeotropă a amino acizilor;
- N-benziloxycarbonilarea acidului 4-(metilamino)-benzoic în mediu de acid acetic-acetat de sodiu, precum și sinteza pe o cale nouă a acidului 4-[metil(benziloxycarbonil)amino]benzoic;
- hidrogenoliza N-benziloxycarbonil-derivaților;
- îmbunătățirea sintezei malonodinitrilului, 2,4,5,6-tetraaminopirimidinei, 2,4-diamino-6-hidroximetil-pteridinei, etc;
- sinteza pe o cale nouă a Methotrexatului, aplicată la scară de pilot, și care apoi a fost utilizată și la prepararea tuturor celorlalți analogi.

Structura tuturor compușilor noi sintetizați a fost stabilită atât prin analiză elementară, cât și prin metode spectroscopice (u.v., i.r., RMN, etc). S-a demonstrat formarea exclusivă a izomerilor 6 și 7 ai Methotrexatului în cadrul procedeelelor de sinteză utilizate, atât prin degradarea chimică a produsului de reacție, cât și prin spectroscopie RMN. S-au efectuat pentru prima dată spectrele DC ale 6-MTX și 7-MTX, aducându-se astfel noi dovezi în sprijinul structurii secundare și în cazul MTX și avansându-se pe această bază ipoteza posibilității existenței de chiralitate planară pentru acest compus.

Studiile biologice (asupra microorganismului *Streptococcus faecalis*, dihidrofolat reductazei, adenovirusului și asupra unor turori experimentale) au scos în evidență atât activitatea antifolică a tuturor compușilor sintetizați, cât și unele concluzii importante privind relațiile dintre structura chimică și activitatea biologică în această clasă de compuși, și anume:

- importanța acidului glutamic terminal, direct atașat de

nucleul pteridinic;

- însemnătatea legării restului peptidic în poziția 6 pe nucleul pteridinic și faptul că poziția 7 de pe acesta trebuie să rămână liberă;

- s-a studiat rolul relativ al grupărilor α și γ -carboxilice;

- s-a încercat explicarea diferențelor biologice relativ mici între antipozii optici și cel racemic în cazul MTX, prin dovedirea structurii secundare și evidențierea importanței acesteia.

C parte din datele prezentate în această teză au făcut obiectul unor brevete, publicații sau comunicări.

LISTA LUCRARILOR PUBLICATE.

BREVETE

1. I.Niculescu-Duvăz, L.V.Feyns, D.C.Şuster, G.Ciuştea-
Rom.Pat.55885(1970), Ger.Pat.2413716(1974), U.S.Pat.3989703
(1976), Brit:Pat.1414752(1976).
2. D.C.Şuster, I.Niculescu-Duvăz, A.Pănescu, V.Dobre-
Rom.Pat.56210(1970).
3. G.Ciuştea, D.C.Şuster, A.Dumitrescu, M.Ionescu-
Rom.Pat.58475(1971).
4. D.C.Şuster, G.Botez, V.Neagu- Rom.Pat.59968(1972).
5. D.C.Şuster, S.Angelescu- Rom.Pat.60252(1973).
6. D.C.Şuster- Rom.Pat.64531(1977).

ARTICOLE

1. D.C.Şuster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 15,161(1976).
2. D.C.Şuster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 16,1(1977).
3. D.C.Şuster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 16,81(1977).
4. D.C.Şuster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 16,161(1977).
5. D.C.Şuster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 16,175(1977).
6. V.Dobre, M.Sbenghe, D.C.Şuster, C.Russo-Goţ, G.Ciuştea-
Oncologia 16,109(1977).
7. V.Dobre, M.Sbenghe, D.C.Şuster- Oncologia - sub tipar .
8. D.C.Şuster, G.Botez, L.V.Feyns, V.Dobre, I.Niculescu-Duvăz-

9. D.C.Țuțor, G.Ciugton, A.Dumitrescu, L.V.Feyns, E.Tărnăuceanu, G.Botez, S.Angolescu, V.Dobre, I.Niculescu-Duvăz-
Rev.Roum.Chim.22,1195(1977).
10. D.C.Țuțor, E.Tărnăuceanu, I.Niculescu-Duvăz-Rev.Chim.(Buc.)
23,793(1977).
11. D.C.Țuțor, L.V.Feyns, G.Ciugtea, G.Botez, V.Dobre, R.Bick,
I.Niculescu-Duvăz- J.Med.Chem.17,758(1974).
12. D.C.Țuțor, E.Tărnăuceanu, M.Ionescu, V.Dobre, I.Niculescu-
Duvăz- J.Med.Chem. - sub tipar.
13. D.C.Țuțor, E.Tărnăuceanu, G.Botez, V.Dobre, I.Niculescu-
Duvăz- J.Med.Chem. - sub tipar.

PARTEA EXPERIMENTALA

Punctele de topire au fost determinate cu un aparat Boetius și sînt necorectate. Cromatogramele în strat subțire au fost efectuate pe plăcuțe Merck din kieselgel F₂₅₄ iar cele pe hîrtie folosind hîrtia Whatman Nr. 1. Spectrele u.v. s-au efectuat cu spectrofotometrul CF₄ Optica Milano sau cu Spekord uv-vis Carl zeiss Jena iar spectrele i.r. au fost determinate cu spectrofotometrul UR-10 Carl Zeiss Jena. Spectrele RMN au fost efectuate cu un spectrometru Varian T 60 sau cu un aparat JEOL 100-Mz. Curbele de dicroism circular au fost ridicate cu dicrograful Jouan-Roussel-Paris.

1. CIANACETAMIDA s-a preparat din cianacetat de etil și amoniac, conform procedurii descris în literatură. Randament 75% (p.t. 118-9°, lit./439/ 119-120°).

2. MALONODINITRILUL s-a sintetizat din cianacetamidă și oxidul de fosfor, după procedeul lui Surrey /441,442/, cu mențiunea că micșorarea la jumătate a cantității de clorură de sodiu ușurează manipularea, fără a influența randamentul. Randament 70% (p.t. 30°, lit./442/28-30°; p.f. 102°/5-6 mm Hg, lit./444/ 113-8°/25 mm Hg).

3. 2,4,6-TRIAMINOPIRIMIDINA s-a preparat conform procedurii Mallette și colab./429/ din malonodinitril și clorhidrat de guanidină în prezența etoxidului de sodiu. Produsul nu s-a separat din amestecul cu clorura de sodiu, ci s-a folosit neat departe sub aceeași formă.

4. 2,4,6-TRIAMINO-5-NITROZOPIRIMIDINA s-a sintetizat în două variante, și anume:

4.1. Prin nitrozarea 2,4,6-triaminopirimidinei cu acid azotos /429,432/. Produsul umed, de culoare roșie s-a introdus imediat la reducere, fără a mai fi necesară o purificare.

4.2. Prin ciclizarea amidinelor, de asemenea în două variante, anume:

4.2.1. Din malonodinitril prin nitrozare cu acid azotos la izonitrozomalonodinitril, separarea sării de argint, transformarea acesteia în sare de potasiu și apoi depunerea, după adăugarea guanidinei, a malonodinitrilizonitrozatului de guanidiniu. Acesta din urmă se ciclizează prin încălzirea soluției sale în dietilformamidă, în prezența carbonatului de potasiu. Adăugarea apei la mediul de reacție separă 2,4,6-triamino-5-nitrozopirimidina, care apoi se filtrează, se spală și se usucă. Randament 85% (p.t. 300°C lit./437,438/ 345-346°).

4.2.2. După procedeul /436/, care reprezintă de fapt o simplificare a celui descris anterior, prin aceea că nu se mai separă sărurile de argint și potasiu ale izonitrozomalonodinitrilului. Randament 83% (lit./436/ 88%). De menționat că am obținut aceleași randamente utilizând clorhidratul sau azotatul de guanidină în locul carbonatului.

5. 2,4,5,6-TETRAAMINOPIRIMIDINA s-a preparat prin reducerea 2,4,6-triamino-5-nitrozopirimidinei:

5.1. Cu ditionit de sodiu, prin adaptarea procedurii descris în literatură /427/, față de care prezintă avantajul reproductibilității. Astfel, 500 g (3,25 moli) 2,4,6-triamino-5-nitrozopirimidină se suspendă în 10 l apă. Se aduce suspensia la 35°, se adaugă ditionit de sodiu (2100 g), culoarea schimbându-se din roșu în roz, iar temperatura ajungând la 55°. Se încălzește apoi la 75-80°, se filtrează cald, filtratul se răcește la 0-5° peste noapte iar solidul depus se filtrează, se spală cu apă și se usucă.

zultă 520 g sare bisulfitică de tetraaminopirimidină. Acest produs (520 g) se suspendă în 5900 ml apă, se aduce la fierbere și se adaugă încet, cu grijă, 900 ml acid clorhidric concentrat. Soluția se tratează cu cărbune, apoi se filtrează fierbinte. La filtrat se adaugă 700 ml acid clorhidric concentrat, apoi acesta se răcește la 0-5° peste noapte. Solidul rezultat se filtrează și se usucă, rezultând 410 g (60%) diclorhidrat de tetraaminopirimidină. Spectrul u.v., λ_{\max} (log ϵ): 273 (4,031), lit./427/ 272 (4,017).

5.2. Cu metabisulfid de sodiu, după Schrage și Hitchings /430/, dar procedeul s-a dovedit necorespunzător, datorită hidrolizei parțiale a aminopirimidinei.

5.3. Catalitic, utilizând drept catalizator negrul de paladiu. Astfel, 2,4,6-triamino-5-nitrozopirimidina și catalizatorul se suspendă în alcool etilic absolut și se supun hidrogenării la temperatura camerei și presiunea normală. Sfârșitul reacției se constată prin schimbarea culorii și trecerea produsului în soluție. După îndepărtarea catalizatorului prin filtrare și adăugarea unei soluții apoase de acid sulfuric, depune sulfatul de tetraaminopirimidină /434/.

6. 2,4-DIAMINO-6-HIDROXIMETIL-PTERIDINA s-a preparat în două variante, îmbunătățiri ale procedurii lui Baugh și Shaw /419/:

6.1. O soluție de clorură de bariu (6,4 g) în cantitatea minimă de apă se adaugă cu agitare, la 70-80°, la o suspensie de 7,6 g sulfat de tetraaminopirimidină în 104 ml apă. Suspensia se agită 30 min., sulfatul de bariu format se filtrează și se spală cu 20 ml apă de 70°. Soluția, ce conține diclorhidrat de tetraaminopirimidină, se diluează cu apă până la un volum final de 400 ml. La o soluție care conține 128 g acetat de sodiu, 136 g combinația bisulfitică a 1,3-dihidroxiacetonei și 4,6 g clorhidrat de cisteină în 300 ml apă, aflată într-un balon prevăzut cu agitator și barbotor de aer, se adaugă cei 400 ml soluție de tetraaminopirimidină, pornind imediat agitarea și barbotarea aerului. Se adaugă apoi încet

diat jumătate dintr-o soluție de 8 g bioxid de seleniu în cantitatea minimă de apă, cealaltă jumătate fiind adăugată 4 h mai târziu. Reacția continuă 24 h la temperatura camerei, cu barbotare de aer. Se răcoște apoi la 0° , precipitatul depus se filtrează, se spală cu apă, alcool, alcool-eter (1:1), eter și se usucă. După recristalizare dintr-o soluție de metabisulfid de sodiu 5%, rezultă 3,8 g (72%) 2,4-diamino-6-hidroxi-metil-pteridină, prezentând același spectru u.v. ca cel din literatură /419/.

6.2. 10,5 g (0,05 moli) diclorhidrat de tetraaminopirimidină dizolvați în 150 ml apă și 8,5 g bioxid de seleniu (în 150 ml apă) au fost adăugate sub agitare la o soluție de 330 g acetat de sodiu și 9 g 1,3-dihidroxiacetonă în 550 ml apă. Amestecul a fost încălzit la 35° pentru 1,5 h, sub barbotare de aer (sfîrsitul reacției a fost determinat spectrofotometric), apoi s-a răcit rapid la 0° , menținându-se la această temperatură 3-4 h. Precipitatul format s-a filtrat și spălat cu apă, apoi s-a suspendat în 250 ml apă încălzită la fierbere. La filtrat se adaugă 25 g clorură de sodiu și se lasă peste noapte la 0° . Solidul depus s-a filtrat, spălat cu apă, alcool, alcool-eter (1:1), eter și s-a uscat în vid (P_2O_5) la 60° . Rezultă astfel 7,5-8 g (80-85%) 2,4-diamino-6-hidroxi-metil-pteridină (cromatografiere pe hîrtie Whatman Nr.1, ascendent, eluent: n-butanol- etanol-apă 100:35:72, R_f 0,35, spectrul u.v. identic cu lit./419/).

7. 2,4-DIAMINO-6-CLOROMETIL-PTERIDINA. 10 g 2,4-diamino-6-hidroxi-metil-pteridină fin pulverizată a fost suspendată sub agitare în 200 ml cloroform anhidru, 5 ml piridină și 30 ml clorură de tionil. Amestecul s-a refluxat timp de 8 h, apoi s-a răcit la temperatura camerei și s-a filtrat. Solidul depus s-a spălat cu cloroform și s-a uscat, rezultînd 2,4-diamino-6-clorometil-pteridina, care s-a utilizat fără altă purificare în etapa următoare. Compusul prezintă aceleași maxime în spectrul u.v. ca și materia primă. Cromatografierea în aceleași condiții ca și compusul precedent,

dă pentru clorometil-pteridină R_f 0,64.

8. ACIDUL 4-(METILAMINO)-BENZOIC a fost preparat în două variante, și anume:

8.1. Din acid 4-aminobenzoic, formaldehidă, zinc și hidroxid de sodiu, conform literaturii /340/. Randament 40% (p.t. 162°, lit./340/ 158-161°).

8.2. Din anestezină, prin metilare cu dimetil sulfat (DMS). Astfel, un amestec de 540 g carbonat de sodiu, 825 g (5 moli) 4-aminobenzoat de etil (anestezină) și 2500 ml apă a fost încălzit sub agitare la 90-5°. S-au picurat în decurs de 5 min. 480 ml DMS, rezultând un reflux foarte puternic. Se continuă refluxul încă 6 min. și stratul organic, care este imediat separat, este supus hidrolizei.

La o soluție de 400 g hidroxid de sodiu în 10 l apă se adaugă sub agitare stratul organic obținut în faza anterioară. Se încălzește la 95-100° pentru 0,5-1 h. După răcire la temperatura camerei, soluția a fost filtrată, adusă la pH 4,0 cu acid clorhidric concentrat și depozitată pentru 24 h la temperatura camerei. Solidul format a fost filtrat și spălat cu apă.

Intr-o soluție preparată din solidul obținut anterior în 2 l acid clorhidric concentrat și 8 l apă se picură sub agitare, la 0-5° o soluție de nitrit de sodiu 350 g/l (până la culoarea persistentă albastră a hîrtiei iod-amidon) și după agitare încă 0,5 h la rece, acidul 4-(nitrozometilamino)-benzoic rezultat se filtrează și se spală cu acid clorhidric 0,5 N și apă.

Acidul 4-(nitrozometilamino)-benzoic separat se dizolvă într-o soluție de 1400 g hidroxid de sodiu în 5100 ml apă. După încălzire la 90-5° se adaugă 760 g zinc pulbere. Amestecul se menține pentru încă 30 h la 90-5°, apoi se răcește la temperatura camerei și se aduce la pH 8-9 (cu acid clorhidric concentrat). Se filtrează hidroxidul de zinc precipitat și se spală cu apă fierbinte. Filtratele combinate au fost aduse la pH 4,0 (cu acid clorhidric

concentrat) și păstrate peste noapte la temperatura camerei. Solidul depus a fost filtrat și după spălare (cu apă) și uscare, rezultă 400-420 g (cca. 45%) acid 4-(metilamino)-benzoic (p.t. 162°, lit./340/ 158-161°).

9. Sinteza CLOROFORMIATULUI DE BENZIL a fost efectuată după rețetele din literatură /597/. Randament 80% (n_D^{24} 1,5178, lit. /597/ $n_D^{28,5}$ 1,5196; d 1,20, lit. /597/ 1.25).

10. ACIDUL 4-[METIL(BENZILOXICARBONIL)AMINO]-BENZOIC a fost preparat în trei variante:

10.1. La o soluție agitată de 151 g (1 mol) acid 4-(metilamino)-benzoic, 135 g acetat de sodiu anh. și 2250 ml acid acetic (soluție preparată prin încălzire la 60° pentru 1 h, apoi răcită la 40°) se adaugă 190 g (1,1 moli) cloroformiat de benzil. După 40 h la 40°, amestecul de reacție a fost pus în 8-10 l apă, agitat 1-2 h, filtrat și uscat. Purificarea materialului brut a fost efectuată prin: a) dizolvare la cald în acid acetic și precipitare cu apă; b) agitare timp de 16 h cu o soluție de acid clorhidric 0,5 N; c) dizolvare în cloroform, spălarea soluției cu acid clorhidric 0,5 N și apă, uscare și precipitare cu toluen. După purificare se obțin 188 g (65%) acid 4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoic (p.t. 149-50°, lit./456/ 149-151,5°).

10.2. Se prepară 4[(benziloxicarbonil)amino]benzoatul de etil conform procedurii descris mai sus pentru acid 4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoic. Randament 65-70% (p.t. 137°, acidul 4[(benziloxicarbonil)amino]benzoic 217°, lit./598/ 217°).

La 10 g N-(benziloxicarbonil)-anestezină dizolvate în 100 ml tetrahidrofuran (THF) și 10 ml dimetilformamidă (DMF) se adaugă 1,1 g hidruură de sodiu (cu 20% ulei de parafină), se agită 30 min. la temperatura camerei, se adaugă 10 ml iodură de metil și se refluxează 2,5 h (sfârșitul reacției se determină prin cromatografie: Al_2O_3 , eluent: C_6H_6 - THF 10:1, R_f 0,72 - materia primă, 0,83 - produsul). Se pune amestecul în apă, se extrage cu cloroform, se

usucă soluția cloroformică pe sulfat de sodiu și se evaporă la sec, la vid. Rezultă 4-[(benziloxycarbonil)amino]benzoatul de etil sub forma unui ulei care se hidrolizează în mod obișnuit, după dizolvare în metanol, răcire la 0°, cu hidroxid de sodiu 1 N, menținând temperatura sub + 5°. Se obțin astfel 8 g acid 4-[metil(benziloxycarbonil)amino]benzoic (randament 84%)(p.t.148°; lit./456/149-151, 5°).

10.3 Asemănător se metilează 10 g N-(benziloxycarbonil)-anestezină dizolvate în 100 ml eter anhidru și 20 ml DMF, folosind 1,1 g hidrură de sodiu (cu 20% ulei de parafină) și 3,5 ml dimetil sulfat. Rezultatele sînt asemănătoare procedului descris la punctul anterior.

11. Sinteza ESTERILOR ETILICI AI AMINO ACIZILOR (SUB FORMA DE CLORHIDRATI) s-a realizat în două variante, cea de a doua fiind aplicată exclusiv la esterificarea acidului glutamic.

11.1. Procedeu general de esterificare a amino acizilor. În blazul unei coloane de rectificare (Ø 2,5 cm, 20 talere) se introduc 6 moli clorhidrat de amino acid monocarboxilic sau trei moli de clorhidrat de amino acid dicarboxilic, 3300 ml alcool etilic, 800 ml benzen și 20 g acid 4-toluensulfonic. Se încălzește amestecul de reacție la reflux, în capul coloanei separîndu-se două straturi. Stratul apos (inferior) este îndepărtat continuu iar cel organic (superior) este reintrodus în coloană. Sfîrșitul reacției se determină cromatografic (TLC kieselgel, n-butanol-acid acetic-acetat de etil-apă 1:1:1:1). Amestecul de reacție se concentrează apoi în vid, esterul rezultînd ca ulei sau sub formă solidă. Uleiul cristalizează imediat prin triturare cu eter etilic anhidru. S-au preparat astfel esterii etilici (ca clorhidrați) ai următorilor amino acizi: glicină, DL-alanină, sarcosină, β-alanină, acid DL-α-aminobutiric, acid γ-aminobutiric, DL-valină, L-leucină, L-fenilalanină, acid L, D și DL-glutamic și acid DL-aspartic (datele analitice ale acestor esteri sînt cuprinse în Tabelul 6) (în afara acestor compuși s-au sintetizat prin același procedeu și

esterii etilici ai DL-triptofanului, DL-metioninei și DL-izoleucinei). Randamentele sînt reproductibile și sînt cuprinse între 85-90%.

11.2. Esterul glutamic s-a sintetizat de asemenea și prin procedeul descris de Chiles /463/.

12. Procedeu general de preparare a N{4[METIL(BENZILOXICARBONIL)AMINO]BENZOIL}AMINO ACID ETIL ESTERILOR. S-a aplicat, procedeul descris de Fu și colab./456/ la sinteza N{4[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}glutamatului de dietil. Astfel, se prepară clorura de 4-[metil(benziloxocarbonil)amino]benzoil din acidul respectiv (0,1 moli), pentaclorură de fosfor (0,12 moli) și eter etilic anhidru (400 ml), prin agitare la temperatura camerei, timp de 1 h. Se hidrolizează oxiclorigura de fosfor formată din reacție în agitarea într-o pîlnie de separare a soluției eterice cu gheață, se separă stratul organic ce conține clorigura acidă și se adaugă imediat peste un amestec răcit la 0° și agitat energic de 0,125 moli ester etilic al amino acidului (clorhidrat), 66 g bicarbonat de sodiu, 400 ml apă și 400 ml acetat de etil. Reacția continuă 1 h la 0° și 2 h la temperatura camerei, după care stratul organic se separă de cel apos într-o pîlnie de separare și se spală succesiv cu cîte 100 ml apă, acid clorhidric 2 N, apă și se usucă pe sulfat de sodiu. După concentrare la vid și adăugare de eter de petrol, depune (ca ulei sau solid) produsul final. Pentru scopuri analitice se repetă purificarea din acetat de etil-eter de petrol (datele analitice sînt reproduse în Tabelul 2). Randamentele sînt cuprinse între 80-85%. S-au preparat astfel esterii etilici ai N{4[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}glicinei, -DL-alaninei, -sarcosinei, -β-alaninei, -DL-α-aminobutiric, -γ-aminobutiric, -DL-valinei, -L-leucinei, -L-fenilalaninei, -DL-aspartic, -D- și -DL-glutamic.

13. Procedeu general de preparare a N{4[METIL(BENZILOXICARBONIL)AMINO]BENZOIL}AMINO ACIZILOR. Se aplică de asemenea proce-

deul descris de Fu și colab./456/ la sinteza acidului N{4[metil(benziloxycarbonil)amino]benzoil},L-glutamic. Astfel, C,1 moli N{4[metil(benziloxycarbonil)amino]benzoil} amino acid (monocarboxilic) etil ester dizolvați în 110 ml alcool metilic, după răcire la 0° sînt hidrolizați cu 110 ml hidroxid de sodiu 1 N, menținînd temperatura sub + 5°. Reacția continuă 1 h la 0° și este definitivată la temperatura camerei (sfîrșitul acesteia fiind determinat cromatografic: TLC kieselgel, eluent CHCl₃-CH₃OH-CH₃CO₂H 9,5:0,5:0,5). Se diluează apoi cu apă și se separă acidul liber după acidularea soluției cu acid clorhidric 6 N (la pH 2) sub formă solidă sau de ulei care cristalizează uneori după cîteva zile. Purificarea produsului se realizează prin redizolvarea acestuia în acetat de etil, extracție cu soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu și precipitare. În cazul amino acizilor diparboxilici, cantitățile de alcool metilic și hidroxid de sodiu se dublează. Randamentele sînt cuprinse între 85-90%. S-au preparat următorii compuși: N{4[metil(benziloxycarbonil)amino]benzoil}glicina, DL-alanina, sarcosina, β-alanina, DL-α-aminobutiric, γ-aminobutiric, DL-valina, L-leucina, L-fenilalanina, DL-aspartic, D-glutamic și DL-glutamic.

14. Procedeu general de preparare a N{4-(METILAMINO)BENZOIL} AMINO ACIZILOR. S-au aplicat două procedee de îndepărtare a grupei protectoare și anume:

14.1. Prin hidrogenoliză. Se prepară o soluție 10% de N{4-[metil(benziloxycarbonil)amino]benzoil} amino acid în alcool metilic absolut (în cazul β-alaninei, în alcool etilic absolut). Se adaugă 10% catalizator (g/g) (paladiu pe cărbune 5 sau 10%) și se supune hidrogenării catalitice la presiunea atmosferică și temperatura normală. Sfîrșitul reacției, caracterizat prin absența bi-oxidului de carbon, este determinat cu soluție de hidroxid de bariu. Se filtrează catalizatorul și se concentrează la sec, la vid, pe baie de apă. Se separă astfel N{4-(metilamino)benzoil} amino acizii sub forma unor solide albe lamelare. Pe această cale rezul-

tă evident produse care nu mai necesită purificare. Datele analitice ale compuşilor sînt prezentate în Tabelul 5. S-au preparat astfel următorii compuşi: N[4-(metilamino)benzoil-]glicina, DL-alanina, sarcosina, β -alanina, DL- α -aminobutiric, γ -aminobutiric, DL-valina, L-leucina, L-fenilalanina, DL-aspartic, L- , D- şi DL-glutamic.

14.2. Prin bromoliză. Acest procedeu de deprotejare, cu acid bromhidric în acid acetic a fost aplicat de Fu şi colab./456/ în cazul acidului N[4-(metilamino)benzoil]-L-glutamic şi a fost utilizat iniţial şi de noi la sinteza aceluiaşi compus (randament 81%).

15. HIDRAZIDELE UNOR DIPEPTIDE N(BENZILOXICARBONILATE) au fost preparate prin refluxare timp de 1 h a soluţiei alcoolice a esterului respectiv cu exces de hidrat de hidrazină. La răcire depune hidrazida, care se recristalizează din alcool etilic. Datele analitice ale hidrazidelor sintetizate sînt redate în Tabelul 3.

16. Sinteza 2,3-DIBROMPROPIONALDEHIDEI din acroleină şi brom în sulfură de carbon a fost realizată conform procedurii descrise de Fischer şi Tafel /446,447,449/. Randament 85% (p.f. 54-6° /3 mm Hg; lit./450/ 79-80° /14 mm Hg).

17. 1,1,3-TRICLORACETONA a fost preparată prin două metode, ambele descrise în literatură:

17.1. Din acetonă şi clorură de sulfură, cînd rezultă numai 20% 1,1,3-tricloracetona, restul fiind practic 1,1-dicloracetona (p.f. 90° /32 mm Hg; lit./451/ 91-4° /30 mm Hg; n_D^{23} 1,4492 ; lit./451/ 1,4695)

17.2. Prin clorurarea 1,1-dicloracetonei cu clor gazos, conform lit./348/.

18. 2,4-DIAMINO-7-CLOROMETIL-PTERIDINA. O soluţie de 2,1 g (0,01 moli) diclorhidrat de tetraaminopirimidină în 50 ml apă s-a adăugat picurînd, în decurs de 6 h, la temperatura camerei, la o soluţie agitată de 4,8 g (0,03 moli) 1,1,3-tricloracetona şi 8,2 g

acetat de sodiu în 40 ml apă, la pH 6. Se menține pH-ul la 6,0 cu carbonat de sodiu cristalizat, solid. Amestecul de reacție se agită peste noapte la temperatura camerei, se răcește apoi la 0° iar solidul brun se filtrează și se spală cu apă, alcool, alcool-eter, eter. După uscare, rezultă 1,7 g (80%) 2,4-diamino-7-clorometil-pteridină, care este utilizată în continuare fără o altă purificare. Cromatografierea pe hîrtie (Whatman nr.1, ascendent, eluent : n-butanol-etanol-apă 100:35:72) indică prezența unui spot major la R_f 0,57 și a unei impurități minore la R_f 0,49.

19. Sinteza ANALOGILOR DIPEPTIDICI AI METHOTREXATULUI.

19.1. ACIDUL N[4 [METIL(2',4'-DIAMINO-PTERIDINIL-6'-METIL) AMINO]BENZOIL-]-L-GLUTAMIC (Methotrexat, MTX, 6,MAB-L-Glu).

19.1.1. După procedeul lui Seeger și colab. /1/ din clorhidrat (sau sulfat) de tetraaminopirimidină, 2,3-dibrompropionaldehidă și acid N[4-(metilamino)benzoil-]-L-glutamic în mediu apos la pH 3,5-4, dihidroderivatul /format inițial fiind oxidat cu amestec iod-iodură de potasiu. După purificări, rezultă produsul final avînd un conținut de 95% (determinat spectrofotometric), randamentul fiind 2%.

19.1.2. După procedeul lui Berezovskii și colab. /348/, care înlocuiește 2,3-dibrompropionaldehida cu 1,1,3-tricloracetonă. După purificare, rezultă un produs constituit, așa cum am arătat, din amestecul celor doi izomeri: MTX și 7,MAB-L-Glu.

19.1.3. Din 2,4-diamino-6-clorometil-pteridină, printr-un procedeu original, în două variante, și anume:

19.1.3.1. Prin efectuarea reacției la pH 4. Astfel, într-o soluție de 100 g acetat de sodiu în 750 ml apă, adusă la pH 4 (cu acid clorhidric concentrat) și încălzită la 45°, se dizolvă 14 g (0,05 moli) acid N[4-(metilamino)benzoil-]-L-glutamic. La acest amestec se picură în decurs de 2 h o soluție de 10 g 2,4-diamino-6-clorometil-pteridină în 75 ml acid formic 98%, pH-ul fiind menținut la 3,5-4 cu carbonat de sodiu cristalizat, solid.

Reacția durează 40 h la 45°, apoi amestecul a fost răcit la 5° peste noapte. Precipitatul format a fost filtrat, spălat cu apă, alcool, alcool-eter, eter, apoi uscat la vid (P₂O₅) la 60°. După purificările de rigoare, rezultă un produs avînd o puritate de min. 95% (determinat spectrofotometric) cu randament 10-15%.

19.1.3.2. Prin efectuarea reacției la pH 7,5.

Într-o soluție conținînd 11 g (0,0395 moli) acid N[4-(metilamino)benzoil]-L-glutamic în 110 ml apă, adusă la pH 7,5 cu bicarbonat de sodiu solid și încălzită la 45°, se adaugă în mici porțiuni, în decurs de 1-2 h, 9 g 2,4-diamino-6-clorometil-pteridină solidă, foarte fin pulverizată, menținîndu-se pH-ul în permanență la valoarea menționată (cu NaHCO₃ solid). Reacția durează 24 h la 45°. Se filtrează soluția caldă, iar filtratul se aduce la pH 4 cu acid acetic. Se lasă peste noapte la 5°, se filtrează precipitatul, se spală cu apă, acetonă, eter și se usucă. Rezultă astfel 6 g produs cu conținut de cca. 70% (determinat spectrofotometric) în MTX. După purificare rezultă 3,5 g produs final cu un conținut de 97-8%, randamentul fiind astfel de 19%.

19.2. N{4 [METIL(2',4'-DIAMINO-PTERIDINIL-6'-METIL)AMINO] BENZOIL}AMINO ACIZII s-au sintetizat după procedeul 19.1.3.2. din 2,4-diamino-6-clorometil-pteridină și peptidele corespunzătoare. Rezultă astfel următorii compuși: N{4 [metil(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil)amino]benzoil}-glicina (6,MAB-Gly), -DL-alanina (6,MAB-DL-Ala), -sarcosina (6,MAB-Sar), -β-alanina (6,MAB-β-Ala), -DL-α-aminobutiric (6,MAB-DL-Abu), -γ-aminobutiric (6,MAB-γ-Abu), -DL-valina (6,MAB-DL-Val), -L-leucina (6,MAB-L-Leu), -L-fenilalanina (6,MAB-L-Phe), -D-glutamic (6,MAB-D-Glu) și -DL-glutamic (6,MAB-DL-Glu). Datele analitice ale acestor compuși sînt cuprinse în Tabelul 1.

În cazul în care amino acidul terminal era β-alanina sau acidul γ-aminobutiric, datorită solubilității reduse a sărurilor de sodiu ale analogilor dipeptidici finali, precipitatul depus după

filtrarea amestecului de reacție este reextras cu soluție apoasă alcalină (NH_3), încălzită la $60-70^\circ$. După acidulare și filtrare, solidul separat este unificat cu cel rezultat din precipitarea soluției mume (a amestecului de reacție) în vederea purificărilor ulterioare. Randamentele în cazul acestor compuși nu depășesc însă 5-10%.

19.3. $\text{N}\{4[\text{METIL}(2',4'\text{-DIAMINO-PTERIDINIL-7'-METIL)AMINO}]\text{BENZOIL}\}$ AMINO ACIZII. S-au sintetizat după procedeul 19.1.3.1. acizii $\text{N}\{4[\text{metil}(2',4'\text{-diamino-pteridinil-7'-metil)amino}]\text{benzoil-}\}$ -DL-aspartic (7,MAB-DL-Asp), -L-glutamic (7,MAB-L-Glu), -D-glutamic (7,MAB-D-Glu) și -DL-glutamic (7,MAB-DL-Glu) iar după procedeul 19.1.3.2. $\text{N}\{4[\text{metil}(2',4'\text{-diamino-pteridinil-7'-metil)amino}]\text{benzoil-}\}$ -glicina (7,MAB-Gly), din 2,4-diamino-7-clorometil-pteridină și peptidele respective. Randamentele au fost cuprinse între 5-12%. Datele analitice ale compușilor sintetizați sînt cuprinse în Tabelul 7.

20. ACIDUL 4-[(BENZILOXICARBONIL)AMINO]HIPPURIC s-a preparat după procedeul 10.1., din acid 4-aminohippuric și cloroformiat de benzil în mediu de acid acetic-acetat de sodiu. Randament 70% (p.t. 211° , lit./599/).

21. Procedeu general de preparare a ESTERILOR ETILICI AI TRIPEPTIDEI N-BENZILOXICARBONILATE. Se prepară ester glutamic (DL-aspartic) (bază liberă) din 36 g (0,15 moli) ester glutamic clorhidrat, respectiv 33,6 g (0,15 moli) ester DL-aspartic clorhidrat, prin tratarea suspensiei în acetat de etil (360 ml) cu trietilamină (37 ml). Se agită peste noapte la temperatura camerei, se filtrează clorhidratul de trietilamină, se spală precipitatul cu acetat de etil și se evaporă solventul și excesul de trietilamină pe baie de apă, la vid. Se dizolvă 0,1 moli $\text{N}\{4[\text{metil}(\text{benziloxycarbonil)amino}]\text{benzoil}\}$ amino acid, respectiv acid 4-[(benziloxycarbonil)amino]hippuric într-un solvent organic potrivit (vezi

partic. După dizolvarea acestuia din urmă, se răcește soluția la 0° și se adaugă 22,7 g (0,11 moli) dicitclohexilcarbodiimidă (DCC). Reacția durează 1 h la 0° și 96 h la temperatura camerei. Se filtrează dicitclohexilureea formată (DCU) și se spală precipitatul cu solventul utilizat în reacție. Soluția de ester de tripeptidă N-benziloxicarbonilată în acetat de etil (în cazul utilizării unui solvent solubil în apă, se concentrează la sec, la vid, pe baie de apă, apoi peptida se redizolvă în acetat de etil) se spală cu acid clorhidric 2N, (lăsând 1-2 h pentru a hidroliza DCC eventual nereacționată), apă, soluție apoasă, saturată, de bicarbonat de sodiu, apă, se separă stratul organic, care apoi se usucă (Na₂SO₄). Se concentrează apoi la sec, la vid, pe baie de apă, peptida depunând ca ulei sau solid după adăugare de eter de petrol. Purificarea în continuare se face fie prin redizolvare în acetat de etil și repetarea spălărilor cu apă, acid clorhidric 2N, apă, soluție apoasă, saturată de bicarbonat de sodiu, apă, fie din acetat de etil- eter de petrol, fie prin trecere pe o coloană cromatografică de oxid de aluminiu bazic, eluind cu alcool metilic absolut. S-au sintetizat următorii esteri: N,N{{4-[(benziloxicarbonil)amino]benzoil}glicil} DL-aspartic și L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil} DL-aspartic și L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}DL-alanil}L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}sarcosil}L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}L-leucil}L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}L-fenilalanil}DL-aspartic și L-glutamic. Datele analitice ale acestor compuși sînt prezentate în tabelul 9.

Nota 1.

Compusul	Solventul(ml)
N{{4-[(benziloxicarbonil)amino]benzoil}glicina	AcOEt
N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}-glicina	AcOEt(250)+DMF(140)

-DL-alanina	.THF(160)+DMF(20)
-sarcosina	THF(175)+DMF(65)
-L-leucina	AcOEt(700)
-L-fenilalanina	AcOEt(700)

22. Procedeu general de preparare a TRIPEPTIDELOR N-BENZILOXICARBONILATE. Se hidrolizează o soluție de 0,1 moli ester de tripeptidă N-benziloxicarbonilată în 450 ml alcool metilic, după răcire la 0°, cu 225 ml hidroxid de sodiu 1 N, menținând temperatura sub 5°. Reacția continuă 1 h la 0° și apoi se definitivează la temperatura camerei (sfârșitul reacției se stabilește cromatografic, TIC Kieselgel, eluent: cloroform-metanol-acid acetic 9,5:0,5:0,5). După terminarea reacției se adaugă 2 l apă la soluție și se aduce pH-ul acesteia la 2 cu acid clorhidric 6 N. Produsul se separă fie ca solid, fie ca ulei ce cristalizează în timp. Purificarea acestuia se realizează prin dizolvare în apă la pH 7, tratare cu cărbune (timp de câteva ore), filtrare, acidulăre la pH 2. De asemenea este utilă și extracția peptidei din soluția de acetat de etil cu soluție apoasă, saturată, de bicarbonat de sodiu. Final se mai recomandă, dacă este cazul, o recristalizare din acetat de etil-eter de petrol. Datele analitice sînt prezentate în Tabelul 10. Au fost preparați următorii acizi: N,N{{4-[(benziloxicarbonil)amino]benzoil}glicil}DL-aspartic și L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}glicil}DL-aspartic și L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}DL-alanil}L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}sarcosil}L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}L-leucil}L-glutamic, N,N{{4-[metil(benziloxicarbonil)amino]benzoil}L-fenilalanil}DL-aspartic și L-glutamic.

23. Procedeu general de preparare a TRIPEPTIDELOR. Acești compuși au fost sintetizați prin hidrogenoliză N-benziloxicarbonil derivațiilor corespunzători, conform procedului 14.1., utilizat în cazul dipeptidelor. Datele analitice ale acestora sînt reproduse

în Tabelul 11. S-au preparat următoarele substanțe: acid N,N 4-aminobenzoil glicil DL-aspartic și L-glutamic, N,N[[4-(metilazino)benzoil]glicil]DL-aspartic și L-glutamic, N,N[[4-metilemino)benzoil) DL-alanil]L-glutamic, N,N[[4-(metilamino)benzoil] sarcosil]L-glutamic, N,N[[4-(metilamino)benzoil]L-leucil]L-glutamic, N,N[[4-(metilamino)benzoil]L-fenilalanil]DL-aspartic și L-glutamic.

24. Sinteza ANALOGILOR TRIPEPTIDICI AI METHOTREXATULUI.

Compușii au fost sintetizați prin procedeul descris la punctul 19.1.3.2., prin reacția dintre 2,4-diamino-6-clorometil-pteridină și tripeptidele respective, în mediu apos, la pH 7,5. Randamentele sînt cuprinse între 8-12% (după purificarea corespunzătoare a compușilor). S-au sintetizat astfel următorii analogi:

acidul N{4 [(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil)amino]benzoil}glicil DL-aspartic (6,AB-Gly-DL-Asp) și L-glutamic (6,AB-Gly-L-Glu), N{4 [metil(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil)amino]benzoil}glicil DL-aspartic (6,MAB-Gly-DL-Asp) și L-glutamic (6,MAB-Gly-L-Glu), N{4 [metil(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil)amino]benzoil}DL-alanil L-glutamic (6,MAB-DL-Ala-L-Glu), N{4 [metil(2',4'-diamino-pteridinil)sarcosil L-glutamic (6,MAB-Sar-L-Glu), N{4 [metil(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil)arino]benzoil}L-leucil-L-glutamic (6,MAB-L-Leu-L-Glu), N{4 [metil(2',4'-diamino-pteridinil-6'-metil)arino]benzoil}L-fenilalanil DL-aspartic (6,MAB-L-Phe-DL-Asp) și L-glutamic (6,MAB-L-Phe-L-Glu). Datele analitice ale noilor compuși sînt prezentate în Tabelul 8.

25. Purificarea analogilor di- și tripeptidici ai acidului folic.

Așa cum am arătat anterior, puritatea produsului brut rezultat din reacția de condensare depinde de calea de sinteză folosită în primul rînd, dar evident nu este de neglijat nici calitatea materiilor prime utilizate.

Alegerea modului concret de purificare a analogilor di- și tripeptidici depinde astfel de mai mulți factori, cei mai impor-

tanți fiind natura compusului, puritatea sa inițială (din amestecul de reacție), solubilitatea, etc.

Pentru purificarea acestor compuși s-au aplicat următoarele metode:

a) purificare "chimică":

- prin schimbări succesive de pH;
- prin transformarea, atunci când solubilitatea produsului permite, în sare de magneziu și recristalizarea ei din apă.

Purificarea prin schimbări de pH se realizează prin dizolvarea (parțială) a compusului brut la pH 11-12 (Na_2CO_3 sau NaOH) la 50-60°, filtrare, coborîrea pH-ului soluției la 7,0 (HCl 2 N), menținerea peste noapte la 5°, tratare cu cărbune și filtrare. Se aduce apoi soluția la pH 4 (HCl 2 N sau acid acetic), se lasă peste ^{noapte} la 5°, se filtrează precipitatul depus și se spală cu apă, alcool, alcool-eter, eter. Obişnuit, o asemenea purificare ridică conținutul la cca. 65% de la 45% (determinat spectrofotometric).

Purificarea ca sare de magneziu, aplicată numai pentru doi compuși, 6,MAB- β -Ala și 6,MAB- γ -Abu, se realizează prin dizolvarea produsului în cantitatea minimă de apă cu soluție de amoniac (pH 11-12), încălzire la 70-50°, adăugare de oxid de magneziu, filtrare, depunerea sării de magneziu prin menținerea soluției la 5°, filtrarea ei, spălare cu acetonă, Se recristalizează apoi sarea de magneziu din apă și se retransformă prin acidulare (pH 4) în produsul final de puritate ridicată.

b) purificarea prin treceri pe coloane cromatografice, datele caracteristice fiind reproduse în Tabelul 45:

Coloanele sînt pregătite în mod obişnuit: după spălare perfectă (detergent, apă, alcool, apă, soluție de eluare), în coloană este introdusă suspensia umpluturii în eluent. Se lasă să se scurgă soluția, controlînd ca în umplutură să nu existe aer sau să se formeze canale. Se introduce apoi produsul, dizolvat în cantitatea minimă de eluent, prin adăugare de NaOH 1 N pînă la

ă dizolvare și astfel încît pH-ul să nu depășească 7,5. După ce soluția este absorbită în coloană, se lasă cîteva ore, apoi se începe eluarea cu solvenții menționați, culegînd fracțiuni. Alegerea fracțiunilor ce conțin produsul se face fie spectrofotometric (în ca-

Tabelul 45

Felul umpluturii	Firma producătoare	Raport (g/g) substanță/umplutură	Eluent
Celuloză	Merck	1:30...1:75	Tampon fosfat disodic 0,1 M pH 7
DEAE-celuloză	Merck	1:30	Tampon fosfat disodic 0,05M pH 8
Celuloză-cărbune	Schuchardt	a)	Apă
Celită 535	Serva	1:75	Str.org. BuOH- MeCH-(NH ₄) ₂ CO ₃ 0,5% 6:1:4:1:1
Sephadox G-10	Upsala	1:50	Apă
Dowex 1X8	Schuchardt	1:100	Spl. tampon acetat 1 M pH 6, eluare acid acetic 1 M

a) Colcana este formată din trei straturi: inferior- celuloză (1:2), mediu- celuloză și cărbune (celuloză 1:20, cărbune 1:2) și superior- celuloză (1:20).

zul MTX), fie cromatografic (pentru ceilalți compuși). Unificarea fracțiilor ce conțin compusul avînd aceeași puritate, urmată de precipitarea cu acid acetic (pH 4), menținerea la 5° peste noapte și filtrare, spălare, uscare, duce la separarea produșilor parțial sau complet purificați.

Calea de purificare pentru fiecare analog di- sau tripeptidic al Methotrexatului este prezentată în Tabelul 46.

26. OXIDAREA ȘI HIDRCLIZA diverșilor analogi pteridinici (6, MAB-I-Glu, 7, MAB-L-Glu) sau pteridine simple (2,4-diamino-6-hidroxi (și clor)retil-pteridina) s-a efectuat prin procedeul din literatură /340,493/ cu permanganat de potasiu în mediu al-

Tabelul 46

Compusul	Procedeul de sinteză	Modul de purificare
6, MAB-L-Glu	19.1.1, 19.1.3.1.	19.1.2 Schimbare pH, coloană celuloză (sau celită, DEAE-celuloză, Dowex), celuloză-cărbune.
	19.1.3.2.	Coloană celuloză
6, MAB-D-Glu; 6, MAB-DL-Glu; 7, MAB-L-Glu; 7, MAB-DL-Glu; 7, MAB-D-Glu; 7, MAB-DL-Asp; 6, MAB-Gly-L-Glu; 6, MAB-Gly-DL-Asp.	19.1.3.1.	Schimbare pH; coloană celuloză, apoi celuloză și cărbune
6, AB-Gly-L-Glu; 6, AB-Gly-DL-Asp.	19.1.3.1.	Schimbare pH; coloană celuloză, Sephadex G-10 și celuloză și cărbune.
6, MAB-Gly; 7, MAB-Gly; 6, MAB-Sar 6, MAB-DL-Ala; 6, MAB- β -Ala; 6, MAB-DL-Val; 6, MAB-DL-Abu; 6, MAB- γ -Abu; 6, MAB-L-Leu; 6, MAB-L-Phe; 6, MAB-DL-Ala-L-Glu; 6, MAB-L-Leu-L-Glu; 6, MAB-L-Phe-DL-Asp; 6, MAB-L-Phe-L-Glu.	19.1.3.2.	Coloană celuloză.

calin. Datele analitice ale acizilor 2-amino-4-hidroxi-pteridinil-6-(sau 7)-carboxilici sînt redată în Tabelul 12.

27. Prepararea catalizatorilor negru de paladiu și paladiu pe cărbune 5% și 10%.

27.1. Negrul de paladiu s-a preparat după Delgov/600/ din clorură de paladiu, formaldehidă și hidroxid de potasiu.

27.2. Paladiu pe cărbune 5% s-a preparat prin dizolvarea la cald a 4 g clorură de paladiu în 20 ml acid clorhidric concentrat și 200 ml apă distilată, agitarea soluției cu 50 g cărbune (pînă la decolorarea acesteia), neutralizare cu o soluție saturată apoasă de bicarbonat de potasiu, filtrarea catalizatorului și

spălare cu apă distilată pînă la dispariția ionilor de clor.

Paladiu pe cărbune 10% se prepară în același mod, utilizînd însă de această dată o cantitate dublă (8 g) de clorură de paladiu.

BIBLIOGRAFIE

1. D.R.Seeger, D.B.Cosulich, J.M.Smith, M.E.Hultquist-
J.Amer.Chem.Soc. 71,1753(1949).
2. S.Farber- Blood 4,160(1949).
3. M.C.Li, R.Hertz, D.B.Spencer- Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 93,361(1956)
4. R.Hertz, D.M.Bergental, M.B.Lipsett, E.B.Price, T.F.Hilbish-
Ann.Acad.N.Y.Sci. 80,1262(1959).
5. M.C.Li, R.Hertz, D.M.Bergental- New Engl.J.Med. 66,259(1968).
6. R.Hertz, D.M.Bergental, M.B.Lipsett, E.B.Price, T.F.Hilbish-
J.Amer.Med.Assoc. 168,845(1958).
7. F.B.Schoenbach, I.Colsky, E.M.Greenspan- Cancer 5,1201(1952).
8. E.A.Huesoby, V.Downing- Cancer Chemother.Rep. 16,511(1962).
9. T.H.Jukes, H.P.Broquist- in "Metabolic Inhibitors"- editori
R.M.Hochster, J.H.Quastel, Academic Press, New York, 1963, p.481.
10. B.R.Baker- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,214(1971)
11. B.R.Baker- "Design of Active Site Directed Irreversible Inhi-
bitors", editor John Wiley, New York City, 1967.
12. B.R.Baker, W.Rzeszotarski- J.Med.Chem. 11,639(1968)..
13. J.Zittoun, R.Zittoun- Rev.Eur.Etud.Clin.Biol. 17,139(1972).
14. V.Nerbert- "The Pharmacological Basis of Therapeutics", editor
Mc.Millan Co., New York, 1957.
15. E.L.R.Stokstad- J.Biol.Chem. 149,573(1949)..
16. S.F.Zakrzewski, C.A.Nichol- J.Biol.Chem. 235,2984(1960)..
17. R.L.Blakley, B.M.Mc Dougall- J.Biol.Chem. 236,1163(1961).

18. S.F.Zakrzewski- J.Biol.Chem. 235,1776(1960).
19. A.Gajdos- Presse Med. 79,2181(1971).
20. S.C.Hartman, J.M.Buchanan- Ann.Rev.Biochem. 28,3065(1959).
21. J.M.Gleisner, R.L.Blakley- Eur.J.Biochem. 52,141(1975).
22. J.M.Gleisner, D.L.Peterson, R.L.Blakley- J.Biol.Chem.250,4937
(1975).
23. H.R.Morris, K.E.Batley, N.G.L.Harding, R.A.Bjur, J.G.Dann,
R.W.King- Biochem.J. 137,409(1974).
24. C.Nicolau, Z.Simon-."Biofizica Moleculară"- Editura Stiințifică,
București, 1968.
25. P.B.Rowe, G.P.Lewis- Biochemistry 12,1962(1973).
26. R.B.Dunlap, N.G.L.Harding, F.M.Huennekens- Ann.N.Y.Acad.Sci.
186,153(1971).
27. I.Kalman- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,166(1971)).
28. E.J.Pastore, M.Friedkin- J.Biol.Chem. 237,3802(1962).
29. K.C.Donaldson, J.C.Keresztesy- J.Biol.Chem. 237,3815(1962).
30. J.R.Guest, D.D.Woods- Biochem.J. 82,26(1962).
31. A.R.Larrabee, J.M.Buchanan- Fed.Proc. 20,9(1961).
32. A.R.Larrabee, S.Rosenthal, R.E.Cathou, J.M.Buchanan- J.Amer.
Chem.Soc. 83,4094(1961):
33. P.Rahrbourgh- Fed.Proc. 21,4(1962).
34. W.Sakami, I.Ukstins- J.Biol.Chem. 236,PC 50(1961).
35. W.Wilmanns, B.Rucker, L.Jaenicke- Z.physiol.Chem. 322,283(1960).
36. J.R.Guest, S.Friedman, M.A.Foster, G.Tejerina, D.D.Woods-
Biochem.J. 92,497(1964).
37. V.Nerbert, R.Zalusky- J.Clin.Invest. 41, 1236(1962).
38. H.W.Dickerman- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,70(1971).
39. J.M.Adams, F.R.Capecci- Proc.Nat.Acad.Sci. 55,147(1966)...
40. B.F.C.Clark, H.A.Marker- J.Molec.Biol. 17,394(1966).
41. R.E.Webster, D.L.Englehardt, N.D.Zinder- Proc.Nat.Acad.Sci.
55,155(1966).

42. L.H. Bernstein, S. Gutstein, S. Weines, G. Efron- Amer. J. Med. 48, 570 (1970).
43. O.D. Bird, S.B. Binkley, A.S. Bloom, J.J. Pfiffner- J. Biol. Chem. 157, 413 (1945).
44. C.M. Baugh, C.L. Krumdieck- Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 7 (1971).
45. J.R. Fountain, G.B. Waring, D.J. Hutchison, J.H. Buchenal- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 369 (1953).
46. L.L. Anderson, G.J. Collins, Y. Ojima, R.D. Sullivan- Cancer Res. 30, 1344 (1970).
47. J.R. Bertino, B. Simmons, D. Donohue- Fed. Proc. 21, 476 (1962).
48. D.S. Zaharko, K.B. Bischoff, J.E. Longstreth, V.T. Oliverio- J. Nat. Cancer Inst. 46, 775 (1971).
49. J.R. Bertino- Cancer Res. 23, 1286 (1963).
50. J.R. Fountain, D.J. Hutchison, G.B. Waring, J.H. Buchenal- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 369 (1953).
51. W.C. Werkheiser- J. Biol. Chem. 236, 888 (1961).
52. P.T. Condit- Cancer 13, 229 (1960).
53. W.C. Werkheiser- J. Pharm. Exp. Ther. 137, 167 (1962).
54. V.T. Cliverio, D.S. Zaharko- Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 387 (1971).
55. W.C. Werkheiser- Cancer Res. 23, 1277 (1963).
56. F.M. Sirotnak, R.C. Donsbach- Cancer Res. 35, 1737 (1975).
57. D.A. Kessel, T.C. Hall, D.W. Roberts- Cancer Res. 28, 564 (1968).
58. F. Mandelbaum-Shavit, N. Grossowicz- J. Bacteriol. 114, 485 (1973).
59. R.C. Wood, R. Ferone, G.H. Hitchings- Biochem. Pharmacol. 6, 113 (1961).
60. A.Y. Divekar, N.R. Vaidya, B.M. Braganca- Biochem. Biophys. Res. Comm. 135, 927 (1963).
61. G.A. Fischer- Biochem. Pharmacol. 11, 1233 (1960).
62. D.A. Kessel, T.C. Hall- Cancer Res. 27, 1539 (1967).
63. J.A. Straw, M.M. Hart, P. Klubes, D.S. Zaharko, R.L. Dedrik- J. Nat. Cancer Inst. 52, 1327 (1974).
64. I.D. Goldman- Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 400 (1971).

65. I.D.Goldman- Biochem.Biophys.Acta 233,624(1971).
66. I.D.Goldman- J.Biol.Chem. 244,3779(1969).
67. I.D.Goldman, N.S.Lichtenstein, V.T.Oliverio- J.Biol.Chem..
243,5004(1968).
68. M.T.Hakala- Biochem.Biophys.Acta 102,198(1965)..
69. D.A.Kessel- Mol.Pharmacol. 5,21(1969).
70. N.S.Lichtenstein, V.T.Oliverio, I.D.Goldman- Biochem.Biophys.
Acta 193, 456(1969)..
71. A.Nahas, P.F.Nixon, J.R.Bertino- Cancer Res. 32,1416(1972).
72. F.M.Sirotnak, R.S.Donsbach- Cancer Res. 32,2120(1972)..
73. F.M.Sirotnak, R.S.Donsbach- Cancer Res. 33,1290(1973)..
74. F.M.Sirotnak, S.Kurita, D.J.Hutchison- Cancer Res.28,75(1968).
75. F.M.Sirotnak, S.Kurita, M.G.Sargent, D.L.Robinson, D.J.Hutchi-
son- Nature 216,1236(1967)..
76. R.A.Bender- Cancer Chemother.Rep. 6 (part.3)73(1975)..
77. D.G.Johns, S.Sperti, A.S.Burgen- J.Clin.Invest.40,1684(1961).
78. W.Chaykowsky, A.Rosowsky, N.Papathanasopoulos, K.K.K.Chen,
E.J.Modest, R.L.Kisliuk, Y.Gaumont- J.Med.Chem. 17,1212(1974).
79. W.C.Werkheiser- Cancer Res.. 25,1608(1965)..
80. M.T.Hakala- Biochem.Biophys.Acta 102,210(1965).
81. J.A.Jacquez- Cancer. Res. 26,1616(1966).
82. T.C.Hall, D.Roberts, D.H.Kessel- Eur.J.Cancer 2,135(1966).
83. L.E.Rosenberg, S.Downing- J.Clin.Investig. 44,1382(1965).
84. F.M.Sirotnak, R.S.Donsbach- Cancer. Res. 33,73(1973).
85. C.A.Nichol- Cancer Res. 23,1357(1963).
86. L.E.Rosenberg, S.Downing, S.Segal- J.Biol.Chem.237,2265(1962).
87. R.C.Rubin, R.S.Henderson, E.S.Owens, D.P.Rall- Cancer Res.
27,553(1967).
88. R.C.Rubin, E.S.Owens, D.P.Rall- Cancer Res. 28,689(1968).
89. M.T.Hakala- F.E.B.S.Symp.16,31(1969).
90. N.S.Lichtenstein, I.D.Goldman,- Biochem.Pharmacol.19,1229(1970)

91. S.P.Rothenberg- J.Lab.Clin.Med.. 66,294(1965)..
92. E.S.Henderson, R.H.Adamson, C.Denham, V.T.Oliverio- Cancer Res. 25,1008(1965).
93. D.G.Johns, A.T.Jannotti, A.C.Sartorelli- Biochem.Pharmacol. 15,555(1966).
94. H.M.Redetzki- Biochem.Pharmacol. 15,425(1966).
95. E.S.Henderson- Cancer Res. 25,1018(1965);
96. D.G.Johns, A.T.Jannotti, A.C.Sartorelli, B.A.Booth, J.R.Bertino Biochem.Biophys.Acta 105380(1965).
97. D.G.Johns, T.L.Loo- J.Pharm.Sci. 56,356(1967).
98. D.G.Johns, D.M.Valerino- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,378(1971).
99. T.L.Loo, R.H.Adamson- Biochem.Pharmacol. 11,170(1962),
100. V.T.Oliverio, J.D.Davidson- J.Pharmacol.Exp.Ther.137,76(1963).
101. J.R.Bertino, P.O'Brien, J.L.Mc Cullough- Science 172,161(1971).
102. C.C.Levy; A.Goldschütz- Naturwissenschaften 34,345(1947).
103. C.M.Baugh, C.L.Krumdieck, M.G.Nair- Biochem.Biophys.Res.Comm. 52,27(1973).
104. Y.S.Shin, K.U.Buehring, E.L.R.Stokstad- J.Biol.Chem.249,5772 (1974).
105. V.Krishnamurty, B.M.Braganca- Biochem.Biophys.Acta 74,456(1963)
106. V.Krishnamurty, B.M.Braganca- Nature 192,68(1961).
107. K.Slavik- Ernährungsforschung 3,475(1958); C.A.53,22150.
108. W.Jacobson- Path.et Biol. 2,481(1961).
109. W.Jacobson, I.A.B.Cathie- Biochem.Pharmacol.5,143(1960),
110. P.T.Condit- Cancer Chemother., Proc.Takeda Int.Conf.Csaka 1966 (Pub.1967),35 ; C.A.70,46135.
111. M.Friedkin, L.T.Plante, E.J.Crawford, M.Crumm- J.Biol.Chem. 250,5614(1975).
112. S.Futterman- J.Biol.Chem. 228,1031(1957).
113. D.K.Misra, S.P.Humphrey, M.Friedkin, A.Goldin, E.J.Crawford- Nature 189,39(1961).

114. M.J.Csborn, M.Freeman, F.M.Hueneckens- Proc.Soc.Exp.Biol.Med.
97,429(1958).
115. M.J.Csborn, F.M.Hueneckens- J.Biol.Chem.233,969(1958).
116. J.M.Peters, D.M.Greenberg- Biochem.Biophys.Acta 32,273(1959).
117. J.M.Peters, D.M.Greenberg- J.Amer.Chem.Soc. 80,6679(1958).
118. L.E.Rogers- Biochem.Pharmacol. 20,492(1971).
119. T.C.Werkheiser, S.F.Zakrzewski, C.A.Nichol- J.Pharm.Exp.Ther.
137,161(1962).
120. W.Wilmanns- Vitamins, Klin.Physiol.Chem.Probl., Symp.Berlin
1965 (Publ.1966),97 ; C.A.68,11631..
121. W.Wilmanns, H.Martin- Klin.Wschr. 46,291(1968).
122. S.F.Zakrzewski, C.A.Nichol- Biochem.Biophys.Acta 27,425(1958)
123. S.F.Zakrzewski- J.Biol.Chem. 238,4002(1963).
124. J.R.Bertino, B.A.Booth, A.Cashmore, A.L.Bieber, A.C.Sartorelli
Fed.Proc. 22,183(1963).
125. J.R.Bertino, B.A.Booth, A.Cashmore, A.L.Bieber, A.C.Sartorelli
J.Biol.Chem.239,497(1964).
126. A.W.Schrecker, F.M.Hueneckens- Biochem.Pharmacol.13,731(1964)
127. P.T.Condit- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,363(1971).
128. F.M.Hueneckens, R.B.Dunlap, J.H.Freisheim, L.E.Henderson,
N.G.L.Harding, S.A.Levison, G.P.Mell- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,
85(1971).
129. B.L.Hillcut, J.P.Perkins, J.R.Bertino- J.Biol.Chem. 242,4777
(1967).
130. R.C.Hussa, R.A.Pattillo- Eur.J.Cancer 8,523(1972).
131. D.J.Hutchison- Cancer Chemother.Rep. 52,697(1968).
132. D.A.Karnofsky, B.D.Clarkson- Ann.Rev.Pharmacol. 3,357(1963).
133. S.Margolis, F.S.Philips, S.S.Sternberg- Cancer Res.31,2037
(1971).
134. J.I.Mc Cullough, J.R.Bertino- Biochem.Pharmacol.20,561(1971).
135. D.Roberts, I.Wodinsky, T.C.Hall- Cancer Res.25,1899(1965).

136. J.Soucek, M.Kuhar, E.Slavikova, E.Katynkova- *Biochem.Pharmacol.* 21,1907(1972).
137. E.M.Greenspan, A.Goldin, E.B.Schoenbach- *Cancer* 3,856(1950).
138. E.M.Greenspan, A.Goldin, E.B.Schoenbach- *Cancer* 4,619(1951).
139. H.Nakamura, J.W.Littlefield- *J.Biol.Chem.* 247,179(1972).
140. D.Roberts, E.V.Loehr- *Cancer Res.* 31,457(1971).
141. E.Slavik, V.Slavikova, K.Pristoupilova, J.Soucek- *Acta Unio Int. Cancer* 20,1006(1964).
142. J.Soucek, K.Motycka, K.Slavik, J.Sochman- *Coll.Czech.Chem.Comm.* 28,2222(1963).
143. K.Pristoupilova, E.Hermanova, K.Slavik- *Biochem.Pharmacol.* 22,1937(1973).
144. H.R.Harrap, B.T.Hill, M.E.Furness, L.I.Hart- *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 186,312(1971).
145. D.Roberts, I.Wodinsky- *Cancer Res.* 28,1955(1968).
146. J.Borsa, G.F.Whitmore- *Mol.Pharmacol.* 5,303(1969).
147. F.M.Sirotnak, R.S.Donsbach- *Cancer Res.* 34,3332(1974).
148. N.G.L.Harding, M.F.Martelli, F.M.Huennekens- *Arch.Biochim. Biophys.* 295,137(1970).
149. R.J.Bonney, F.Malley- *Cancer Res.* 35,1950(1975).
150. D.Roberts- *Cancer Res.* 31,1181(1971).
151. R.B.Dunlap, N.G.L.Harding, F.M.Huennekens- *Biochemistry* 10,88(1971).
152. D.Roberts, E.V.Loehr- *Cancer Res.* 31,1181(1971).
153. W.Wilmanns- *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 186,365(1971).
154. P.A.Morse, A.V.Potter- *Cancer Res.* 25,499(1965).
155. J.R.Rubini- *J.Lab.Clin.Med.* 68,566(1966).
156. R.Labow, G.F.Malley, F.Malley- *Cancer Res.* 29,366(1969).
157. P.Eker- *J.Biol.Chem.* 241,659(1966).
158. R.Pegoraro, G.Bonzio- *Experientia* 27,33(1971).
159. D.H.Russell- *Cancer Res.* 32,2459(1972).

160. W.H.Vogel, M.P.Schulman- Fed.Proc. 21,173(1962).
161. W.H.Vogel, R.Snyder- Biochem.Biophys.Res.Comm.10,97(1963).
162. W.H.Vogel, R.Snyder, M.P.Schulman- J.Pharmacol.Exp.Ther.
146,66(1964).
163. J.P.Purchall, B.M.Mc Dougall- J.Biol.Chem. 236,1163(1961).
164. P.G.Reizenstein- Acta Haematol. 23,85(1960).
165. S.S.Cohen- J.Bacteriol. 71,588(1956).
166. S.S.Cohen, H.D.Barner- Proc.Nat.Acad.Sci.40,885(1954).
167. A.Friedland, T.P.Brent- Eur.J.Biochem. 57,379(1975).
168. M.E.Dalis, J.Dancis- Cancer Res. 15,603(1955).
169. D.A.Coldwait, A.Bendich- J.Biol.Chem. 196,841(1952).
170. H.Skipper, J.H.Mitchell, L.L.Bennett- Cancer Res.10,510(1950).
171. J.S.C'Brien- Cancer Res. 22,267(1962).
172. A.C.Sartorelli, B.A.Booth- Cancer Res. 22,94(1962).
173. S.Lochara-Vimokhsant, H.S.Winchell, M.B.Fish, M.Pollycove-
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 126,621(1967).
174. L.C.Misra, J.A.R.Mead- Biochem.Pharmacol. 21,579(1972).
175. D.Roberts, T.C.Hall- Cancer 20,905(1967).
176. D.Roberts, I.Wodinsky- Cancer Res.28,1955(1968).
177. B.M.Mc Dougall, R.L.Blakley- J.Biol.Chem. 236,832(1961).
178. J.R.Bertino- Arthr.Reum. 16,79(1973).
179. A.Linder, D.Corey, B.Corey, A.T.Kutkam- Acta Cytol. 10,99
(1966).
180. M.C.Straus, N.Mantel, A.Goldin- Cancer Res. 31,813(1971).
181. L.J.Willkoff, W.S.Wilcox, J.A.Burdeshaw, G.J.Dixon, E.A.Dul-
mage- J.Nat.Cancer Inst. 39,965(1967).
182. H.Skipper- Cancer Res. 25,1544(1965).
183. H.Skipper, F.M.Schabel, W.S.Wilcox- Cancer Chemother.Rep.,
35,1,(1964).
184. H.Skipper, F.M.Schabel, W.S.Wilcox- Cancer Chemother.Rep.,
36,1(1965).

185. H.Lin, W.R.Bruce- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,325(1971).
186. R.L.P.Adamson- Exp.Cell.Res. 56,55(1969); C.A.71,56600.
187. P.Ernst, S.A.Killmann- Blood 38,689(1971).
188. G.D.Weinstein, J.Velasco- J.Invest.Derm.59,121(1972).
189. R.R.Rueckert, G.C.Mueller- Cancer Res. 20,1584(1965).
190. R.Schindler, N.Odartchenko, L.Ramsier, A.Griedler- Eur.J. Cancer 3,349(1967).
191. J.Borsa, G.F.Whitmore- Cancer Res. 29,737(1969).
192. J.J.Biesele- Ann.N.Y.Acad.Sci. 58,1129(1953).
193. J.Kieler, E.Kieler- Cancer Res. 14,428(1954).
194. L.A.Rogenszajn, J.Radnay- Blood.53,399(1974).
195. H.Dalen, R.Oftebro, A.Engeset- Cancer 18,41(1965).
196. H.Lettré, G.Landschütz- Naturwissenschaften 34345(1947).
197. W.Jacobson- J.Physiol. 123,618(1954).
198. C.Bisantis, G.Romeo, F.Vaccaro- Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 50,645(1974).
199. B.Chlopkiewicz, J.Koziorowska- Cancer Res. 35,1524(1975).
200. H.G.Petering- Physiol.Rev. 32,197(1952).
201. I.C.D.Douglas, L.A.Price- Brit.J.Haematol.24,625(1973).
202. F.S.Phylips, J.B.Thiersch, F.C.Ferguson- Ann.N.Y.Acad.Sci. 52,1349(1950).
203. H.Skipper, L.L.Bennett, L.W.Law- Cancer Res.12,677(1952).
204. H.Skipper, J.A.Burchenal- Cancer Res. 11,229(1951).
205. J.W.L.Robinson, J.A.Antonishi, A.Vannotti- Biochem.Pharmacol. 15,1479(1966).
206. W.R.Vogler, F.S.Mingioli, F.A.Garwood, B.A.Smith- J.Lab. Clin.Med. 79,379(1972).
207. J.Lynn- Clin.Toxicol.5,263(1972); C.A.77,147600.
208. M.Rustia; P.Shulik- Proc.Soc.Exp.Biol.137,495(1971).
209. J.H.Burchenal, G.Babcock- Proc.Soc.Exp.Biol.76,382(1951).
210. G.Emerson, K.Folkers- Ann.Rev.Biochem.20,559(1951).

211. A. Goldin, E.M. Greenspan, J.M. Venditti, F.B. Schoenbach-
J. Nat. Cancer Inst. 12, 987(1952).
212. A. Goldin, J.H. Venditti, I. Kleine, N. Mantel- Nature 212,
1548(1966).
213. E.M. Greenspan, A. Goldin, F.B. Schoenbach- Cancer 4, 619(1951).
214. J.S. Sandberg- Cancer Res. 30, 1276(1970).
215. M.T. Hakala, S.F. Zakrzewski, C.A. Nichol- J. Biol. Chem. 236, 952
(1961).
216. A.C. Sartorelli, H.F. Uppschurch, B.A. Booth- Cancer Res. 22, 102
(1962).
217. E. Skipper, M.J. Bell, J.B. Chapman- Cancer 4, 357(1951).
218. J.A. Blair, C.E. Searle- Brit. J. Cancer 24, 603(1970).
219. J.H. Burchenal, K.N. Kushida, S.F. Johnston, M.A. Cremer-
Soc. Exp. Biol. Med. 71, 559(1949).
220. A. Goldin, B. Goldberg, L.G. Ortega, E.B. Schoenbach- Cancer 2,
857(1949).
221. G.A. Gentry, P.A. Morse- Nature 212, 1843(1966).
222. G.A. Gentry, P.A. Morse, V.R. Pcter- Cancer Res. 25, 509(1965).
223. M.T. Hakala, E.T. Taylor- J. Biol. Chem. 234, 126(1959).
224. J. Borsa- Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 359(1971).
225. M.H.N. Tattersall, R.C. Jackson, S.M.T. Jackson, K.R. Harrap-
Eur. J. Cancer 10, 819(1974).
226. A.H. Anton, C.A. Nichol- Biochem. Pharmacol. 7, 75(1961).
227. J.R. Bertino- Cancer Res. 25, 1614(1965).
228. J.R. Bertino, D.R. Donohue, B.W. Gabrio, R. Silber, A. Alenty,
M. Mejer, F.H. Euennekens- Nature 193, 140(1962).
229. J.L. Biedler, A.M. Albrecht, H.J. Hutchison, P.A. Spengler-
Cancer Res. 32, 153(1972).
230. J.H. Burchenal, G.B. Waring, D.J. Hutchison- Proc. Soc. Exp. Biol.
Med. 78, 311(1951).
231. V.D. Courtenay, A.B. Robins- J. Nat. Cancer Inst. 49, 45(1972).

232. G.A.Fischer- Biochem.Pharmacol. 7,75(1961).
233. J.Freisheim, C.C.Smith- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,172(1971).
234. M.Friedkin- Cancer Res. 23,1310(1963).
235. M.Friedkin, E.Crawford, S.R.Humphreys, A.Goldin- Cancer Res. 22,600(1962).
236. M.Friedkin, A.Goldin- Cancer Res. 22,607(1962).
237. A.Hoshino, A.M.Albrecht, L.J.Biedler, D.J.Hutchison- Cancer Res. 26,1397(1965).
238. C.A.Nichol- Cancer Res. 23,1307(1963).
239. J.P.Perkins, B.L.Hillcoat, J.R.Bertino- J.Biol.Chem. 242,4771(1967).
240. A.C.Sartorelli, B.A.Booth, J.R.Bertino- Arch.Biochem.Biophys. 108,53(1964).
241. A.W.Schrecker, J.A.R.Mead, E.H.Greenberg, A.Goldin- Biochem.Pharmacol. 20,716(1971).
242. F.M.Sirotnak, R.C.Donsbach- Cancer Res. 33,1737(1973).
243. H.Nakamura, J.W.Littlefield- J.Biol.Chem. 247,170(1972).
244. A.C.Lovese- Biochem.Pharmacol. 20,2033(1971).
245. F.M.Sirotnak, G.H.Donati, D.J.Hutchison- Biochem.Biophys.Res.Comm. 14,292(1964).
246. J.B.Biedler, A.W.Schrecker, D.J.Hutchison- J.Nat.Cancer.Inst. 31,575(1963).
247. A.W.Schrecker, J.M.Venditti, E.H.Greenberg, J.L.Biedler, D.L.Robinson, D.J.Hutchison- J.Nat.Cancer.Inst. 31,557(1963).
248. C.G.Craddock, G.S.Nakai- J.Clin.Invest. 41,360(1962).
249. R.L.Dedrick, D.S.Zaharko, R.J.Lutz- J.Pharm.Sci. 62,882(1973).
250. D.Kessel, T.C.Hall, D.Roberts, I.Wodinsky- Science 150,752(1965).
251. F.M.Sirotnak, M.G.Sargent, D.J.Hutchison- J.Bacteriol. 93,315(1967).
252. E.Meinz, P.M.Walsh- J.Biol.Chem. 233,1488(1958).

253. B.M.Braganca, A.V.Divekar, N.R.Vaidya- Biochem.Biophys.Acta 135,937(1967).
254. S.P.Rothenberg- Cancer Res. 29,2047(1969).
255. M.De Costa, S.P.Rothenberg, P.Kamen- Blood 39,621(1972).
256. T.J.Bardos- Haematol.Rev.3,53(1972).
257. A.Perault, B.Pullman- Biochem.Biophys.Acta 44,251(1960).
258. A.Perault, B.Pullman- Biochem.Biophys.Acta 52,266(1961).
259. B.R.Baker- Cancer Chemother.Rep. 4,1(1956).
260. J.Soucek, V.Slavikova, M.Zuchar, E.Katynkova- Biochem.Pharmacol. 21,1907(1972).
261. S.F.Zakrzewsky- J.Biol.Chem.238,1485(1963).
262. J.J.Mc Cormack- Ann.N.Y.Acad.Sci.186,256(1971).
263. R.Collin, B.Pullman- Biochem.Biophys.Acta 89,232(1964).
264. C.K.Mathews, F.M.Huenekeps- J.Biol.Chem. 238,3436(1963).
265. W.B.Neely- Ann.N.Y.Acad.Sci.186,248(1971).
266. J.A.Montgomery, R.D.Elliott, S.L.Straight, C.Temple- Ann.N.Y. Acad.Sci.186,227(1971).
267. I.D.Gordon, N.S.Lichtenstein, V.T.Oliverio- J.Biol.Chem. 243,5007(1968).
268. J.I.De Graw, R.L.Kisliuk, Y.Gaumont, C.M.Baugh- J.Med.Chem. 17,470(1974).
269. V.Oakes, H.N.Rydon, K.Undheim- J.Chem.Soc. 1962,4679.
270. J.B.Hynes, N.T.Ashton, D.Bryansmith, J.H.Freisheim- J.Med. Chem. 17,1023(1971).
271. D.G.Johns, R.L.Capizzi, A.Nahas, A.R.Cashmore, J.R.Bertino- Biochem.Pharmacol. 19,1528(1970).
272. W.E.Richter, J.J.Cormack- J.Med.Chem.17,943(1974).
273. D.J.Hutchison, F.M.Sirotnak, A.M.Albrecht- Proc.Am.Assoc. Cancer Res. 10,41(1969).
274. M.Shiroyama, D.J.Hutchison- Proc.Am.Assoc.Cancer Res. 10, 80(1969).

275. D.Farquhar, T.L.Loo, S.Vadlamundi- J.Med.Chem. 15,567(1972).
276. A.Rosowsky, K.K.N.Chen- J.Med.Chem.17,1308(1974).
277. J.A.R.Mead, H.B.Wood, A.Goldin- Cancer Chemother.Rep. 1,273
(1968).
278. T.J.De Graw, J.P.Marsch, E.M.Acton, D.P.Crews, C.E.Masher,
A.N.Fujiwara, L.Goodman- J.Org.Chem. 30,3404(1965).
279. M.Friedkin, E.J.Crawford, L.T.Plante- Ann.N.Y.Acad.Sci. 186,
209(1971).
280. L.Goodman, J.De Graw, R.L.Kisliuk, M.Friedkin, E.J.Pastore,
E.J.Crawford, L.T.Plante, A.Nahas, J.F.Morningstar, J.Kwok,
E.F.Donovan, J.Ratzen- J.Amer.Chem.Soc. 86,308(1963).
281. Y.H.Kim, V.Grubliankas, O.M.Friedman- J.Heterocycl.Chem.
2,481(1972).
282. J.A.R.Mead, A.Goldin, R.L.Kisliuk, M.Friedkin, L.Plante,
E.J.Crawford, J.Kwok- Cancer Res. 26,2374(1966).
283. D.A.Robinson, J.M.Whiteley, N.G.L.Harding- Biochem.Soc.Trans.
I,722(1973).
284. D.B.Cosulich, D.R.Seeger, M.J.Fahrenbach, T.H.Collins, B.Roth
N.E.Hultquist, J.M.Smith- J.Amer.Chem.Soc. 75,4675(1953).
285. K.Motycka, J.Soucek, K.Slavik- Neoplasma 11,399(1964).
286. K.Motycka, J.Soucek, K.Slavik, A.Jirasek, J.Jirasek- Neo-
plasma 11,389(1964).
287. K.Slavik, V.Slavikova, L.Kolman- Coll.Czech.Chem.Comm.
25,1929(1961).
288. J.Soucek, K.Motycka, K.Slavik, J.Sochman- Coll.Czech.Chem.
Comm. 28,1963(1964).
289. J.Soucek, K.Motycka, O.Nowotna, K.Slavik- Neoplasma 12,425
(1965).
290. V.Dobre, M.Sbenghe, D.C.Suster, C.Russo-Got, G.Ciugtea-
Oncologia 16,109(1977).
291. R.B.Angier, W.V.Curran- J.Amer.Chem.Soc. 81,2814(1959).

292. J.A.R.Mead- *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 186,514(1971).
293. M.De Clerq, R.Truhaut- *Compt.Rend.* 247,2172(1956).
294. T.L.Loo, D.G.Johns, D.Farquhar- *Transplantation Proc.* V,1161
(1973).
295. A.Rosowsky- *J.Med.Chem.* 16,1190(1973).
296. B.L.Hutchings, J.H.Mowat, J.J.Oleson, E.L.R.Stockstad, J.H.
Boothe, C.W.Waller, R.B.Angier, Y.Subbarow- *J.Biol.Chem.* 170,323(1947).
297. L.T.Plante, E.J.Crawford, M.Friedkin- *J.Biol.Chem.* 242,1466
(1967).
298. R.J.Winzler- *Annu.Rev.Biochem.* 18,535(1949).
299. W.P.Wright, D.B.Cosulich, M.J.Fahrenbach, C.W.Waller, J.M.
Smith, M.E.Hultquist- *J.Amer.Chem.Soc.* 71,3014(1949).
300. M.Chaykovsky, B.L.Brown, E.J.Modest- *J.Med.Chem.* 18,909(1975).
301. W.W.Lee, A.P.Martinez, L.Goodman- *J.Med.Chem.* 17,326(1974).
302. R.Lewisohn, C.Leuchtenberger, R.Leuchtenberger, J.C.Keresz-
tesy- *Science* 104,436(1946).
303. V.Raso, R.Schreiber- *Cancer Res.* 35,1407(1975).
304. G.Mathé, B.L.Tran, J.Bernard- *Compt.Rend.* 246,1626(1958).
305. M.G.L.Harding- *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 186,270(1971).
306. J.M.Whiteley- *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 186,29(1971).
307. J.M.Whiteley, R.C.Jackson, G.P.Mell, J.H.Drais, F.M.Huënnkens
Arch.Biochem.Biophys. 150,15(1972).
308. S.A.Jacobs, M.d'Urso-Scott, J.R.Bertino- *Ann.N.Y.Acad.Sci.*
186,284(1971).
309. C.W.Waller, B.L.Hutchings, J.H.Mowat, E.L.R.Stockstad, J.A.
Boothe, R.B.Angier, J.Semb, Y.Subbarow, D.B.Cosulich, M.J.
Fahrenbach, M.E.Hultquist, E.Kuh, E.H.Northey, D.R.Seeger,
J.P.Sickels, J.M.Smith- *J.Amer.Chem.Soc.* 70,19(1948).
310. M.E.Hultquist, E.Kuh, D.B.Cosulich, M.J.Fahrenbach, E.H.
Northey, D.R.Seeger, J.P.Sickels, J.M.Smith, R.B.Angier,

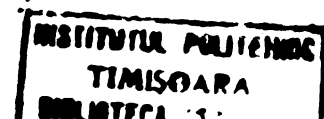
- J.H.Boothe, B.L.Hutchings, J.H.Mowat, J.Semb, E.L.R.Stockstad, Y.Subbarow, C.W.Waller- J.Amer.Chem.Soc. 70,23(1948).
311. R.B.Angier, E.L.R.Stockstad, J.H.Mowat, B.L.Hutchings, J.H.Boothe, C.W.Waller, J.Semb, Y.Subbarow, D.B.Cosulich, M.J.Fahrenbach, M.E.Hultquist, E.Kuh, E.H.Northey, D.R.Seeger, J.P.Sickels, J.M.Smith- J.Amer.Chem.Soc. 70,25(1948).
312. H.S.Forrest, J.Walker- J.Chem.Soc. 1949,2003.
313. S.Uyeo, S.Mizukami, T.Kubota, S.Takagi- J.Amer.Chem.Soc. 72,5339(1950).
314. F.Weygand, G.Schaefer- Naturwissenschaften 38,432(1951).
315. D.B.Cosulich- U.S.Pat. 2.563.707; C.A. 46,3092
316. F.E.King, P.C.Spensley- Nature 164,574(1949).
317. F.Weygand, G.Schaefer- Chem.Ber. 85,307(1952).
318. A.Mizukami- Japan.1113('51); C.A. 46,3886.
319. J.Oki, K.Morita- Japan.1083('53); C.A. 48,2124.
320. S.Oyama, K.Morita- Japan 7031('51); 48,746.
321. C.W.Waller, J.H.Mowat- U.S.Pat. 2.500.296 (1950); C.A. 44,5401.
322. V.A.Kirsanova, A.V.Trufanov- Biokhimiya 14, 413(1949).
323. G.J.Martin, U.Urist- U.S.Pat. 2.478.873(1949); C.A. 43,9389.
324. K.Yamamoto- Japan 2781('52); C.A. 48, 2786.
325. American Cyanamid Co. Brit.Pat.638.411(1950); C.A. 44, 9488.
326. American Cyanamid Co. Brit.Pat.640.092(1950); C.A. 45, 2513.
327. F.Weygand, O.P.Swoboda- Chem.Ber. 89,18(1956).
328. American Cyanamid Co. Brit.Pat.648.896(1951); C.A. 45,10263.
329. S.Mizukami- Japan 1380('55); C.A. 51,2886.
330. S.Zawanishi, K.Matsui- Japan 3328-3330('59); C.A. 54,14283.
331. T.Hoshino- Japan 1778('52); C.A. 47,6612.
332. H.Sato- J.Chem.Soc.Japan, Pure Chem.Sect. 72,815(1951).
333. Kongo Chemical Co.- Brit.Pat.823.827(1959); C.A. 54,5713.
334. L.Doub, L.L.Bambas- U.S.Pat. 2.476.360(1949); C.A. 44,173.
335. J.Geraci- Brit.Pat. .654.512(1951); C.A. 46,4577.

336. J.Geraci- U.S.Pat.2.501.168(1950); C.A.44,5924.
337. J.Geraci- U.S.Pat.2.766.240(1956); C.A.51,7443.
338. D.I.Weisblat, B.J.Margelein- U.S.Pat.2.631.149(1953);C.A.48,
. 1446.
339. C.W.Waller, J.H.Mowat- U.S.Pat.2.598.667(1952);C.A.47,3354.
340. D.E.Cosulich, J.M.Smith- J.Amer.Chem.Soc.70,1922(1948).
341. J.M.Smith, D.B.Cosulich- U.S.Pat.2.512.572(1950).
342. M.E.Hultquist, J.M.Smith, D.R.Seeger, D.B.Cosulich- J.Amer.
Chem.Soc. 71,619(1949).
343. J.H.Boothe, J.Semb, C.W.Waller, R.B.Angier, J.H.Mowat, B.L.
Hutchings, E.L.R.Stokstad, Y.Subbarow- J.Amer.Chem.Soc,
71,2304(1949).
344. J.H.Mowat, A.L.Gazzola, B.L.Hutchings, J.H.Boothe, C.W.Waller
R.B.Angier, J.Semb, Y.Subbarow- J.Amer.Chem.Soc.71,2308(1949)
345. J.Semb, H.J.Boothe, R.B.Angier, C.W.Waller, J.H.Mowat, B.L.
Hutchings, Y.Subbarow- J.Amer.Chem.Soc./71,2310(1949)..
346. D.R.Seeger, J.M.Smith, M.E.Hultquist- J.Amer.Chem.Soc..
69,2567(1947).
347. D.R.Seeger- U.S.Pat.2.568.597; C.A.46,5094.
348. B.M.Berezovski, G.D.Glebova, E.M.Birimberg, L.V.Kazanskaya-
Khim.Farm.Zh. 2,15(1968)..
349. L.V.Alexeeva, H.L.Burde, B.N.Lundin- Khim.Farm.Zh.2,30(1968).
350. M.E.Hultquist, P.F.Dreisbach- U.S.Pat.2.443.165.
351. V.M.Berezovskii, E.M.Birinberg, G.D.Glebova- U.R.S.S.Pat.
245.115(1969).
352. M.C.Nair, C.M.Baugh- Biochemistry 12,3923(1973).
353. G.E.Storm, R.Shiman, S.Kaufman- J.Org.Chem.36,3925(1971).
354. D.J.Brown, B.T.England- J.Chem.Soc. 1965,1530.
355. B.Roth, J.M.Smith, M.E.Hultquist- J.Amer.Chem.Soc.72,1914
(1950)..
356. B.Roth, J.M.Smith, M.E.Hultquist- J.Amer.Chem.Soc.73,2869
(1951).

357. B.Roth, J.M.Smith, M.E.Hultquist- J.Amer.Chem.Soc. 73, 2826 (1951).
358. J.M.Smith- U.S.Pat.2.525.150(1950); C.A. 45, 3429.
359. S.Kawanishi- Ger.Pat.1.047.786(1957).
360. D.I.Weisblat, B.J.Margelein, A.R.Harze, D.R.Myers, S.T.Rolfson- J.Amer.Chem.Soc. 75, 3625(1953).
361. R.D.Elliott, C.Temple, J.A.Montgomery- J.Org.Chem. 35, 1676 (1970).
362. R.D.Elliott, C.Temple, J.L.Frye, J.A.Montgomery- J.Org.Chem. 36, 2818(1971).
363. American Cyanamid Co.-Brit.Pat.638.415(1950); C.A. 44, 9488.
364. C.W.Waller- Fr.Pat.1.013.474(1947).
365. C.W.Waller- U.S.Pat.2.474.022(1949); C.A. 43, 7974.
366. V.M.Berezovskii, D.I.Strelchunas, M.Y.Kagan- U.R.S.S.Pat. 104.992(1957); C.A. 51, 10011.
367. G.Carrara, N.d'Amato- U.S.Pat.2.694.710(1954); C.A. 42, 2683.
368. Upjohn Co.- Fr.Pat.1.079.851(1953).
369. T.L.Loo- J.Med.Chem. 8, 139(1965).
370. H.G.Backer, A.C.Houtman- Rec.Trav.Chim. 70, 730(1951).
371. American Cyanamid Co. Brit.Pat.650.318(1951); C.A. 46, 146
372. American Cyanamid Co. Brit.Pat.644.913(1950); C.A. 45, 4747.
373. B.L.Hutchings- U.S.Pat.2.470.490(1949); C.A. 43, 6672.
374. B.L.H., J.M.Smith- U.S.Pat.2.474.184(1949); C.A. 43, 7052.
375. B.L.Hutchings- U.S.Pat.2.457.375(1948); C.A. 43, 4430.
376. V.M.Berezovskii, A.M.Yurkevich, E.P.Rodionova, I.K.Krivosheina, E.M.Birinberg, L.A.Vinokhodova, A.F.Aftonomova- U.R.S.S.Pat.145.567(1962); C.A. 57, 7075.
377. R.L.Kisliuk, M.D.Levine- J.Biol.Chem. 239, 1900(1964).
378. S.B.Horwitz, R.L.Kisliuk- J.Med.Chem. 11, 907(1968).
379. V.T.Cliverio- Anal.Chem. 33, 263(1961).
380. A.S.Tomcufofik, D.Seeger- J.Org.Chem. 26, 3351(1961).
381. W.R.Heinrich, V.Devey, G.Hidder- J.Chromat. 2, 296(1950).

382. E.P.Noble- Biochem.Prep. 8,20(1961).
383. Y.S.Shin, K.U.Buehring, E.L.R.Stokstad- J.Biol.Chem. 247,7266
(1972).
384. J.H.Boothe, C.W.Waller, E.L.R.Stokstad, B.L.Hutchings, J.H.
Mowat, R.B.Angier, J.Semb, Y.Subbarow, D.B.Cosulich, M.J.
Fahrenbach, M.E.Hultquist, E.Kuh, E.H.Northey, D.R.Seeger,
J.P.Sickels, J.M.Smith- J.Amer.Chem.Soc. 70,27(1948).
385. C.W.Waller, M.J.Fahrenbach, J.H.Boothe, R.B.Angier, B.L.
Hutchings, J.H.Mowat, J.F.Poletto, J.Semb- J.Amer.Chem.Soc.
74,5405(1952).
386. A.A.Goldman, C.Waller- Fr.Pat.1.067.827(1954).
387. A.A.Goldman, C.Waller- U.S.Pat.2.615.891(1952); C.A. 47,10014.
388. J.H.Boothe- Brit.Pat.631.494(1949); C.A. 44,4047.
389. J.H.Boothe- U.S.Pat.2.547.519(1951); C.A. 46,2586.
390. R.Tschersche- U.S.Pat.2.632.760(1953); C.A. 48,7065.
391. J.H.Boothe- U.S.Pat.2.584.538(1952); C.A. 46,9623.
392. Z.V.Pushcareva, L.V.Alexeeva- J.Obsh.Khim. 32,1058(1962).
393. W.Loop, R.Tschersche- Ger.Pat.828.545(1952); C.A. 50,3504.
394. J.R.Piper, J.A.Montgomery- J.Heterocycl.Chem. 11,279(1974).
395. F.Hoffmann La Roche Co.- Swiss Pat.253.838(1948).
396. T.S.Gardner, E.Wenis- U.S.Pat.2.561.658(1951); C.A. 46,1052.
397. R.Tschersche, K.H.Köhnke, F.Korte- Chem,Ber. 84,579(1961).
398. R.Tschersche, F.Korte- Ger.Pat.887,812(1953); C.A. 52,16385.
399. R.Tschersche, Z.Zakrzewsky, F.Korte- Chem.Ber. 86,450(1953).
400. J.H.Boothe, J.H.Mowat, C.W.Waller, R.B.Angier, J.Semb,
A.L.Gazzola- J.Amer.Chem.Soc. 74,5407(1952).
401. J.Semb- Fr.Pat.955.983(1947).
402. American Cyanamid Co.-Brit.Pat.656.403(1951); C.A. 46,7595.
403. H.Spiegelberg- U.S.Pat.2.487.393(1949); C.A. 44,7356.
404. J.Semb- U.S.Pat.2.491.285(1949); C.A. 44,3040.
405. F.Hoffmann La Roche Co.- Swiss Pat.25.814(1949); C.A. 44,1546.
406. Produits Roche, Soc.anon.Belg.481.230(1948); C.A. 44,3536.

407. E.C.Roberts, Y.Fulmer-Shealy- J.Med.Chem. 17, 219(1974). . .
408. E.C.Roberts, Y.Fulmer-Shealy- J.Med.Chem. 14, 125(1971). . .
409. F.Hoffmann La Roche- Swiss Pat.259.143(1947).
410. G.Emerson, K.Folkers- Annu.Rev.Biochem. 20, 559(1951).
411. M.Schletzinger, D.Reinhold, J.Grier, M.Beachem, M.Tishler-
J.Amer.Chem.Soc. 77, 6365(1955).
412. L.T.Plante- J.Org.Chem. 36, 860(1971).
413. P.Ballmer- Swiss Pat.266.996(1950); C.A. 45, 4747.
414. F.Hoffmann La Roche Co., Swiss Pat.259(123(1949); C.A. 44, 3040.
415. F.Hoffmann La Roche Co., Brit. Pat.628.305(1949); C.A. 44, 4046.
416. H.Kircheinsteiner, H.Klaeni, H.Lindlar- U.S.Pat.2.658.896;
C.A. 49, 386.
417. H.S.Forrest, J.Walker- J.Chem.Soc. 1949, 2077.
418. F.Hoffmann La Roche- Fr.Pat.952,073(1947).
419. C.M.Baugh, E.Shaw- J.Org.Chem. 29, 3610(1964).
420. A.Weygand, A.Wacker, V.Schmied-Kowarzik- Experientia 4, 427
(1948).
421. A.Weygand, V.Schmied-Kowarzik, A.Wacker, W.Rupp- Chem.Ber.
83, 460(1950).
422. C.W.Waller- U.S.Pat.2.517.530(1950); C.A. 45, 674.
423. J.Serb- J.Amer.Chem.Soc. 72, 4630(1950).
424. H.H.W.Thijsson- Anal.Biochem. 54, 609(1973).
425. D.Szломpek-Nesteruh, L.Znojek, P.Kazimierczak- Przemysl.Chem.
42, 226(1963); C.A. 60, 4144.
426. D.Szломpek-Nesteruh, P.Kazimierczak- Pol.Pat.49.037(1965).
427. L.F.Cavalieri, A.Bendich, J.F.Tinker, G.B.Brown- J.Amer.Chem.
Soc. 70, 3875(1948).
428. T.L.V.Ulbricht, C.C.Price- J.Org.Chem. 21, 567(1956).
429. M.F.Mallette, E.C.Taylor, C.K.Cain- J.Amer.Chem.Soc. 69, 1814
(1947).
430. A.Schrage, G.H.Hitchings- J.Org.Chem. 16, 207(1951).



431. W.Traube- Ber.46,3843(1913).
432. W.Traube-Ber. 37,4545(1904).
433. H.Sato, M.Nakajima, H.Tanaka- J.Chem.Soc.Jap.,Pure Chem.Sect.
72,866(1951).
434. R.Mozingo, G.S.Fonken- U.S.Pat.2.447.523(1948); C.A.42,8828.
435. G.Longo- Gazz.Chim.Ital.61,575(1931).
436. Lonza Ltd.- Fr.Pat.1.356.202(1964); C.A.61,13202.
437. C.Vogel, E.C.Taylor- J.Amer.Chem.Soc.79,1518(1957).
438. E.C.Taylor, C.Vogel, C.C.Chen- J.Amer.Chem.Soc.81,2442(1959).
439. Org.Synthesis Coll. vol.I, H.Gilman-editor, Ediția II,
Wiley, 1958, p.179.
440. E.J.Maxion- U.S.Pat.2.799.697.
441. A.Surrey- U.S.Pat.2.389.217(1945).
442. A.Surrey- J.Amer.Chem.Soc.65,2171(1943).
443. A.C.Flisik, L.Nichol- U.S.Pat.2.809.986.
444. Org.Synthesis Coll. vol.II, H.Gilman-editor, Ediția II,
Wiley, 1958, p.379.
445. G.Kessin, L.Nichol- U.S.Pat.2.802.857.
446. E.Fischer, J.Tafel- Ber.33,1371(1900).
447. E.Fischer, J.Tafel- Ber.20,3389(1887).
448. J.P.Werd, D.A.Van Dorp- Rec.Trac.Chim.85,117(1966).
449. M.M.C.Moureu, E.B.Boismenu- Ann.Chim.15,209(1921).
450. A.V.Dombrovski- J.Obschch.Khim.24,610(1954).
451. D.P.Wyran, P.R.Kaufman- J.Org.Chem.29,1956(1964).
452. W.Polaczkoła, Z.Barikowska- Roczn.Chem.30,119(1956).
453. W.R.Siegart, A.R.Day- J.Amer.Chem.Soc.79,4391(1957).
454. V.Budeanu, I.D.Drăgă, Anal.Univ."A.I.Cuza" Iași, Sect.I,VI,
Fasc.4 (1960).
455. V.Budeanu, V.Sunel- Anal.Univ."A.I.Cuza" Iași, Sect.I,XVI,
Fasc.1 (1969).
456. S.C.J.Fu, M.Reiner, T.L.Loo- J.Org.Chem.30,1277(1965).

457. W.S.Emerson, R.A.Heimsch- J.Amer.Chem.Soc. 73,1299(1951).
458. M.Sekya, K.Ito- Chem.Pharm.Bull. 14,1007(1966).
459. A.R.Surrey, H.F.Hammer- J.Amer.Chem.Soc. 66,2127(1944).
460. O.M.Friedman, A.M.Selignan- J.Amer.Chem.Soc. 76,658(1954).
461. S.G.Cohen- J.Amer.Chem.Soc. 86,4999(1964).
462. M.Goodman, E.E.Schmitt, D.A.Yphantis- J.Amer.Chem.Soc. 84,1283
(1962).
463. H.M.Chiles, W.A.Noyes- J.Amer.Chem.Soc. 44,1798(1922).
464. R.B.Angier, C.W.Waller, B.L.Hutchings, J.H.Boothe, J.E.Nowat,
J.Semb, Y.Subbarow- J.Amer.Chem.Soc. 72;47(1950).
465. E.C.Taylor, K.L.Perlman, I.P.Sword, M.Séquin-Frey, P.A.Jacobi-
J.Amer.Chem.Soc. 95,6407(1973).
466. E.C.Taylor, K.L.Perlman, Y-Ho Kim, I.P.Sword, P.A.Jacobi-
J.Amer.Chem.Soc. 95,6413(1973).
467. M.Chaykovsky, A.Rosowsky, E.J.Modest,- J.Heterocycl.Chem. 10,
425(1973).
468. E.C.Taylor, R.C.Partnoy, D.C.Hochstetler, T.Kobayashi-
J.Org.Chem. 40,2347(1975).
469. E.C.Taylor, T.Kobayashi- J.Org.Chem. 38,2817(1973).
470. E.C.Taylor, K.Lenard- J.Amer.Chem.Soc. 90,2424(1968).
471. H.G.Mautner, Y-Ho Kim- J.Org.Chem. 40,3447(1975).
472. Merck Co.- Brit.Pat.676.863(1951); C.A. 42,9370.
473. H.A.Godwin, I.R.Rosenberg, C.R.Ferenz, P.M.Jacobs, J.Weinhofer-
J.Biol.Chem. 247,2266(1972).
474. C.L.Krumdieck, C.M.Baugh- Biochemistry 8,1568(1969).
475. C.M.Baugh, J.C.Stevens, C.L.Krumdieck- Biochem.Biophys.Acta
212,116(1970).
476. A.Eobst- Helv.Chim.Acta 49,875(1964).
477. J.A.Brockman, B.Roth- Brit.Pat.708.304(1954); C.A. 42,4733.
478. J.A.Brockman, M.J.Fahrenbach- U.S.Pat.2.790.802(1957);
C.A. 51,15616.

479. J.H.Mowat- U.S.Pat.2.601.215(1952); C.A. 48,8271.
480. T.J.Pastore, M.Friedkin, O.Jardatzky- J.Amer.Chem.Soc. 85,
3058(1963).
481. L.Davis- Anal.Chem. 26,459(1968).
482. M.Silverman, J.H.Noronha- Biochem.Biophys.Res.Comm. 4,180
(1961)..
483. M.E.Hultquist, B.Roth- U.S.Pat.2.739.967(1956).
484. M.Chaykovsky- J.Org.Chem. 40,145(1975).
485. V.Slavikova, K.Slavik- Experientia 17,113(1961).
486. D.B.Cosulich- U.S.Pat.2.659.726(1953); C.A. 48,13732.
487. E.A.Kaczka, K.Folkers- U.S.Pat.2.632.759(1953).
488. D.B.Cosulich, B.Roth, J.M.Smith, M.E.Hultquist, R.P.Parker-
J.Amer.Chem.Soc. 74,3252(1952).
489. M.May, T.H.Bardos, F.L.Barger, M.Lansfort, J.M.Ravel, C.L.
Sutherland, W.Shive- J.Amer.Chem.Soc. 73,3051(1951).
490. B.Roth, M.E.Hultquist, M.J.Fahrenbach, D.B.Cosulich, H.P.
Proquist, J.A.Brockman, J.M.Smith, R.P.Parker, E.L.R.Stok-
stad, T.H.Jukes- J.Amer.Chem.Soc. 74,3247(1952).
491. W.Shive- U.S.Pat.2.741.608(1956); C.A. 52,3875.
492. American Cyanamid Co.- Brit.Pat.733.130(1950);C.A. 50,7884.
493. R.L.Dion, T.L.Loo- J.Org.Chem. 26,1857(1961).
494. R.B.Angier, J.M.Boothe, J.H.Mowat, C.W.Waller, J.Semb-
J.Amer.Chem.Soc. 74,408(1952).
495. B.L.Hutchings, E.L.R.Stokstad, N.Bohonos, N.H.Sloane, Y.
Subbarow- J.Amer.Chem.Soc. 70,1(1948)..
496. H.J.Backer, A.C.Houtman- Rec.Trav.Chim. 70,738(1951)..
497. D.R.Seeger, D.B.Cosulich- U.S.Pat.2.570.392(1951).
498. T.L.Loo, R.L.Dion- J.Org.Chem. 30,2837(1965).
499. T.L.Loo, R.L.Dion, R.H.Adamson, M.A.Chirigos, R.L.Kisliuk-
J.Med.Chem. 8,713(1965)..
500. D.B.Cosulich, D.R.Seeger, M.J.Fahrenbach, K.H.Collins, M.E.

- Hultquist, J.M.Smith- *J.Amer.Chem.Soc.* 75,3625(1953).
501. J.A.Montgomery, K.Hewson, R.H.Piper- *J.Med.Chem.* 8,727(1965).
502. D.B.Cosulich, D.R.Seeger, M.J.Fahrenbach, B.Roth, J.H.Mowat, J.M.Smith, M.E.Hultquist- *J.Amer.Chem.Soc.* 73,2554(1951).
503. I.Ziegler-Günder, H.Simon, A.Wacker- *Z.Naturforsch.,Pt.b*, 11,82(1956).
504. O.Brenner-Holzach, F.Leuthardt- *Helv.Chim.Acta* 42,2254(1959).
505. O.Brenner-Holzach, F.Leuthardt- *Helv.Chim.Acta* 44,1480(1961).
506. J.J.Reynolds, G.M.Brown- *J.Biol.Chem.* 239,317(1961).
507. T.Shiota, M.P.Palumbo- *J.Biol.Chem.* 240,4449(1965).
508. J.J.Reynolds, G.M.Brown- *J.Biol.Chem.* 237,PC 2713(1962).
509. A.Albert- *Biochem.J.* 57, (1954).
510. A.Albert- *Biochem.J.* 65,124(1957).
511. F.Weygand, M.Waldschmidt- *Angew.Chem.* 67,328(1955).
512. F.Weygand, H.Simon, G.Dahms, M.Waldschmidt, H.J.Schliep, A.Wacker- *Angew.Chem.* 73,402(1961).
513. E.Vieina, E.Shaw- *J.Biol.Chem.* 236,2507(1961).
514. M.Gotc, H.S.Forrest- *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 6,180(1961).
515. C.L.Krumdieck, E.Shaw, C.M.Baugh- *J.Biol.Chem.* 241,383(1966).
516. M.J.Griffin, G.M.Brown- *J.Biol.Chem.* 239,311(1964).
517. R.A.Weisman, G.M.Brown- *J.Biol.Chem.* 239,326(1964).
518. R.I.No, L.Corman, W.C.Foye- *J.Pharm.Sci.* 63,1474(1974).
519. T.Shiota, M.N.Disraeli, M.P.Me Cana- *J.Biol.Chem.* 239,2259(1964).
520. D.C.Suster, L.V.Feyns, G.Ciugtea, G.Botez, V.Dobre, R.Fick, I.Niculescu-Duvăz- *J.Med.Chem.* 17,758(1974).
521. D.C.Suster, I.Niculescu-Duvăz, A.Pănescu, V.Dobre- *Ror.Pat.* 56.210(1970).
522. I.Niculescu-Duvăz, L.V.Feyns, D.C.Suster, G.Ciugtea- *Ror.Pat.* 55.885(1970); *Ger.Pat.* 2.413.716(1974); *U.S.Pat.* 3.989.703(1976); *Brit.Pat.* 1.414.752(1976).

523. D.C.Suster, L.V.Feyns, G.Ciuștea, V.Dobre, G.Maltezeanu, I.Niculescu-Duvăz- Congresul Național de Farmacie- iulie 1973- București.
524. D.C.Suster, G.Ciuștea, A.Dumitrescu, L.V.Feyns, E.Tărnăuceanu, G.Botez, S.Angelescu, V.Dobre, I.Niculescu-Duvăz- Rev.Roum.Chim.22,1195(1977).
525. I.Niculescu-Duvăz, D.C.Suster, V.Feyns, G.Ciuștea, A.Dumitrescu, G.Botez, M.Ionescu, R.Bick- Simp. "Medicamente cu Acțiune Citostatică"- octombrie 1972, București.
526. D.C.Suster- Rom.Pat.64.531(1977).
527. G.Ciuștea, D.C.Suster, A.Dumitrescu, M.Ionescu- Rom.Pat. 58.475(1971).
528. D.C.Suster, G.Botez, V.Neagu- Rom.Pat.59.968(1972).
529. D.C.Suster, S.Angelescu- Rom.Pat.60.252(1973).
530. D.C.Suster, E.Tărnăuceanu, I.Niculescu-Duvăz- Rev.Chim, (București) 28,793(1977).
531. D.C.Suster, E.Tărnăuceanu, M.Ionescu, V.Dobre, I.Niculescu-Duvăz- J.Med.Chem.-sub tipar.
532. D.C.Suster, E.Tărnăuceanu, G.Botez, V.Dobre, I.Niculescu-Duvăz- J.Med.Chem.- sub tipar.
533. F.Weygand, A.Wacker, V.Schmied-Kowarzik- Experientia 6,184 (1950).
534. S.Matsuura, T.Goto- J.Chem.Soc. 1963,1773.
535. N.Vinot- Bull.Soc.Chem.Fr.1971,3695.
536. E.J.Pastore- Ann.N.Y.Acad.Sci.186,43(1971).
537. W.C.Colburn- J.Org.Chem.30,1110,1114(1965).
538. C.B.Storr, R.Shiman, S.Kaufman- J.Org.Chem.36,3925(1971).
539. S.Matsuura, T.Goto- J.Chem.Soc. 1965,623.
540. P.K.Sengupta, J.H.Bieri, M.Viscontini- Helv.Chim.Acta 58, 1374(1975).
541. W.Philipsborn, H.Stierlin, W.Traber- Helv.Chim.Acta 46,2594 (1963).

542. L.Merlin, W.Philipsborn, M.Viscontini- *Helv.Chim.Acta* 46,2597
(1963).
543. A.Dieffenbacher, R.Mondelli, W.Philipsborn- *Helv Chir.Acta*
49,1355(1966).
544. J.H.Bieri, M.Viscontini- *Helv.Chim.Acta* 56,2905(1973).
545. E.Khalifa, J.H.Bieri, M.Viscontini- *Helv.Chir.Acta* 56,2911
(1973).
546. M.Viscontini, J.H.Bieri- *Helv.Chir.Acta* 54,229(1971).
547. A.Dieffenbacher, W.Philipsborn- *Helv.Chir.Acta* 52,743(1969).
548. G.A.Anslow, S.C.Nassar- *J.Opt.Soc.Am.*31,118(1941).
549. A.R.Goldfarb, L.J.Saidel- *Science* 114,156(1951).
550. L.J.Saidel, A.R.Goldfarb- *Fed.Proc.*10,241(1951).
551. G.E.Beaven, E.R.Holiday- *Advan.Protein Chem.* p.319
552. R.B.Setlow, W.R.Guild- *Arch.Biochem.Biophys.* 34,223(1951).
553. L.J.Saidel- *Arch.Biochem.Biophys.* 54,184(1955).
554. L.J.Saidel- *Arch.Biochem.Biophys.* 56, 45(1955).
555. A.R.Goldfarb, E.Hoffmann, N.Gutstein- *Arch.Biochem.Biophys.*
70,161(1958).
556. D.J.Pasto, C.R.Johnson- "Organic Structure Determination"-
Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New York 1969.
557. C.N.R.Rao- "Ultra-violet and Visible Spectroscopy", Butter-
worths and Co., London 1961.
558. S.F.Mason- *J.Chem.Soc.*1955,2336
559. D.J.Brown, S.F.Mason- *J.Chem.Soc.*1956,3443..
560. S.F.Mason- *J.Chem.Soc.*1959,1240.
561. R.C.Elderfield- "Heterocyclic Compounds" vol.9, J.Wiley,
New York,London,Sydney
562. I.R.Gnidets, M.Turkevich- *Farmatst.Zh.*16,48(1951).
563. L.Thiéry- *Eur.J.Biochem.*37,100(1973).
564. F.J.Bellamy- "The Infra-red Spectra of Complex Molecules",
J.Wiley, New York 1960.

565. S.Fermandijan, P.Fromageot- Eur.J.Biochem.28,174(1972)..
566. T.Miyazawa, E.R.Blout- J.Amer.Chem.Soc.83,712(1961).
567. G.B.B.M.Sutherland- Advan.Protein.Chem.p.291
568. H.Asai, M.Tsuboi, T.Shimanouchi, S.Mizushima- J.Phys.Chem.
59,322(1955).
569. S.E.Darmon, G.B.B.M.Sutherland- J.Amer.Chem.Soc.69,2074(1947)
570. H.G.Mautner, I-Ho Kim, J.Org.Chem.40,3447(1973).
571. M.Poe- J.Biol.Chem.248,7025(1973).
572. D.C.Suster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 15,161(1976)..
573. D.C.Suster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 16,1 (1977)..
574. D.C.Suster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 16,81 (1977).
575. D.C.Suster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 16,161(1977)..
576. D.C.Suster, I.Niculescu-Duvăz- Oncologia 16,175(1977).
577. V.Dobre, M.Sbenghe, D.C.Suster, C.Russo-Goț, G.Ciuștea-
Sesiunea Anuală de Comunicări- I.O.B.,1975, București.
578. V.Dobre, G.Maltezeanu, D.C.Suster- Simp. "Medicamente cu
Acțiune Citostatică"- octombrie 1972, București.
579. V.Dobre, M.Sbenghe, D.C.Suster- Oncologia- sub tipar.
580. V.Dobre, D.C.Suster, M.Sbenghe, G.Ciuștea, A.Dumitrescu,
Z.Mureșan, I.Niculescu-Duvăz- Sesiunea Anuală de Comunicări,
I.O.B., 1977, București.
581. C.A.Nichol, S.F.Zakrzewski, A.D.Welch- Proc.Soc.Exp.Biol.
83,272(1953).
582. L.J.Tepley, C.A.Elvehjem- J.Biol.Chem.157,303(1945)..
583. C.K.Mathews, K.G.Serimglow, F.M.Hueneckens in "Methods in
Enzimology"- S.P.Colowick, N.O.Kaplan- editori, vol.VI, p.364.
Academic Press, 1963.
584. B.G.Stanley, O.E.Neal, D.C.Williams in "Methods in Enzimology"
S.P.Colowich, N.O.Kaplan- editori, vol.XVIII, p.775, Academic
Press, 1971.
585. B.T.Kaufman, R.C.Gardinar- J.Biol.Chem.241,1319(1966)..

586. J.R.Moralis, D.M.Greenberg- Biochem.Biophys.Acta 85,360(1964)
587. P.B.Rowe, P.J.Russel- J.Biol.Chem. 248,984(1973).
588. J.J.Hänggi, J.W.Littlefield- J.Biol.Chem.249,1390(1974).
589. J.Gauldie, L.Marshall, B.L.Hillcoat- Biochem.J.133,349(1973).
590. M.Dixon, E.C.Webb- "Enzymes", Longmans, 1960.
591. E.Layne în S.P.Colowich, N.O.Kaplan "Methods in Enzimology"
vol. III, p.417, Academic Press, 1957.
592. D.Wartburg, W.Christian- Biochem.Z. 310,384(1941).
593. B.Roth, J.Burchall în "Methods in Enzimology"- S.P.Colowich,
N.O.Kaplan- editori, vol.XVIII, p 749, Academic Press, 1971.
594. C.Barbu- comunicare personală..
595. J.Cornfield, N.Mantel- J.Amer.Statist.Ass. 45,181(1950).
596. H.R.Adamson, S.T.Yancew, M.Ben, T.L.Loo, D.P.Rall- Arch. Int.
Pharmacodyn. 153,87(1965).
597. Org.Synthesis Coll. vol.III,H.Gilman- editor, Ediția II,
Willey, 1958, p.167 .
598. S.C.J.Fu- J.Med.Pharm.Chem.5,33(1963).
599. M.Yerevan- Arm.Khim.Zh.28,57(1975).
600. A.Dolgov-"Cataliza în Chimia Organică"- Editura Tehnică,
București, 1962