

Darstellung und chemische Eigenschaften cytostatisch wirksamer Aminosäureester des 9.10-Phenanthrenhydrochinons

H. J. RISSE * und H. TIEDEMANN **

Heiligenberg-Institut, Heiligenberg/Baden

(Z. Naturforsch. **20 b**, 1074—1076 [1965]; eingegangen am 1. Juli 1965)

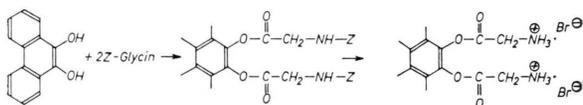
The synthesis and the properties of three cytostatic amino acid esters of 9.10-phenanthrahydroquinone are described. These substances, 9.10-Bis-glycyloxy-phenanthrene-bis-hydrobromide, 2-Nitro-9.10-bis-glycyloxy-phenanthrene-bis-hydrobromide and 2-Glycylamino-9.10-bis-glycyloxy-phenanthrene-tris-hydrobromide are soluble in water.

In früheren Arbeiten haben wir über die Einwirkung von 9.10-Phenanthrenchinon sowie Estern des 9.10-Phenanthrenhydrochinons auf die Glykolyse sowie das Wachstum des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus und des Jensen-Sarkoms der Ratte berichtet. Die Ester werden in den Geweben hydrolysiert. Die dabei freigesetzten Hydrochinone unterliegen einem Redoxcyclus¹⁻⁶.

In der vorliegenden Mitteilung sollen nun Darstellung und Eigenschaften der von uns für die biologischen Versuche verwendeten 9.10-Phenanthrenhydrochinonester beschrieben werden.

Die Darstellung von Hydrochinon-Aminosäureestern durch Umsetzung des Hydrochinons mit Aminosäurechloriden in alkalischem Medium analog der Darstellung von Phenolestern⁷ führte zu geringen Ausbeuten (bis 3%). Zu besseren Ausbeuten kamen wir durch Kondensation der Carbobenzoxy-Aminosäure mit dem Hydrochinon mittels Dicyclohexylcarbodiimid *** (bis 50% d. Th.).

Der Gang der Synthese geht aus folgendem Formelschema hervor:



9.10-Phenanthrenhydrochinon (oder ein entsprechendes Derivat) wird in Tetrahydrofuranlösung unter Stickstoff mit der Carbobenzoxy-Verbindung einer Aminosäure zusammengegeben. Auf die Zu-

gabe von DCCI fällt nach kurzer Zeit schwerlöslicher Dicyclohexylharnstoff aus. Aus der überstehenden Reaktionslösung erhält man das Carbobenzoxy-Derivat des 9.10-Phenanthrenhydrochinon-bis-aminosäureesters.

Die Abspaltung der Carbobenzoxygruppe erreicht man am besten durch Behandeln der Verbindung mit HBr/Eisessig, wobei das Hydrobromid des Phenanthrenhydrochinonaminosäureesters entsteht. Nach diesen Verfahren wurden die folgenden drei Verbindungen synthetisiert:

- 9.10-Bis-glycyloxy-phenanthren-bis-hydrobromid,
- 2-Nitro-9.10-bis-glycyloxy-phenanthren-bis-hydrobromid,
- 2-Glycylamino-9.10-bis-glycyloxy-phenanthren-tris-hydrobromid.

Eigenschaften der Ester

Die drei Esterhydrobromide stellen amorphe Pulver dar, die keine definierten Schmelzpunkte besitzen und sich oberhalb 300° langsam zersetzen. Das am Phenanthrenhydrochinon unsubstituierte Esterhydrobromid ist weiß, die 2-Nitroverbindung gelb und die 2-Glycylaminoverbindung ziegelrot.

Die Wasserlöslichkeit der Ester, die für den biologischen Test von Interesse ist, liegt bei der unsubstituierten und bei der 2-Nitroverbindung in der

* Gegenwärtige Adresse: Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg/Br.-Zähringen.

** Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Wilhelmshaven.

¹ H. TIEDEMANN u. H. J. RISSE, *Experientia* [Basel] **XVI**, 319 [1960].

² H. J. RISSE, Diplomarbeit, Freiburg 1960.

³ H. TIEDEMANN u. H. J. RISSE, *Z. Naturforsch.* **16 b**, 120 [1961].

⁴ H. J. RISSE u. H. TIEDEMANN, *Z. Naturforsch.* **17 b**, 322 [1962].

⁵ H. J. RISSE, Dissertation, Freiburg 1962.

⁶ U. DOLD, H. J. RISSE u. H. TIEDEMANN, *Z. Naturforsch.* **18 b**, 1053 [1963].

⁷ O. KARRER, *Helv. chim. Acta* **31**, 398 [1948].

*** Abkürzungen: Z = Carbobenzoxy, DCCI = Dicyclohexylcarbodiimid.

gleichen Größenordnung, bei der 2-Glycylamino-Verbindung steigt sie auf Grund einer dritten polaren Gruppe im Molekül stark an (Tab. 1).

Substanz	Löslichkeit (gSubstanz/100ml Wasser, 18° C)
Phenanthrenhydrochinon- Ester	1,15
2-Nitrophenanthrenhydr.- Ester	2,14
2-Glycylaminophenanthr.- Ester	etwa 30

Tab. 1. Löslichkeit der Esterhydrobromide in Wasser.

Die wäßrigen Lösungen der Ester unterliegen der Hydrolyse und in Gegenwart von Luftsauerstoff der Autoxydation zu den entsprechenden Chinonen. Der Verlauf der Hydrolyse kann durch Messung der Extinktionsänderung beim Absorptionsmaximum der Chinone (bei 430 $m\mu$) verfolgt werden.

Abb. 1 zeigt den Verlauf der Hydrolyse des am Phenanthrenhydrochinon unsubstituierten Esters in einem Wasser – Alkoholgemisch (7/3). Ein entsprechendes Diagramm erhält man bei der Hydrolyse des 2-Nitro-Esters, während die 2-Glycylamino-

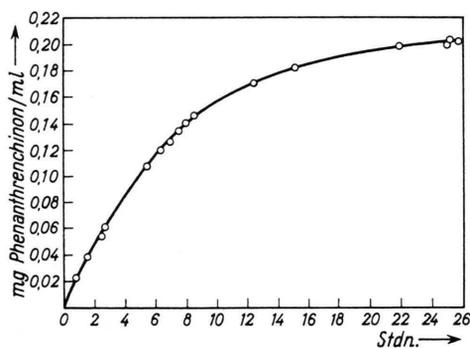


Abb. 1. Hydrolyse des unsubstituierten Glycol esterhydrobromids in Wasser – Alkohol 7/3. Zur Bestimmung des Phenanthrenchinons wurde die Extinktion bei 430 $m\mu$ gemessen. Anfangskonzentration an Esterhydrobromid 0,49 mg/ml; 20° C.

Verbindung auch nach tagelangem Stehen unter diesen Bedingungen nur in sehr geringem Grade hydrolysiert wird. In saurer Lösung sind alle drei Ester bei Zimmertemperatur für lange Zeit stabil.

* Rinderplasma, welches 0,05-m. Citrat enthielt wurde 10 Min. auf 57° C erhitzt und dann mit der Glaselektrode auf pH 7,4 eingestellt.

⁸ BEILSTEIN, Handbuch d. präp. org. Chemie Bd. VII, S. 796, nach GRAEBE, Liebigs Ann. Chem. 167, 140.

Bei den therapeutischen Versuchen am Jensen-Sarkom wurden die Ester intravenös injiziert. Es war deshalb von Interesse, die Hydrolyse bei pH 7,4 in Blutplasma zu untersuchen. Abb. 2 zeigt den Verlauf der Hydrolyse des unsubstituierten Esters in Citrat-Plasma*. Die Halbwertszeit der Hydrolyse beträgt unter diesen Bedingungen etwa 3 Minuten.

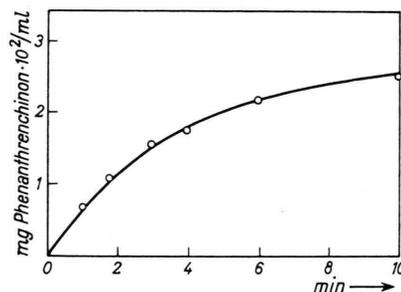


Abb. 2. Hydrolyse des unsubstituierten Glycol esterhydrobromids in Citrat-Plasma aus Rinderblut. Anfangskonzentration an Esterhydrobromid 0,063 mg/ml; 20° C.

Beschreibung der Versuche

Phenanthrenchinon wird aus Phenanthren durch Chromsäureoxydation gewonnen und gereinigt, bis der Schmelzpunkt 204–205° beträgt⁸. 2-Nitrophenanthrenchinon erhält man durch Nitrierung von Phenanthrenchinon mit 65-proz. Salpetersäure⁹. Das gleichzeitig gebildete 4-Isomere wird durch Extraktion mit Äthanol entfernt. Nach Umkristallisation des Rückstandes aus Chlorbenzol erhält man reines 2-Nitrophenanthrenchinon vom Schmp. 265° C. 2-Aminophenanthrenchinon erhält man durch Reduktion der 2-Nitroverbindung mit Dithionit in der Wärme¹⁰.

Die Reduktion von Phenanthrenchinon und 2-Aminophenanthrenchinon zu den entsprechenden Hydrochinonen wird folgendermaßen durchgeführt: Man tropft zu der warmen alkoholischen Lösung des Chinons solange konzentrierte Dithionit-Lösung zu, bis die Chinonfarbe verschwindet, setzt dann unter Überleiten von Stickstoff ausgekochtes Wasser zu und läßt unter Luftabschluß in der Kälte auskristallisieren.

Die Reduktion des 2-Nitrophenanthrenchinons muß in der Kälte durchgeführt werden, um die Reduktion der Nitrogruppe zu vermeiden: 2 g 2-Nitrophenanthrenchinon werden in 20 ml Äther suspendiert und mit einer Lösung von 6 g Na-Dithionit in 15 ml Wasser geschüttelt. Nach etwa 5 Min. haben sich alle festen Bestandteile gelöst, die ätherische Schicht zeigt eine

⁹ SH. KATO, M. MAEZAWA, SH. HIRANO u. SH. ISHIGAKI, J. Soc. org. synth. Chem. Japan 15, 29 [1957].

¹⁰ K. BRASS u. E. FERBER, Ber. dtsh. chem. Ges. 55, 541 [1922].

orangerote Färbung. Die Ätherschicht wird einmal mit verdünnter Dithionitlösung, einmal mit ausgekochtem Wasser gewaschen und in das dreifache Volumen Petroläther (Siedebereich (50°–70°) eingegossen. Das gelb gefärbte Produkt wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

9.10-Bis-[N-benzyloxycarbonyl-glycyloxy]-phenanthren

1,02 g Phenanthrenhydrochinon werden in 15 ml peroxydfreiem Tetrahydrofuran (durch Kochen am Rückfluß über KOH und über Na gereinigt) unter Überleiten von Stickstoff gelöst. Nach Zugabe von 2,05 g Z-Glycin in 20 ml sowie von 2,3 g DCCI in 15 ml Tetrahydrofuran und kurzem Schütteln des verschlossenen Kolbens beginnt die Abscheidung von Dicyclohexylharnstoff. Nach 3–4 Stdn. Stehen bei Zimmertemperatur wird der kristalline Harnstoff abgesaugt und mit wenig Tetrahydrofuran nachgewaschen. Die vereinigten Tetrahydrofuran-Lösungen werden im Vakuum bei 30° zur Trockne eingedampft. Der wachsartige Rückstand wird in 30 ml Eisessig warm gelöst, filtriert und der Z-Ester durch langsame Zugabe von Wasser unter kräftigem Umschütteln gefällt. Der Niederschlag wird im Vakuum über Kieselgel getrocknet. Man erhält 2,3 g Ester als weißes Pulver vom Schmelzpunkt 207–209°. Alle drei Z-Ester beginnen sich kurz oberhalb ihrer Schmelzpunkte zu zersetzen.

$C_{32}H_{24}O_8N_2$ (564,5)

Ber. C 69,0 H 4,73 N 4,73,
Gef. C 68,2 H 4,79 N 4,80.

9.10-Bis-glycyloxy-phenanthren-bis-hydrobromid

1 g des Z-Esters wird mit 12 ml 1-n. HBr/Eisessig langsam im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Nach einer halben Stde. hat sich der Z-Ester fast vollständig gelöst, und das gebildete Esterhydrobromid beginnt sich nun abzuschleiden. Das Gemisch wird abgekühlt, mit dem 6-fachen Volumen wasserfreien Äthers versetzt, schnell abgesaugt und mehrere Male mit abs. Äthanol und Äther gewaschen. Das so gewonnene Rohprodukt (1,35 g) wird in 40 ml warmem Eisessig aufgenommen (etwa 50°C) und soviel Wasser zugesetzt, daß es sich eben löst. Aus dieser Lösung wird das Esterhydrobromid durch Zugabe von 300 ml Äther als flockiger Niederschlag erhalten. Nach mehrmaligem Waschen mit Äther wird im Vakuum über Kieselgel getrocknet. Ausbeute 950 mg (50% d. Theorie bezogen auf das Hydrochinon).

$C_{18}H_{18}O_4N_2Br_2$ (486,2)

Ber. C 44,4 H 3,73 N 5,76 Br 32,9,
Gef. C 42,8 H 3,83 N 5,80 Br 31,5.

2-Nitro-9.10-bis-[N-benzyloxycarbonyl-glycyloxy]-phenanthren

1,25 g 2-Nitrophenanthrenhydrochinon, 2,05 g Z-Glycin und 2,3 g DCCI werden, wie beim unsubstituierten Ester beschrieben, zusammengegeben. Die Aufarbeitung erfolgt wie oben. Gelbe Nadeln, Schmp. 217°–219°C.

$C_{32}H_{23}O_{10}N_3$ (609,5)

Ber. C 64,0 H 4,27 N 6,61,
Gef. C 64,1 H 4,30 N 6,90.

2-Nitro-9.10-bis-glycyloxy-phenanthren-bis-hydrobromid

Die Abspaltung der Z-Gruppe erfolgte wie beim unsubstituierten Ester beschrieben. Die Gesamtausbeute ist etwas geringer als dort (ca. 40%).

$C_{18}H_{17}O_6N_3Br_2$ (531,2)

Ber. C 40,7 H 3,23 N 7,91 Br 30,1,
Gef. C 39,5 H 3,23 N 7,61 Br 30,9.

2-Glycylamino-9.10-bis-[N-benzyloxycarbonyl-glycyloxy]-phenanthren

2,0 g 2-Aminophenanthrenhydrochinon werden unter Stickstoff in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst. Lösungen von 5,5 g DCCI in 20 ml und 5,4 g Z-Glycin in 30 ml Tetrahydrofuran werden zugefügt. Das Gemisch steht unter Stickstoff 4 Stdn. bei Zimmertemperatur. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie oben. Ziegelrote Nadeln (mikroskopisch) Schmp. 237°–239°C.

$C_{41}H_{32}O_{11}N_4$ (756,7)

Ber. C 66,2 H 4,79 N 7,02,
Gef. C 66,2 H 4,79 N 7,29.

2-Glycylamino-9.10-bis-glycyloxy-phenanthren-tris-hydrobromid

Die Abspaltung der Z-Gruppe erfolgt wie oben beschrieben. Die Gesamtausbeute ist dieselbe wie beim unsubstituierten Ester. Dieses Produkt enthält 0,97% Acetyl, da offenbar bei der Abspaltung der Z-Gruppen ein kleiner Teil der Glycylgruppen durch Acetylgruppen ersetzt worden ist. Durch Lösen in Eisessig und fraktionierte Fällung mit Äther erhält man das reine Produkt.

$C_{20}H_{23}O_5N_4Br_3$ (639,2)

Ber. C 37,6 H 3,62 N 8,76 Br 37,50,
Gef. C 39,1 H 4,12 N 8,33 Br 38,30.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für finanzielle Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.