

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **214249**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **382801**

(22) Data zgłoszenia: **29.06.2007**

(51) Int.Cl.

C07D 249/08 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

(54)

Nowe pochodne triazoli, sposób ich otrzymywania oraz ich zastosowanie

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

05.01.2009 BUP 01/09

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.07.2013 WUP 07/13

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET WROCŁAWSKI, Wrocław, PL
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ POLSKA AKADEMIA
NAUK, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MACIEJ BARYS, Wrocław, PL
ZBIGNIEW CIUNIK, Wrocław, PL
KRZYSZTOF DRABENT, Wrocław, PL
BOGUMIŁA SZPONAR, Wrocław, PL
ANDRZEJ GAMIAN, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek

PL 214249 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy nowych związków chemicznych - chiralnych pochodnych triazolu, sposobu ich otrzymywania oraz ich zastosowania.

Nowe pochodne są związkami powstałymi w wyniku reakcji 4-amino-1,2,4-triazolu z nitropochodnymi benzaldehydów. Związki takie nie zostały dotychczas opisane w literaturze. Pochodne te charakteryzują się korzystnie tym, że posiadają centra chiralne. Dzięki ich właściwościom strukturalnym znajdują one zastosowanie jako substancje aktywne leków zapobiegających i stosowanych w leczeniu infekcji wywołanych obecnością grzybów lub bakterii.

Znana jest budowa i właściwości triazoli. 1,2,4-triazole i ich pochodne od wielu lat stanowią atrakcyjny materiał badawczy dla chemików. Znane są zdolności triazoli do tworzenia różnorodnych kompleksów metali przejściowych, ze względu na unikalne własności koordynacyjne, typowe dla grupy związków pirazolowych, i wynikające z obecności atomów azotu w pierścieniu, charakterystyczne dla związków imidazolowych. Ponadto posiadają inną typową dla tej grupy właściwość - są doskonałymi ligandami mostkującymi jony metali, wykazując olbrzymią różnorodność koordynacyjną, spotęgowaną przyłączeniem do rdzenia triazolowego dodatkowych grup donorowych. Ta cecha, wraz z silnymi właściwościami σ donorowymi oraz relatywnie łatwą syntezą kolejnych pochodnych powodują, że triazole nadają się do projektowania wielojądrowych kompleksów metali, które mogą wykazywać różne ciekawe właściwości. W opisie patentowym nr PL 146 491 omówiono sposób wytwarzania pochodnych 3,5-dwuamino-1,2,4-triazolu.

Triazole mają szerokie zastosowanie w przemyśle. Już w 1960 roku Potts [1] zauważył, że kompleks srebra z triazolem można wykorzystać w przemyśle fotograficznym. Triazole posiadają geometrię zbliżoną do imidazoli, których pochodne są wszechobecne w przyrodzie, gdyż stanowią jeden ze składników kompleksów białek i kwasów nukleinowych. Jest to druga właściwość, która spowodowała, że triazole i ich kompleksy z metalami są badane pod kątem naśladowania imidazoli w naturalnych procesach zachodzących w żywych organizmach [2]. Badane są również możliwości zastąpienia ligandów pirazolowych przez triazole np. w tripirazoloborach [3]. 1,2,4-Triazole mają szerokie zastosowanie w rolnictwie i przemyśle farmaceutycznym, co jest właśnie związane z podobną geometrią i właściwościami koordynacyjnymi.

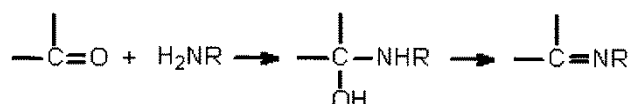
W ostatnich kilkudziesięciu latach obserwuje się zainteresowanie pochodnymi triazoli o właściwościach terapeutycznych. Dzięki właściwościom ochronnym oraz leczniczym w różnych infekcjach grzybiczych pochodne triazoli stanowią jedną z najważniejszych grup związków grzybobójczych [4]. Związane jest to z działaniem na błonę komórki grzybowej przez inhibicję 14- α -demetylazy, enzymu cytochromu P-450. Znane są również doniesienia o przeciwpalniczych, przeciwbakteryjnych, przeciwnowotworowych i diuretycznych [6-8] właściwościach triazoli. Przeciwbakteryjne działanie pochodnych triazoli opisano również w publikacjach zgłoszeń patentowych, np. US 2005/0113347 czy US 2006/0270628. W patentach US nr 4,251,512, nr 4,147,791, nr 4,038,406 i nr 4,048,318 ujawniono związki i kompozycje przeciwgrzybicze o synergistycznym działaniu zawierające pochodne triazolu. Podobnie w publikacji zgłoszenia międzynarodowego WO 2006/109933 przedstawiono zastosowanie w terapii związków na bazie triazoli, ich soli i kompozycji farmaceutycznych o aktywności przeciwgrzybiczej. W publikacji W003/065807 omówiono zastosowanie alkoksylowanych amin do wzmacniania aktywności preparatów grzybobójczych zawierających grzybobójcze triazole. Wynalazek ten odnosi się on także do preparatów zawierających jeden lub więcej grzybobójczych triazoli i alkoksylowanych amin. Preparaty takie są użyteczne do zabezpieczania jakiegokolwiek żywego lub martwego materiału, takiego jak plony, rośliny, owoce, nasiona, przedmioty wykonane z drewna, strzechy lub temu podobne, materiału ulegającego biodegradacji oraz tkanin, przed zniszczeniem w wyniku działania grzybów.

Od pewnego czasu zasady Schiffa zawierające ugrupowanie triazolowe oraz różne pochodne benzaldehydowe przykuwają uwagę wielu naukowców swoimi właściwościami biologicznymi. Związki te były badane pod kątem właściwości przeciwpalniczych, przeciwgrzybiczych oraz przeciwbakteryjnych [12,13].

Dotychczas otrzymywane związki chemiczne, powstające w wyniku reakcji amin z aldehydami, reagowały ze sobą tworząc iminy (zasady Schaffa). Niezwykle istotne wydaje się więc poznanie budowy i podstawowych właściwości biochemicznych takich substancji.

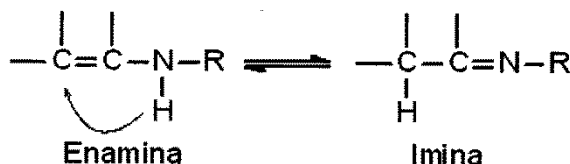
Zasady Schiffa, czyli związki zawierające grupę iminową ($-RC=N-$), są to związki organiczne powstałe w wyniku kondensacji cząsteczki związku karbonylowego (aldehydu lub ketonu) z cząsteczką aminy pierwszorzędowej (RNH_2).

Aminy pierwszo- i drugorzędowe reagując z aldehydami i ketonami tworzą iminy:



Reakcja polega na addycji nukleofilowej aminy, a następnie eliminacji cząsteczki wody. Katalizatory kwasowe ułatwiają zajście reakcji, ale zbyt duża ilość kwasu przeszkadza jej z powodu protonowania aminy.

W przypadku, gdy wyjściowy związek karbonylowy zawiera w cząsteczce atom wodoru a w pierwszym etapie tworzy się najpierw enamina, która następnie ulega szybkiej tautomerizacji do iminy:



Zjawisko tautomerii iminowo-enaminowej powoduje, że iminy zachowują się w wielu reakcjach tak jakby były aminami, co powszechnie wykorzystuje się w syntezie organicznej. Innym zastosowaniem imin jest traktowanie ich jako wygodnej formy "transportowej" dla amin pierwszorzędowych, gdyż można je przeprowadzić w te aminy poprzez prostą redukcję, zaś same iminy są trwalsze i mniej reaktywne od amin pierwszorzędowych [9]. Nazwa pochodzi od ich wynalazcy - Hugo Schiffa, który opisał je jako pierwszy w 1864 roku. Reakcja powstawania imin jest odwracalna, przechodzi przez różne pośrednie etapy, w tym tworzenie karbinolaminy, która wymaga odłączenia cząsteczki wody.

Zasady Schiffa odegrały znaczącą rolę w rozwoju chemii koordynacyjnej, gdyż umożliwiały tworzenie trwałych kompleksów z większością metali przejściowych. Odegrały również znaczącą rolę w dziedzinie chemii bioinorganicznej. Szczególnie kompleksy metali z zasadami Schiffa pozwoliły na badanie syntetycznych modeli występujących naturalnie w częściach zawierających metale w enzymach i metaloproteinach. Wiele zasad Schiffa posiada liczne właściwości przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i przeciwtoksyczne [10], a wymiana lub wprowadzenie nowych podstawników często dodatkowo je wzmacnia [11]. Od pewnego czasu zasady Schiffa zawierające ugrupowanie triazolowe oraz różne pochodne benzaldehydowe przykuwają uwagę wielu naukowców swoimi właściwościami biologicznymi. Związki te były badane pod kątem właściwości przeciwzapalnych, przeciwgrzybiczych oraz przeciwbakteryjnych [12,13].

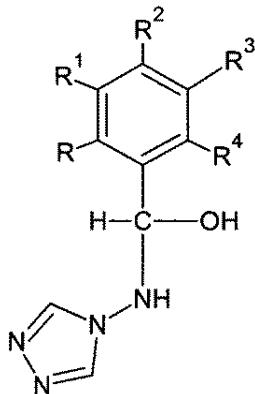
Otrzymano do tej pory wiele zasad Schiffa, w których częścią aminową była cząsteczka 4-amino-1,2,4-triazolu, a część aldehydową stanowiły różne pochodne benzaldehydów [14-16]. Jednakże, we wszystkich opisanych do tej pory w literaturze przypadkach w wyniku reakcji kondensacji powstawały płaskie zasady Schiffa.

Nieoczekiwane okazało się jednak zastosowanie nitropochodnych benzaldehydów wraz z cząsteczką 4-amino-1,2,4-triazolu.

Istotą wynalazku są zatem związki powstałe w wyniku reakcji 4-amino-1,2,4-triazolu z nitropochodnymi benzaldehydów.

W wyniku takiej reakcji otrzymujemy związki, w których tworzą się dwa centra chiralne, niezwykle interesujące z punktu widzenia warunkowanych nimi właściwości chemicznych i biologicznych.

Przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze:



gdzie:

R oznacza: NO₂, Cl albo H,

R1 oznacza: NO₂, Cl, H,

R2 oznacza: NO₂, H,

R3 oznacza: NO₂, Cl, H,

R4 oznacza: NO₂, Cl, H,

Korzystnie nowa pochodna 4-amino-1,2,4-triazolu z 2,4-dinitrobenzaldehydem według wynalazku została wybrana spośród związków o wzorach 1 do 5.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych pochodnych triazoli według wynalazku charakteryzujący się tym, że nitrobenzaldehyd poddaje się reakcji z 4-amino-1,2,4-triazolem, w równomolowych ilościach obu substancji rozpuszczonych w rozpuszczalniku, a następnie przeprowadza się wyodrębnienie otrzymanych związków.

Korzystnie uzyskane związki wyodrębnia się poprzez krystalizację. Równie korzystnie rozpuszczalnikiem zastosowanym w reakcji otrzymywania nowych pochodnych triazolu jest rozpuszczalnik organiczny, taki jak metanol, etanol, acetonitryl, propanol, izopropanol, DMF, DMSO, butanol, aceton, fenol i eter dietylowy. Zgodnie z korzystną realizacją wynalazku otrzymywane są aktywne biologicznie mieszaniny racemiczne chiralnych pochodnych triazolu lub ich czyste izomery.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie nowych pochodnych triazolu określonych powyżej do wytwarzania leku przeznaczonego do zapobiegania i/lub leczenia infekcji wywołanych bakteriami i grzybami. Korzystnie lek wytwarzany jest w postaci maści, żelu, tabletki, kapsułki, proszku, granulek, syropu, zastrzyku lub czopków.

Do tej pory otrzymywane zasady Schifffa na bazie podobnych związków wykazywały ciekawe właściwości biologiczne. Również triazole posiadają szerokie spektrum właściwości biologicznych.

Patrząc więc przez pryzmat chiralności nowych związków okazuje się, że otrzymano związki, które zbudowane są nie tylko z części aktywnych biologicznie (tj. pierścień triazolowy) lecz również nieoczekiwanie uzyskano dodatkowe dwa miejsca aktywne, które potęgują znaczenie i właściwości biologiczne. Najistotniejsze w tej reakcji wydaje się być połączenie właściwości części aminowej oraz aldehydowej.

Znane są związki, w których zastosowano podobną parę związków, ale zawsze ich otrzymanie wynikało z modyfikacji pierścienia triazolowego [17,18]. Pokazuje to jak subtelna zmiana może doprowadzić do niespotykanych i nieznanych do tej pory efektów w postaci tworzenia się dwóch centrów chiralnych. W obu przypadkach [17,18] powstały zasady Schifffa pomimo obecności grupy nitrowej w pierścieniu benzaldehydu. Związane było to z zastosowaniem cząsteczki triazolu podstawionej w pozycjach 3 oraz 5 przez inne podstawniki niż wodór. Również znany jest związek, w którym zastosowano jako aldehyd 2,4-dinitrobenzaldehyd, a jako aminę wybrano anilinę [19]. Również w tym przypadku powstała zasada Schifffa.

W przedmiotowym wynalazku wykazano, że szczególne połączenie właściwości pierścieni triazolowego oraz benzaldehydowego prowadzi do powstania niezwykle oryginalnych i interesujących pod względem ich właściwości związków.

W wyniku reakcji nitropochodnych benzaldehydów, takich jak na przykład 2-nitrobenzaldehyd, 3-nitrobenzaldehyd, 4-nitrobenzaldehyd, 2,4-dinitrobenzaldehyd, 2-chloro-6-nitrobenzaldehyd, z cząsteczką 4-amino-1,2,4-triazolu otrzymano nowe związki triazoli nieoczekiwanie i korzystnie charakteryzujące się centrami chiralnymi na atomie węgla oraz atomie azotu.

Związki te powstają na drodze syntezy prowadzonej w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak na przykład acetonitryl, etanol, metanol, izopropanol. W syntezie stosowane są równomolowe ilości nitropochodnej benzaldehydu oraz triazolu.

Nowe związki według wynalazku znajdują zastosowanie do wytwarzania leku przeznaczonego do zapobiegania i/lub leczenia infekcji wywołanych bakteriami i grzybami. Lek taki wytwarzany jest w postaci maści, żelu, tabletki, kapsułki, proszku, granulek, syropu, zastrzyku lub czopków.

Dla lepszego zilustrowania wynalazku jego opis został uzupełniony figurami.

Figura 1 prezentuje aktywność 2,4dnbald wobec bakterii w zależności od stężenia związku.

Figura 2 prezentuje aktywność 2nbald wobec bakterii w zależności od stężenia związku.

Figura 3 prezentuje aktywność 3nbald wobec bakterii w zależności od stężenia związku.

Figura 4 prezentuje aktywność 4nbald wobec bakterii w zależności od stężenia związku.

Figura 5 prezentuje aktywność badanych związków wobec *Candida albicans*

Dodatkowo, niniejszy wynalazek zilustrowano poniższymi przykładami.

Przykład 1. Chiralne związki triazoli

W wyniku reakcji nitropochodnych benzaldehydów (2-nitrobenzaldehyd, 3-nitrobenzaldehyd, 4-nitrobenzaldehyd, 2,4-dinitrobenzaldehyd, 2-chloro-6-nitrobenzaldehyd) z cząsteczką 4-amino-1,2,4-triazolu powstają nowe związki z centrami chiralnymi na atomie węgla oraz atomie azotu.

Przykład 2. Synteza chiralnych pochodnych triazolu

2.1. Ogólne zasady syntezy

Syntezy prowadzone są w rozpuszczalnikach organicznych, tj. w acetonitrylu, etanolu, metanolu i izopropanolu. Reakcja przebiega w temperaturze otoczenia (20-25°C) przez około 30 minut, a następnie roztwór odstawiany jest do krystalizacji przez odparowanie rozpuszczalnika.

2.2. Synteza wybranych pochodnych

2.2.1. Synteza pochodnej 2,4-dinitrobenzaldehydu z 4-amino-1,2,4-triazolem.

Syntezę prowadzono w następujący sposób: odważano równomolowe ilości 4-amino-1,2,4-triazolu (0,1 mol) oraz 2,4-dinitrobenzaldehydu (0,1 mol). Całość następnie przesypywano do naczynka o pojemności 100 ml i dodawano jednego z rozpuszczalników organicznych wymienionych w punkcie 2.1. Po rozpuszczeniu związków roztwór był mieszany przez około 30 min na mieszadle magnetycznym. Po tym procesie odstawiano otrzymany roztwór, w naczynku krystalizacyjnym, do krystalizacji badanego związku przez odparowanie rozpuszczalnika. Po procesie krystalizacji otrzymany związek przesączano na lejek Buchnera pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem.

2.2.2. Synteza pochodnej 2-nitrobenzaldehydu z 4-amino-1,2,4-triazolem.

Synteza tego związku była analogiczna do syntezy opisanej w punkcie 2.2.1. Wykorzystano w tym celu pochodną 2-nitrobenzaldehydu oraz 4-amino-1,2,4-triazol (w stosunku molowym 1:1). Pozostałe procedury syntezy i krystalizacji były identyczne jak we wcześniej opisanym przypadku 2,4-dinitrobenzaldehydu.

2.2.3. Synteza pochodnej 3-nitrobenzaldehydu z 4-amino-1,2,4-triazolem.

Synteza tego związku była analogiczna do syntezy opisanej w punkcie 2.2.1. Wykorzystano w tym celu pochodną 3-nitrobenzaldehydu oraz 4-amino-1,2,4-triazol (w stosunku molowym 1:1). Pozostałe procedury syntezy i krystalizacji były identyczne jak we wcześniej opisanym przypadku 2,4-dinitrobenzaldehydu.

2.2.4. Synteza pochodnej 4-nitrobenzaldehydu z 4-amino-1,2,4-triazolem.

Synteza tego związku była analogiczna do syntezy opisanej w punkcie 2.2.1. Wykorzystano w tym celu pochodną 4-nitrobenzaldehydu oraz 4-amino-1,2,4-triazol (w stosunku molowym 1:1). Pozostałe procedury syntezy i krystalizacji były identyczne jak we wcześniej opisanym przypadku 2,4-dinitrobenzaldehydu.

2.2.5. Synteza pochodnej 2-chloro-6-nitrobenzaldehydu z 4-amino-1,2,4-triazolem.

Synteza tego związku była analogiczna do syntezy opisanej w punkcie 2.2.1. Wykorzystano w tym celu pochodną 2-chloro-6-nitrobenzaldehydu oraz 4-amino-1,2,4-triazol (w stosunku molowym 1:1). Pozostałe procedury syntezy i krystalizacji były identyczne jak we wcześniej opisanym przypadku 2,4-dinitrobenzaldehydu.

2.3. Krystalizacja.

W zależności od zastosowanej pochodnej benzaldehydu oraz warunków krystalizacja następuje po kilkudziesięciu minutach lub kilku dniach. Powstają związki, z wydajnością powyżej 90%, w postaci monokryształów poddawanych następnie analizie za pomocą promieniowania rentgenowskiego.

2.4. Analiza rentgenograficzna.

Analiza umożliwia poznanie struktury molekularnej badanych układów. W badaniach wykorzystano promieniowanie rentgenowskie.

Pomiary dla badanych związków przeprowadzono w temp 100(2) K przy użyciu dyfraktometru Kuma KM4CCD, stosując promieniowanie MoK_{α} i przystawkę niskotemperaturową firmy Oxford Cryo-systems. Wszystkie struktury rozwiązano metodami bezpośrednimi stosując programy G. M. Sheldricka (Shelxs97). Struktury udokładniano pełnomacierzowo stosując program Shelxl97. Atomy wodoru wstawiano na podstawie znajomości geometrii cząsteczek lub lokalizowano ich położenia na mapach różnicowych gęstości elektronowej. Atomy cięższe od wodoru udokładniano anizotropowo.

2.5. Właściwości strukturalne nowych związków. W wyniku syntezy otrzymano następujące struktury pochodnych nitrobenzaldehydów z 4-amino-1,2,4-triazolami. Określono ich budowę za pomocą badań rentgenograficznych.

Budowę chemiczną nowych związków odzwierciedlają wyniki zawarte w tabeli 1 oraz poniżej przedstawione wzory (1-5).

T a b e l a 1
Podstawowe dane z analizy rentgenograficznej dla nowych związków

	2,4dnbald (1a)	2nbald (1b)	3nbald (1c)	4nbald (1d)
Kryształ Wzór sumaryczny	C ₉ H ₈ N ₆ O ₅	2(C ₉ H ₉ N ₅ O ₃)	C ₉ H ₉ N ₅ O ₃	2(C ₉ H ₉ N ₅ O ₃)
Masa molowa (g mol ⁻¹)	280.21	470.42	235.21	235.21
Układ kryst., grupa	Rombowy, Pccn	Trójskośny, P-1	Jednoskośny,	Jednoskośny, Cc
a (Å)	14.202 (2)	8.892 (3)	12.316 (3)	6.963 (3)
b (Å)	14.267 (2)	10.436 (2)	10.616 (2)	20.581 (2)
c (Å)	11.223 (3)	11.591 (2)	7.863 (2)	7.377 (4)
β (°)		74.733 (3)	92.393 (5)	93.473 (3)
V (Å ³)	2274.1(3)	1037.66(2)	1027.12(2)	1055.11(2)

Przykład 3. Właściwości biologiczne nowych związków

Właściwości biologiczne pochodnych nitrobenzaldehydów z 4-amino-1,2,4-triazolem-aktywność bakteriobójcza.

Do określenia tej aktywności bakteriobójczej badanych związków wykorzystano test MABA (Microplate Alamar Blue® Assay), w którym wykorzystywany jest barwnik fluorescencyjny Alamar Blue® jako znacznik żywych komórek bakteryjnych. Metoda jest rutynowo stosowana w badaniach aktywności nowych leków, cytotoksyczności związków z różnych klas chemicznych, w monitorowaniu namnażania komórek ludzkich, zwierzęcych, bakteryjnych i grzybów.

Test Microplate Alamar Blue® Assay (MABA). Test prowadzono na jałowych płytkach do hodowli komórkowych. Kolejne stężenia związku uzyskano poprzez rozcieńczanie (w szeregu geometrycznym) podłożem hodowlanym, właściwym dla danych bakterii. Do tak przygotowanego materiału dodawano zawiesinę bakteryjną o określonej gęstości optycznej. Sporządzono kontrole negatywne „no growth” oraz pozytywne „growth”; zabezpieczone przed parowaniem płytki poddawano inkubacji w warunkach odpowiednich dla danej bakterii. W ostatnim etapie utworzone kompleksy komórka bakteryjna - badany związek poddawano znakowaniu z użyciem barwnika. Komórki wykazujące aktywność metaboliczną doprowadzają do chemicznej redukcji barwnika. Poziom redukcji Alamar Blue®, świadczący o ilości pozostałych przy użyciu komórek bakteryjnych, mierzony jest przy użyciu fluorymetru. Minimalne stężenie hamujące (MIC, Minimal Inhibitory Concentration) oznaczono przez obliczenie zahamowania wzrostu bakterii (w procentach) po wykreśleniu krzywych hamowania.

Badano następujące nitropochodne benzaldehydów z 4-amino-1,2,4-triazolem: 2,4-dinitrobenzaldehyd, 2-nitrobenzaldehyd, 3-nitrobenzaldehyd, 4-nitrobenzaldehyd. Dodatkowo zbadano właściwości 4-amino-1,2,4-triazol zastosowanego następnie jako kontrola wobec nowych związków. Każdy związek badano dwukrotnie. 4-amino-1,2,4-triazol został przebadany w celu sprawdzenia właściwości bakterio- i grzybobójczych samej aminy. Pozwoliło to ocenić jaki wpływ może mieć ewentualnie sam triazol i czy aktywność biologiczna wynika z faktu, że badana substancja jest bakteriobójcza ponieważ jest w niej 4-amino-1,2,4-triazol czy też są to właściwości wynikające z takiego połączenia cząsteczki aminowej oraz aldehydowej.

W badaniach wykorzystane zostały szczepy bakteryjne z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu: *Klebsiella pneumoniae* PCM 57, *Staphylococcus aureus* PCM 2602, *Escherichia coli* PCM 1144, *Pseudomonas aeruginosa* PCM 2058, *Candida albicans* PCM 2560.

Odczynniki i materiały do testu MABA.

- a) barwnik Alamar Blue® (Biosource, USA) - (nazwa chemiczna i wzór objęte patentem)
- był stosowany jako znacznik bakterii do pomiaru fluorescencji,
- b) dimetylosulfotlenek (DMSO, Merck) - rozpuszczalnik dla badanych związków,
- c) jałowa woda miliQ.

Podłoże do hodowli bakterii. Stosowano podłoże płynne - standardowy bulion odżywczy (Difco).

Hodowla bakterii. Bakterie przechowywane na skosie agarowym (inoculum - pasaż 3), każdorazowo przesiewano na podłoże płynne i hodowano przez 24 godz. w temp 37°C. Prowadzono pomiar

gęstości optycznej zawiesiny bakterii przy długości fali 550 nm. W celu ujednolicenia pomiaru zawiesinę (w razie potrzeby) rozcieńczano do wartości absorbancji 0,3.

Przygotowanie związków do oznaczenia aktywności bakteriobójczej przy użyciu testu MABA

Związki o naważce 10 mg były rozpuszczane w 100 μ l DMSO, a następnie rozcieńczane do objętości 10 ml wodą miliQ (1 mg/ml). 4-amino-1,2,4-triazol został rozpuszczony w miliQ (1 mg/ml).

Badane związki były rozcieńczane w postępie geometrycznym w podłożu bakterierym na jałowej 96-studzienkowej płytce do hodowli komórkowych (Nunc), początkowe stężenie 1 mg/1 ml, następnie 0,5 mg/1 ml, 0,25 mg/1 ml itd. W tym celu nanoszono do wszystkich studzienek (za wyjątkiem pierwszej) po 100 μ l 1 wody miliQ, następnie do pierwszej w szeregu naniesiono 200 μ l badanego związku. Pobierano po 100 μ l i przenoszono 20 (rozcieńczając) do kolejnych studzienek.

Kontrole dla testu stanowiły:

- jałowe podłoże hodowlane (200 μ l),
- podłoże hodowlane (100 μ l) + zawiesina bakterii (100 μ l),
- nierozcieńczona zawiesina bakterii (200 μ l),
- woda miliQ (100 μ l) + zawiesina bakterii (100 μ l).

Procedura laboratoryjna

Na płytkę z szeregami rozcieńczeń badanych związków nanoszono zawiesinę bakterii i inkubowano w 37°C przez 24 godz. Kompleks komórka bakterieryna - badany związek znakowany był następnie barwnikiem Alamar Blue® (20 μ l) i reinkubowany przez 2 godz. Poziom fluorescencji, której źródłem był barwnik pochłonięty przez pozostałe przy życiu komórki bakteryjne, był odczytywany przy użyciu czytnika Victor² (Wallac, Perkin Elmer), przy długości fali 540 - 590 nm (wzbudzenia-emisji).

Aktywność bakteriobójcza

Działanie hamujące wzrost bakterii związków określano za pomocą MIC (Minimal Inhibitory Concentration - minimalne stężenie hamujące), czyli najniższe stężenie [μ g/ml], przy którym wystąpiło hamowanie wzrostu bakterii.

Wyniki zgromadzono poniżej.

T a b e l a 2

Zestawienie wyników badań dotyczących właściwości bakteriobójczych nowych związków.

MIC [mg/ml]	2,4dnbald	2nbald	3nbald	4nbald
<i>E. coli</i>	0.25	0.5	0.5	1
<i>K. pneumoniae</i>	0.5	0	0	0.25
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Staph, aureus</i>	0.125	0	0	0

Aktywność bakteriobójcza związku otrzymanego z pochodnej 2,4-dinitrobenzaldehydu oraz 4-amino-1,2,4-triazolu (2,4dnbald)

Zaobserwowano hamowanie wzrostu wszystkich badanych bakterii. Najskuteczniejsze działanie wykazano w stosunku do *Staphylococcus aureus* (MIC 125 μ g/ml), następnie do *Escherichia coli* (MIC 250 μ g/ml) i *Klebsiella pneumoniae* (MIC 500 μ g/ml). Wynik świadczy o znacznym potencjale bakteriobójczym, zarówno w stosunku do bakterii Gram- dodatnich, jak i Gram-ujemnych (patrz fig. 1).

Aktywność bakteriobójcza związku otrzymanego z pochodnej 2-nitrobenzaldehydu oraz 4-amino-1,2,4-triazolu (2nbald)

Zaobserwowano działanie hamujące wzrost *E. coli* w stężeniu 1 mg/ml.

Bakteriobójcza aktywność 2nbald jest znikoma (patrz fig. 2).

Aktywność bakteriobójcza związku otrzymanego z pochodnej 3-nitrobenzaldehydu oraz 4-amino-1,2,4-triazolu (3nbald)

Podobnie jak w przypadku związku 2nbald, obserwuje się jedynie zahamowanie wzrostu *E. coli*, przy minimalnym stężeniu potrzebnym do zahamowania wzrostu 0.5 mg/ml. W stosunku do pozostałych bakterii nie obserwuje się aktywności przeciwbakteryjnej (patrz fig. 3).

Aktywność bakteriobójcza związku otrzymanego z pochodnej 4-nitrobenzaldehydu oraz 4-amino-1,2,4-triazolu (4nbald)

Zauważyć można działanie hamujące wzrost bakterii *Klebsiella pneumoniae* (MIC 0.25 mg/ml) oraz - jak w przypadku 2nbald - wobec *E. coli* w maksymalnym stężeniu (patrz fig. 4).

Aktywność grzybobójcza otrzymanych związków wobec drożdży *Candida albicans*

Badania wykonano dla czterech związków. Najsilniejsze właściwości hamujące wzrost *Candida albicans* wykazał związek 2,4dnbald, dla którego MIC wynosi 0.125 mg/l ml (patrz fig. 5). Działanie hamujące występuje również dla związków 2nbald oraz 4nbald, ale tylko w maksymalnym stężeniu (MIC 1 mg/1 ml).

Wnioski. Otrzymane wyniki mają istotne znaczenie dla badań pochodnych nitrobenzaldehydów z 4-amino-1,2,4-triazolem. Stwierdzono, że właściwości hamujące wzrost bakterii wynikają z charakterystycznych własności nowych związków na bazie triazoli, nie są one zaś spowodowane obecnością części triazolowej: cząsteczka 4-amino-1,2,4-triazolu nie ma żadnych właściwości hamujących wzrost badanych bakterii, działanie takie wykazuje natomiast grupa jego pochodnych.

Największą aktywność wobec wzrostu bakterii zaobserwowano dla związku 2,4dnbald. Hamował on wzrost wszystkich badanych bakterii już w stężeniu 0,125 mg/ml, i to zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych oraz przedstawicieli *Candida*.

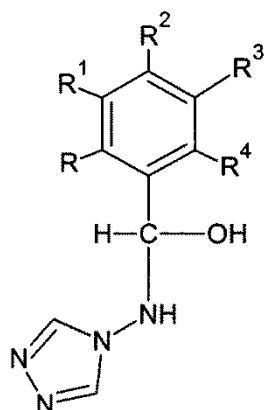
Pozostałe związki wykazywały aktywność bakteriobójczą i grzybobójczą w małym stopniu, zwykle powodowały zahamowanie wzrostu komórek bakteryjnych i/lub drożdży w maksymalnym badanym stężeniu tych związków (1 mg/ml).

Literatura

- [1] K. T. Potts., Chem. Rev. 61 (1961), 87
- [2] J. Reedijk, In: G. Wilkinson (Ed.), Comprehensive Coordination Chemistry, Vol II, Pergamon, Oxford, 1987, 73
- [3] C. Janiak, J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1994), 545
- [4] Y. S. Wu, H. K. Lee, S. F. Y., Li, Journal of Chromatography A, 912 (2001), 171
- [5] T. L. Lee, L. Ya-Chuan, J. W. Chia-Lin, L. Mei-Shey, Y. Su-Chen, Ch. Hsiao-Jen, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. Vol. 6, No. 12, (1996), 1335
- [6] F.R. Benson, Tetrazoles, tetrazines and Purines and Related Ring Systems, Heterocyclic Compounds, Vol. 8, edited by R. C. Elderfield, 1-104. New York: Wiley
- [7] S. Demirayak, K. Benkli, K. Guven, Pharm. Acta Helv. 72 (1998) 285
- [8] G. J. Tanoury, C. H. Senanayake, R. Hett, A. M. Kuhn, D. W. Kessler, S. A. Wald, Tetrahedron Lett. 39, (1998), 6845
- [9] <http://pl.wikipedia.org/wiki/Imina>
- [10] D. R. Williams, Chem Rev. 72, (1972), 203
- [11] Z. Zhang, M. Li, L. Lhao, Z. Li, Org. Chem., 14, (1993), 397
- [12] N. Weiss, A. Bahajaj, E. Elsherbini, J. Heterocycl. Chem., 23, (1986), 1451
- [13] I. Awad, A. Abel-Rahman, E. Bakite, J. Chem. Technol. Biotechnol., 51, (1991), 483
- [14] Z. Ciunik, K. Drabent, L. Szetenberg, Journal of Molecular Structure, 641, (2002) 175
- [15] Z. Ciunik, K. Drabent, Polish J. Chem., 75, (2001) 1475
- [16] S. Berski, Z. Ciunik, K. Drabent, Z. Latajka, J. Panek, J. Phys. Chem. B, 108, (2004) 12327
- [17] Y. Xiu-Ying, Z. Pu-Yong, X. Zhong-Jie, Acta Cryst. E63, (2007), o511
- [18] L. Yuan-Fang, Ch. Suchada, S. S. S. Raj, F. Hong-Fun, Z. Yin-Han, X. Fu-Xin, T. Yu-Peng, N Shi-Sheng, Acta Cryst. C55, (1999), 93
- [19] M. Barys, Z. Ciunik, Acta Cryst. E61, (2006), 1967
- [20] S. Mukopadhyay, M. Mohanty, A. Mangla, A. George, V. Bal, S. Rath, B. Ravindran, J. Immunol. 168, (2002), 2914
- [21] L. E. DeForge, K. L. Billeci, S. M. Kramer, J. J Immunol. Methods. 245, (2000) ,79
- [22] L. A. Collins, S. G. Franzblau, Antimicrob. Agents Chemother. 41, (1997), 1004
- [23] F. C. Tenover, J. M. Swenson, C. M. O'Hara, S. A. Stocker. J. Clin. Microbiol. 33, (1995), 1524
- [24] D. M. Yajko, J. J. Medej, M. V. Lancaster, C. A. Sanders, V. L. Cawthon, B. Gee, A. Babst, W. K. Hodley, J. Clin. Microbiol. 33, (1995), 2324

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek o wzorze:



gdzie:

R oznacza: NO₂, Cl albo H,

R1 oznacza: NO₂, Cl, H,

R2 oznacza: NO₂, H,

R3 oznacza: NO₂, Cl, H,

R4 oznacza: NO₂, Cl, H.

2. Nowa pochodna 4-amino-1,2,4-triazolu z 2,4-dinitrobenzaldehydem według zastrz. 1, **znamienna tym**, że została wybrana spośród związków o wzorach 1 do 5.

3. Sposób otrzymywania nowych pochodnych triazoli określonych w zastrz. od 1 do 2, **znamienny tym**, że nitrobenzaldehyd poddaje się reakcji z 4-amino-1,2,4-triazolem, w równomolowych ilościach obu substancji rozpuszczonych w rozpuszczalniku, a następnie przeprowadza się wyodrębnienie otrzymanych związków.

4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że związki wyodrębnia się poprzez krystalizację.

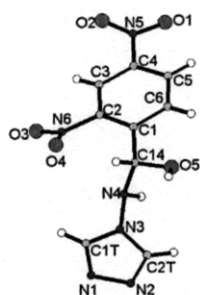
5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że rozpuszczalnikiem zastosowanym w reakcji otrzymywania nowych pochodnych triazolu jest rozpuszczalnik organiczny, taki jak metanol, etanol, acetonitryl, propanol, izopropanol, DMF, DMSO, butanol, aceton, fenol i eter dietylowy.

6. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że otrzymywane są aktywne biologicznie mieszaniny racemiczne chiralnych pochodnych triazolu lub ich czyste izomery.

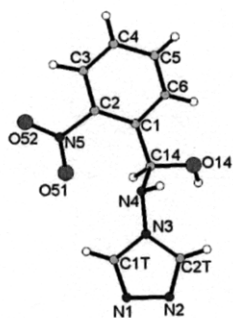
7. Zastosowanie nowych pochodnych triazolu określonych w zastrz. od 1 do 2 do wytwarzania leku przeznaczonego do zapobiegania i/lub leczenia infekcji wywołanych bakteriami i grzybami.

8. Zastosowanie według zastrz. 7, **znamiennie tym**, że lek wytwarzany jest w postaci maści, żelu, tabletki, kapsułki, proszku, granulek, syropu, zastrzyku lub czopków.

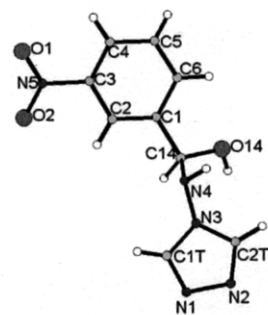
Rysunki



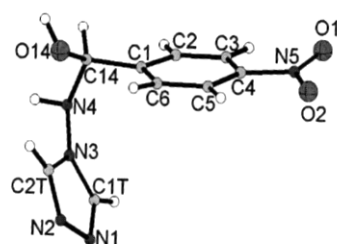
Wzór 1



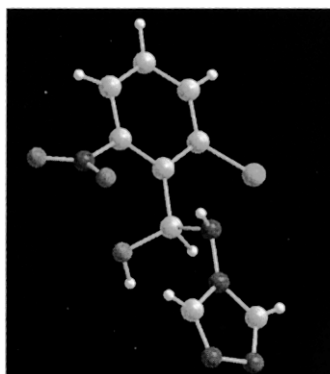
Wzór 2



Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5

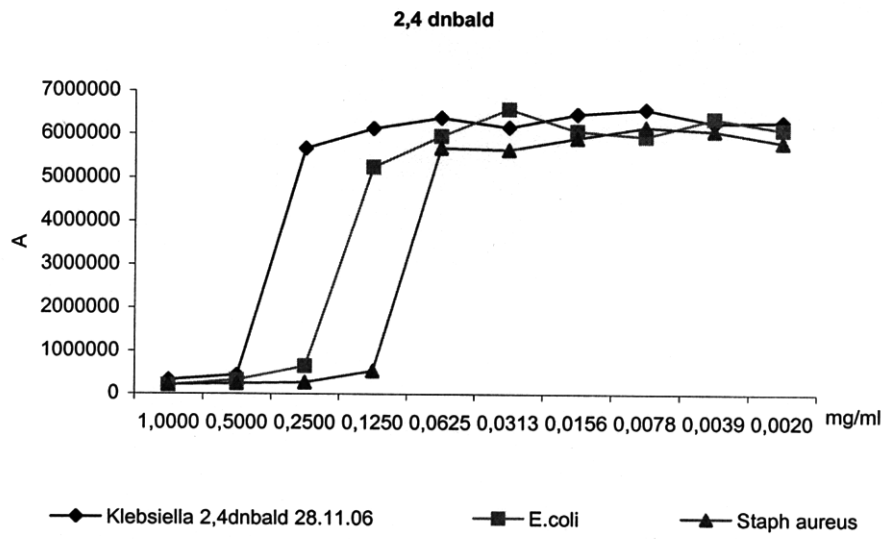


Fig. 1

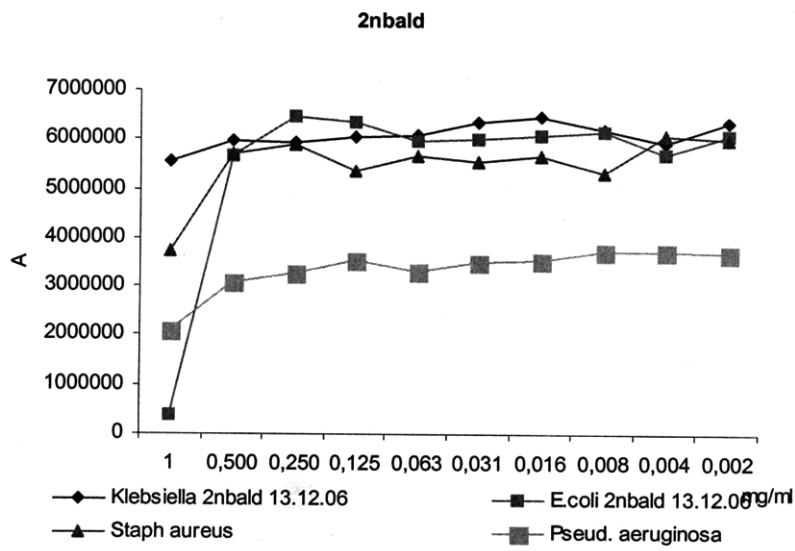


Fig. 2

3nbald 14.12.06

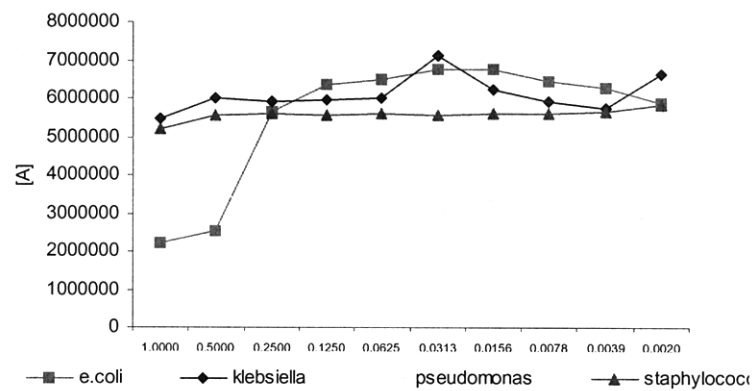


Fig. 3

4nbald 14.12.06

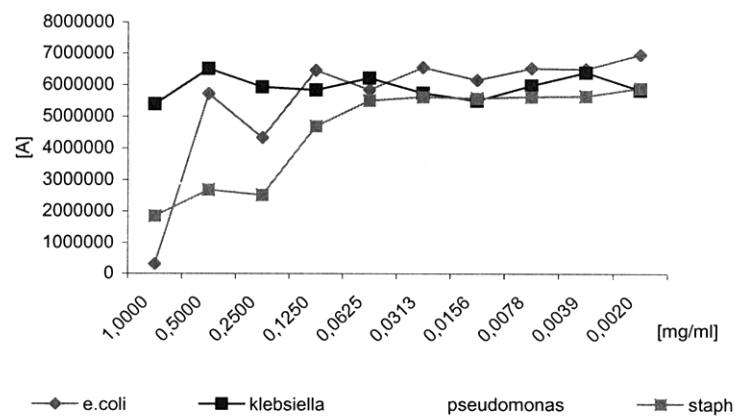


Fig. 4

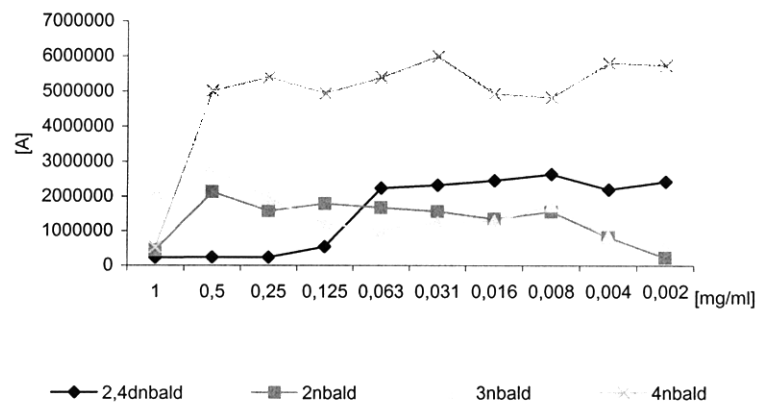
Candida albicans

Fig. 5

