

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **224661**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **408984**

(22) Data zgłoszenia: **25.07.2014**

(51) Int.Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/5025 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Nowe analogi 1,2,4-triazoloftalazyn i sposób otrzymywania analogów
1,2,4-triazoloftalazyn**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

01.02.2016 BUP 03/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.01.2017 WUP 01/17

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

**INSTYTUT PRZEMYSŁU ORGANICZNEGO,
Warszawa, PL**

**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANDRZEJ NIEWIADOMY, Lublin, PL

MONIKA M. KARPIŃSKA, Warszawa, PL

JOANNA WIETRZYK, Wrocław, PL

JOANNA MATYSIAK, Lublin, PL

MARIUSZ GAGOŚ, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Józef W. Hładyniuk

PL 224661 B1

Opis wynalazku

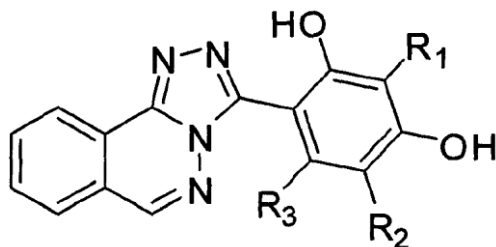
Przedmiotem wynalazku są nowe analogi 1,2,4-triazoloftalazyn oraz sposób otrzymywania analogów 1,2,4-triazoloftalazyn, zwłaszcza analogów o właściwościach leczniczych.

W zależności od budowy analogi 1,2,4-triazoli skondensowane z 6-członowymi pierścieniami karbo- i heterocyklicznymi wykazują zróżnicowane działanie biologiczne. Związki bazujące na układzie 1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyny znane są głównie jako antagoniści receptorów GABA (głównie podjednostek α^3 i α^5) oraz jako ligandy o wysokim powinowactwie do receptorów bramek kanałów wapniowy. Charakteryzuje je m.in. działanie przeciwkonwulsyjne. W przeglądzie piśmiennictwa wskazuje się na pochodne 1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirydazyny również jako na agonistów receptorów GABA. Związki charakteryzuje przy tym działanie antykonwulsyjne, przeciwwirusowe oraz właściwości cytostatyczne. Pochodne 1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirimidyny działają natomiast głównie jako antagoniści receptorów adenylinowych. Wiele z nich wykazuje również aktywność przeciwnowotworową. Tego typu działanie przepisywane jest pochodnym sulfonamidowym, hydrazynowym, oraz pirazolowym. Inne wykazują właściwości przeciwzapalne, przeciwbólowe oraz przeciwbakteryjne.

1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyny generalnie otrzymywane są w reakcji 1-chloroftalazyn z odpowiednimi hydrazydami. Tego typu reakcje przebiegają zarówno w roztworach jak i z zastosowaniem stałych nośników, co znane jest z kilku publikacji. Inna metoda obejmuje reakcję cyklizacji hydrazyno-4-ftalazyn za pomocą kwasów karboksylowych jak opisano w publikacji Aly A.A. Gad El-Karim I.A., *Phosphorus Sulfur*, 2005, 180, 1997–2011. Synthesis of S-triazolo[3,4-*a*]phthalazine and Related Polynuclear Heterocyclic Systems.

Żadna z opisywanych metod syntezy nie obejmuje otrzymywania skondensowanych pochodnych triazolowych z podstawnikiem 2,4-dihydroksyfenylowym w pozycji 3 układu skondensowanego lub jego formą zmodyfikowaną.

Przedmiotem wynalazku są nowe analogi 1,2,4-triazoloftalazyn o Wzórze ogólnym I



Wzór ogólny I

ze zróżnicowanym rodzajem podstawienia układu 2,4-dihydroksyfenylowego, gdzie:

R_1 = H, HO-, Me-, MeO-

R_2 = H, Me-, Et-, Pr-, iPr-, Cl-, HO-, MeO-, EtO-

R_3 = H, HO-, Me-, MeO-.

Wśród wielu możliwych analogów 1,2,4-triazoloftalazyn, ze względu na ich właściwości antyproliferacyjne istotne są między innymi następujące związki:

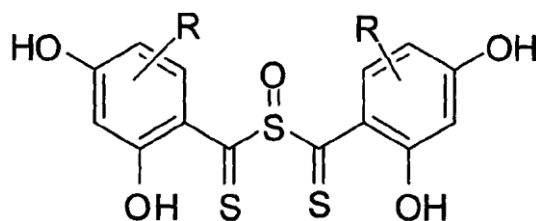
- 3-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyna,
- 3-(3-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyna,
- 3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyna,
- 3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyna,
- 3-(2,3,4-trihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyna,
- 3-(5-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyna.

Sposób otrzymywania związków z grupy 3-arylopodstawionych 1,2,4-triazoli polega na reakcji heteroarylohydrazyn z szeregiem modyfikowanych odczynników tioaryloilujących E. Przebiegające „on pot” kolejne procesy to terminalna transformacja tiohydrazydowa, równowagowe regiospecjalne przegrupowanie anularne oraz izomeryzacja tion/tiolowa warunkująca endocyklizację przez eliminację H_2S .

Podstawione do układów heterocyklicznych liniowe ugrupowania tiohydrazydowe związków przejściowych można traktować jako ambidentne kwasy (lub aniony), z których uwalniane są łatwo

odchodzące jony SH^- deprotonizujące atomy azotu. Przy odpowiedniej zasadowości i stereodostępności atomów azotu układu heterocyklicznego szybkość i wydajność reakcji warunkuje również odpowiednie podstawienie układu tiokarbonylowego reagentów elektrofilowych.

Istota sposobu otrzymywania analogów 1,2,4-triazoloftalazyn o wzorze ogólnym I, w którym do roztworu wprowadza się substraty, po czym wydziela się produkt polega na tym, że w jednowodorotlenowym alkoholu z dodatkiem pirydyny poddaje się reakcji chlorek 1-hydrazynioftalazyny z substancją o Wzorze ogólnym II:



Wzór ogólny II

gdzie R = H, Me, Et, Pr, iPr, Cl, OH, MeO, Et,

po czym uzyskaną mieszaninę rozdziela się na przesącz I i osad I, następnie przesącz I zatęża się i poddaje filtracji, zaś otrzymany osad II poddaje się krystalizacji z jednowodorotlenowego alkoholu.

W pierwszym wariantcie uzyskaną mieszaninę rozdziela się na przesącz I i osad I, po czym przesącz I zatęża się, filtruje się a otrzymany osad II łączy się z osadem III uzyskanym po dodaniu wody do przesączu II, a następnie połączone osady poddaje się krystalizacji z jednowodorotlenowego alkoholu.

W drugim wariantcie, w przypadku potrzeby poprawy wydajności uzyskaną mieszaninę rozdziela się na przesącz I i osad I, po czym przesącz I zatęża się, filtruje się a otrzymany osad II łączy się z osadem I, a następnie połączone osady poddaje się krystalizacji z jednowodorotlenowego alkoholu.

Natomiast w trzecim wariantcie uzyskaną mieszaninę rozdziela się na przesącz I i osad I, po czym przesącz I zatęża się, filtruje się a otrzymany osad II poddaje się krystalizacji z jednowodorotlenowego alkoholu. Przesącz I korzystnie zatęża się do sucha, po czym dodaje się jednowodorotlenowy alkohol, pozostawia na określony czas i filtruje się osad II.

Reakcję prowadzi się korzystnie w temperaturze wrzenia mieszaniny reagentów w jednowodorotlenowym alkoholu. Natomiast jednowodorotlenowy alkohol stanowi metanol albo etanol.

W zależności od położenia i rodzaju podstawnika R substancja E przyjmuje postać:

STB: sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu]

S3MTB: sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)metanotionu]

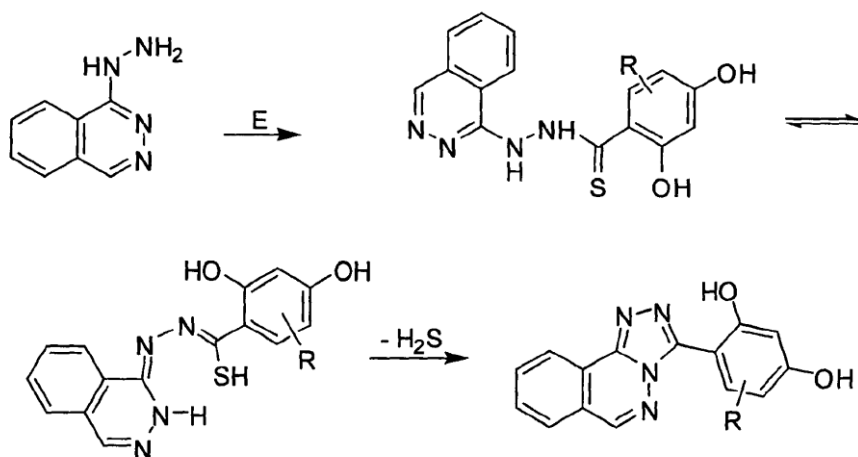
S5MTB: sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksy-5-metylofenylo)metanotionu]

SETB: sulfotlenek bis[(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu]

SCITB: sulfotlenek bis[(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu]

S3TTB: sulfotlenek bis[(2,3,4-trihydroksyfenylo)metanotionu]

Mechanizm reakcji cyklokondensacji tioaryloilowych hydrazynioftalazyn do układu 1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyny przedstawiono na Schemacie.



Schemat

Prześciowe izomeryzujące formy liniowe mogą być uznane za część sztywnego, w miarę ko-planarnego układu i nie mają możliwości swobodnego obrotu przez wiązanie wielokrotne, co ułatwia procesy endocyklizacji. Przegrupowania izomeryzacyjne wywołują zmiany struktury elektronowej, momentu dipolowego, kształtu powierzchni ekwipotencjalnej. W przypadku wielocentrycznej zasado-wości reagentów nukleofilowych, warunkiem jest odpowiednia lokalizacja ugrupowania NHNH_2 umożliwiająca kierunkową protonizację/deprotonizację atomów azotu i stabilizację przez utworzenie uprzywilejowanych geometrycznie pierścieni.

W przypadku wyszukiwania właściwych kierunków modyfikacji podstawnika fenolowego rozbudowano pierścień grupami o zmiennej charakterystyce elektronowej (polarności) mając na uwadze większą możliwość zbliżenia cząsteczki do miejsc wiążących wodorowo czy lokalizację w przestrzeniach hydrofobowych, uwzględniając funkcje benzenodiolu (benzotriolu) w oddziaływaniach z celami molekularnymi. Ten kierunek zmian -R uwzględni również lub przede wszystkim wpływ podstawienia na przebieg kolejnych reakcji przejściowych jak i właściwości produktu końcowego.

W tych szeregach otrzymano też odpowiednie 2,3,4- i 2,4,6-trihydroksyfenylowe analogi. Było to interesujące, bo te kierunki podstawienia mają wpływ zarówno na charakter oddziaływań elektronowych i sterycznych w każdym obszarze wiązań wodorowych oraz zmiany energii cząsteczek.

Wynalazek jest bliżej przedstawiony w następujących przykładach.

Przykład 1

3-(2,4-dihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna o Wzorze III

0,0013 mola chlorku 1-hydrazynioftalazyny oraz 0,0013 mola STB przenoszono do 6,5 mL metanolu z dodatkiem pirydyny (0,65 mL) i ogrzewano we wrzeniu (3 h). Mieszaninę poreakcyjną na gorąco przefiltrowano przez lejek Büchnera. Uzyskano osad I i przesącz I. Przesącz I zatężono, przefiltrowano a uzyskany osad II połączono z osadem III wydzielonym z przesączu II uzyskany po dodaniu 6 mL wody. Następnie połączone osady przekrystalizowano z metanolu (4 mL). Uzyskano związek o Wzorze III.

Wydajność 86%, t.t. 294–295°C.

Dla wzoru: $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$, $M=278,27$

obliczono: C, 64,74; H, 3,62; N, 20,13;

otrzymano: C, 64,81; H, 3,61; N, 20,19.

IR (KBr, cm^{-1}): 3417 (OH), 1626 (C=N), 1475, 1334, 1251, 1131, 977, 640;

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 14.26 (s, 1H, $\text{C}_2\text{-OH}\cdots\text{N}$), 10.31 (s, 1H, $\text{C}_4\text{-OH}$), 9,13 (s, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$), 8,99 (m, 2H, $\text{C}_{\text{AR}}\text{-H}$), 8,24–8,09 (m, 3H, $\text{C}_{\text{AR}}\text{-H}$), 6.45 (s, 1H, $J=2,2$ Hz, $\text{C}_3\text{-H}$), 6.38 (s, 1H, $J=8,6$ Hz i $J=2,2$ Hz, $\text{C}_5\text{-H}$); MS (EI, m/z): 279 ($M+1$, 100), 278 (M^+ , 87), 263 (6), 221 (10), 171 (59), 145 (49), 117 (17), 103 (9), 89 (13), 69 (5), 65 (6), 51 (7), 39 (9).

Przykład 2

3-(3-metylo-2,4-dihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna o Wzorze IV

0,0013 mola chlorku 1-hydrazynioftalazyny oraz 0,0013 mola S3MTB przenoszono do 10,5 mL metanolu z dodatkiem pirydyny (1 mL) i ogrzewano we wrzeniu (3 h). Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej (24 h), po czym przefiltrowano przez lejek Büchnera. Uzyskano

osad I i przesącz I. Przesącz I zateżono uzyskując osad II, który połączono z osadem I, po czym połączone osady przekrystalizowano z metanolu (6 mL).

Uzyskano związek o Wzorze IV.

Wydajność 80%, t.t. 198–199°C. Dla wzoru: $C_{16}H_{12}N_4O_2$, $M=292,29$

obliczono: C, 65,75; H, 4,14; N, 19,17;

otrzymano: C, 65,81; H, 4,12; N, 19,23.

IR (KBr, cm^{-1}): 3213 (OH), 3030 (C_{AR} -H), 1621 (C=N), 1571 (C=C), 1501, 1481, 1379, 1316, 1252, 1197 (C-OH), 1158, 1083, 1028, 999, 917, 901, 801, 783, 763.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 13,92 (s, 1H, C_2 -OH), 12,15 (s, 1H, C_4 -OH), 9,19 (s, 1H, C_6 -H), 8,95 (m, 2H, C_{AR} -H), 8,48 (s, $J=8,8$ Hz, 1H, C_6 -H), 8,10 (m, 2H, C_{AR} -H), 6,55 (d, $J=8,8$ Hz, 1H, C_5 -H), 2,11 (s, 3H, CH_3); MS (EI, m/z): 294 ($M+2$, 96), 293 ($M+1$, 81), 292 (M^+ , 19), 265 (6), 237 (3), 209 (4), 171 (100), 146 (17), 145 (53), 131 (8), 117 (18), 103 (9), 89 (8), 77 (9), 63 (4), 51 (5), 36 (8).

Przykład 3

3-(5-metylo-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna o Wzorze V

0,0013 mola chlorku 1-hydrazynioftalazyny oraz 0,0013 mola sulfotlenku bis [(2,4-dihydroksy-5-metylofenylo)metanotyonu] (S5MTB) przenoszono do 10,5 mL etanolu z dodatkiem pirydyny (1 mL) i ogrzewano we wrzeniu (3,5 h). Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej (24 h) i przefiltrowano przez lejek Büchnera. Uzyskano osad I i przesącz. Przesącz zateżono, a osad I połączono z osadem II wydzielonym z przesączu i połączone osady przekrystalizowano z metanolu (6 mL). Uzyskano związek o Wzorze V.

Wydajność 71%, t.t. 242–243°C. Dla wzoru: $C_{16}H_{12}N_4O_2$, $M=292,29$ obliczono: C, 65,75; H, 4,14; N, 19,17; otrzymano: 65,81; H, 4,11; N, 19,11.

IR (KBr, cm^{-1}): 3213 (OH), 3030 (C_{AR} -H), 1621 (C=N), 1571 (C=C), 1501, 1481, 1379, 1316, 1252, 1197 (C-OH), 1158, 1083, 1028, 999, 917, 901, 801, 783, 763.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$, δ , ppm): 10,86 (s, 1H, C_2 -OH), 9,98 (s, 1H, C_4 -OH), 9,19 (s, 1H, C_6 -H), 8,54 (m, 2H, C_{AR} -H), 8,27 (m, 2H, C_{AR} -H), 7,80 (s, 1H, C_3 '-H), 6,55 (s, 1H, C_6 -H), 2,09 (s, 3H, CH_3); MS (EI, m/z): 292 (M^+ , 100), 263 (9), 221 (5), 160 (4), 144 (5), 137 (4), 129 (3), 117 (4), 89 (4), 63 (6), 44 (6), 39 (3).

Przykład 4

3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna o Wzorze VI

0,0013 mola chlorku 1-hydrazynioftalazyny oraz 0,0013 mola SEBT przenoszono do 6,5 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę poreakcyjną na gorąco przefiltrowano przez lejek Büchnera. Uzyskano osad I i przesącz. Przesącz zateżono, a osad I połączono z osadem II wydzielonym z przesączu, po czym mieszaninę obu osadów przekrystalizowano z metanolu (4 mL).

Uzyskano związek o Wzorze VI.

Wydajność 78%, t.t. 312–314°C. Dla wzoru: $C_{17}H_{14}N_4O_2$, $M=306,32$

obliczono: C, 66,66; H, 4,61; N, 18,29;

otrzymano: C, 66,58; H, 4,62; N, 18,25.

IR (KBr, cm^{-1}): 3425 (OH), 1630 (C=N), 1536 (C=C), 1506, 1411, 1266, 1185 (C-OH), 1149, 905, 759;

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 11,18 (s, 1H, C_2 -OH), 9,92 (s, 1H, C_4 -OH), 9,17 (s, 1H, C_6 -H), 8,56 (d, $J=7,9$ Hz, 1H, C_{10} -H), 8,24 (d, $J=7,7$ Hz, 1H, C_7 -H), 8,18 (s, 1H, C_6 -H), 8,09 (td, 1H, C_9 -H), 7,97 (td, 1H, C_8 -H), 6,54 (s, 1H, C_3 -H), 2,56 (q, 2H, CH_2CH_3), 1,17 (t, 3H, CH_2CH_3); MS (EI, m/z): 306 (M^+ , 51), 291 ($M+-CH_3^+$, 100), 279 (4), 212 (6), 196 (6), 162 (40), 146 (28), 144 (12), 130 (10), 117 (20), 103 (14), 89 (36), 77 (15), 75 (10), 71 (6), 69 (20), 63 (16), 52 (29), 51 (2), 44 (39), 40 (36), 39 (20), 38 (26), 36 (86).

Przykład 5

3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna o Wzorze VII

0,0076 mola chlorku 1-hydrazynioftalazyny oraz 0,0076 mola sulfotlenku bis[(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)metanotyonu] (SCITB) przenoszono do 38 mL metanolu z dodatkiem pirydyny (3,8 mL) i ogrzewano we wrzeniu (3 h). Mieszaninę poreakcyjną przefiltrowano na gorąco. Uzyskano osad I i przesącz. Przesącz zateżono do sucha, po czym dodano 16 ml metanolu i pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej. Wydzielony stały produkt (osad II) odfiltrowano i przekrystalizowano z metanolu (25 mL). Uzyskano związek o Wzorze VII.

Wydajność 77%, t.t. 334–335°C. Dla wzoru: C₁₅H₉ClN₄O₂, M=312,71

obliczono: C, 57,61; H, 2,90; N, 17,92;

otrzymano: C, 57,70; H, 2,92; N, 17,87.

IR (KBr, cm⁻¹): 3398 (OH), 3234 (OH), 3041 (C_{AR}-H), 2984 (C-H), 1626 (C=N), 1598 (C=C), 1512 (C=C), 1444, 1375, 1308, 1273, 1242, 1217 (C-OH), 1156, 1124, 1093, 1045, 1024, 978, 920, 891, 857, 806, 761, 718.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm): 14,34 (s, 1H, C₂-OH), 10,91 (s, 1H, C₄-OH), 9,05 (s, 1H, C₆-H), 8,96 (m, 1H, C_{AR}-H), 8,45 (s, 1H, C₆-H), 8,37 (s, 1H, C₆-H), 8,21 (m, 1H, C_{AR}-H), 8,14 (m, 1H, C_{AR}-H), 6,71 (s, 1H, C₃-H); MS (EI, m/z): 312 (100), 278 (4), 249 (2), 221 (2), 144 (4), 115 (8), 88 (10), 63 (5), 39 (7).

Przykład 6

3-(2,3,4-trihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna o Wzorze VIII

0,0013 mola chlorku 1-hydrazynioftalazyny oraz 0,0013 mola S3TTB przenoszono do 6,5 mL metanolu z dodatkiem pirydyny (0,65 mL) i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę poreakcyjną na gorąco przefiltrowano przez lejek Büchnera. Uzyskano osad I i przesącz I. Przesącz I zatężono, przefiltrowano uzyskując osad II, który połączono z osadem III wydzielonym z przesączu II uzyskanym po dodaniu 6 mL wody. Połączone osady przekrystalizowano z metanolu (4 mL). Uzyskano związek o Wzorze VIII.

Wydajność: 64 %, t.t. 220–222°C. Dla wzoru: C₁₅H₁₀N₄O₃, M=294,26

obliczono: C, 61,22; H, 3,43; N, 19,04;

otrzymano: C, 61,30; H, 3,45; N, 18,99.

IR (KBr, cm⁻¹): 3236, 3132 (OH), 1615 (C=N), 1505 (C=C), 1493, 1456, 1423, 1388, 1340, 1266, 1214, 1179 (C-OH), 1137, 1109, 1042, 1017, 978, 955, 903, 876, 850, 786, 716.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 14,17 (s, 1H, C₂-OH···N), 11,96 (s, 1H, C₂-OH), 9,99 (s, 1H, C₄-OH), 9,44 (s, 1H, C₃-OH), 9,21 (s, 1H, C⁶-H), 8,56 (m, 2H, C_{AR}-H), 8,15 (m, 2H, C_{AR}-H), 8,05 (d, 1H, C₆-H), 6,71 (d, J=8.7 Hz, 1H, C₅-H), MS (EI, m/z, %): 294 (M⁺, 100), 265 (5), 153 (13), 144 (8), 126 (35), 117 (4), 108 (10), 105 (5), 88 (4), 79 (12), 52 (18), 44 (22), 36 (8).

Użyty w powyższych przykładach chlorek 1-hydrazynioftalazyny zakupiono wg katalogu Alfa Aesar, nr kat. B22995 lub Sigma, nr kat. H1753.

Przykład porównawczy

Otrzymane związku sprawdzono pod kątem działania przeciwnowotworowego. W tym celu wykonano badania na aktywność antyproliferacyjną w stosunku do następujących komórek ludzkich nowotworów: pęcherza moczowego HCV 29T, płuc A549, sutka T47D oraz gruczolakoraka okrężnicy SW707. Wyniki doświadczeń w postaci ID₅₀ (dawka powodująca zahamowanie proliferacji 50% populacji komórek nowotworowych) wyznaczone dla każdego związku na komórkach poszczególnych linii zebrano w Tabeli 1. Przyjętym kryterium aktywności nowych związków w badaniach przesiewowych *in vitro* jest poziom ID₅₀ nie wyższy niż 4 μg/mL [Geran RI i wsp. Cancer Chemotherapy Reports, 3,2(part3):59–61,1972].

Test cytotoksyczny SRB

Badania wykonano przy użyciu testu cytotoksycznego SRB, mierzącego zahamowanie proliferacji komórek docelowych w 72-godzinnej hodowli *in vitro* [Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst., 82:1107–1112,1990].

Roztwory wyjściowe testowanych związków o stężeniu 1 mg/mL przygotowano *ex tempore* do każdego doświadczenia rozpuszczając 1 mg preparatu w 100 μL DMSO + 900 μL medium hodowlanego. Rozpuszczalnikiem dla dalszych rozcieńczeń było medium hodowlane. Związki testowano w stężeniach 100, 10, 1, 0,1 μg/mL. Jako kontrolę zastosowano cisplatynę w stężeniach 100, 10, 1, 0,1 μg/mL oraz DMSO w stężeniach odpowiadających jego stężeniu w próbkach związków: 1, 0,1, 0,01 i 0,001%. W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia preparatu nanoszono w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano trzy razy.

Linie komórkowe

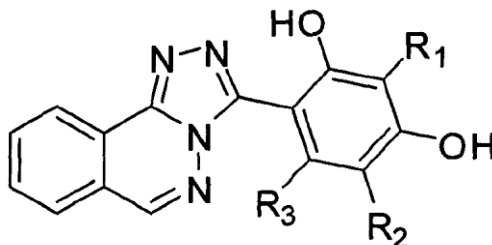
W badaniach zastosowano linie komórkowe znajdujące się w banku linii komórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Komórki hodowane były w medium RPMI + opti-MEM (1:1) z dodatkiem 5% FBS, 2 mM glutaminy, 1 mM pirogronianu sodu oraz 0,8 mg/L insuliny w przypadku linii T47D. Wszystkie media zawierały antybiotyki: 100 mg/mL streptomycyny i 100 U/mL penicyliny. Komórki hodowano w wilgotnej atmosferze 5% CO₂ w 37°C.

T a b e l a 1. Aktywność antyproliferacyjna związków

Przykład	R	HCV29T	A549	T47D	SW707
		ID ₅₀ [μg/mL]			
1	R ₁ =R ₂ =R ₃ = =H	2,01 ± 0,74	0,75 ± 0,06	0,76 ± 0,77	0,59 ± 0,08
2	R ₁ =-CH ₃	1,90 ± 1,56	0,96 ± 0,53	0,30 ± 0,13	2,06 ± 1,45
3	R ₂ =-CH ₃	0,68 ± 0,23	1,12 ± 0,47	0,85 ± 0,39	2,13 ± 1,18
4	R ₂ =-C ₂ H ₅	24,84 ± 4,88	nie badano	nie badano	nie badano
5	R ₂ =-Cl	0,30 ± 0,12	0,75 ± 0,19	0,55 ± 0,35	0,52 ± 0,12
6	R ₁ =-OH	10,12 ± 2,68	4,51 ± 0,15	29,04 ± 3,63	32,42 ± 1,19
Kontrola	cisplatyna	5,29 ± 1,85	2,55 ± 1,13	6,30 ± 2,10	3,62 ± 1,07

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowe analogi 1,2,4-triazoloftalazyn o wzorze ogólnym I:



ze zróżnicowanym rodzajem podstawienia układu 2,4-dihydroksyfenylowego, gdzie:

R₁= H, HO-, Me-, MeO-

R₂= H, Me-, Et-, Pr-, iPr-, Cl-, HO-, MeO-, EtO-

R₃= H, HO-, Me-, MeO-

2. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(2,4-dihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna.

3. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(3-metylo-2,4-dihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna.

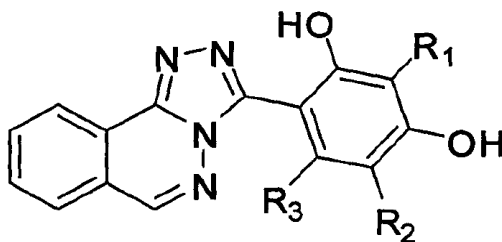
4. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna.

5. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna.

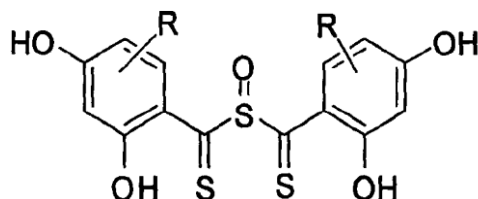
6. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(2,3,4-trihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna.

7. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(5-metylo-2,4-dihydroksyfenilo)-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazyna.

8. Sposób otrzymywania analogów 1,2,4-triazoloftalazyn o wzorze ogólnym I:



w którym do roztworu wprowadza się substraty, po czym wydziela się produkt, **znamienny tym**, że w jednowodorotlenowym alkoholu z dodatkiem pirydyny poddaje się reakcji chlorek 1-hydrazynioftalazyny z substancją o Wzorze ogólnym II:



gdzie: R = H, Me, Et, Pr, iPr Cl, OH, MeO, EtO,

po czym uzyskaną mieszaninę rozdziela się na przesącz I i osad I, następnie przesącz I zatęża się i poddaje filtracji, zaś otrzymany osad II poddaje się krystalizacji z jednowodorotlenowego alkoholu.

9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że uzyskaną mieszaninę rozdziela się na przesącz I i osad I, po czym przesącz I zatęża się, filtruje się a otrzymany osad II łączy się z osadem III uzyskanym po dodaniu wody do przesączu II, a następnie połączone osady poddaje się krystalizacji z jednowodorotlenowego alkoholu.

10. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że uzyskaną mieszaninę rozdziela się na przesącz I i osad I, po czym przesącz I zatęża się, filtruje się a otrzymany osad II łączy się z osadem I, a następnie połączone osady poddaje się krystalizacji z jednowodorotlenowego alkoholu.

11. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że uzyskaną mieszaninę rozdziela się na przesącz I i osad I, po czym przesącz I zatęża się, filtruje się a otrzymany osad II poddaje się krystalizacji z jednowodorotlenowego alkoholu.

12. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że przesącz I zatęża się do sucha, po czym dodaje się jednowodorotlenowy alkohol, pozostawia na określony czas i filtruje się osad II.

13. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w temperaturze wrzenia mieszaniny reagentów w jednowodorotlenowym alkoholu.

14. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że jednowodorotlenowy alkohol stanowi metanol albo etanol.

15. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że substancję o wzorze II stanowi sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu].

16. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że substancję o wzorze II stanowi sulfotlenek bis[(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu].

17. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że substancję o wzorze II stanowi sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)metanotionu].

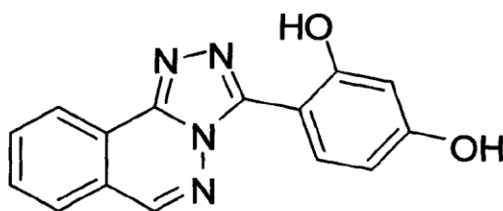
18. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że substancję o wzorze II stanowi sulfotlenek bis[(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu].

19. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że substancję o wzorze II stanowi sulfotlenek bis[(2,3,4-trihydroksyfenylo)metanotionu].

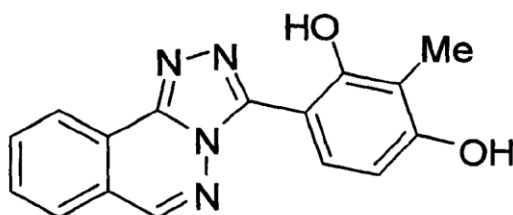
20. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że substancję o wzorze II stanowi sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksy-5-metylofenylo)metanotionu].

Rysunki

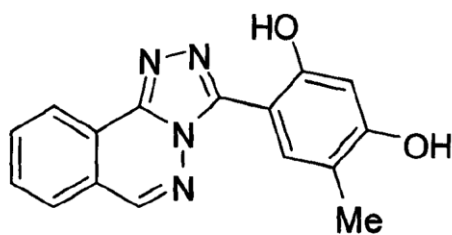
Wzór III



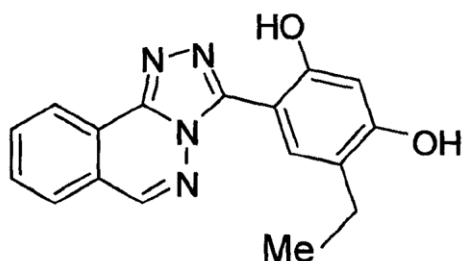
Wzór IV



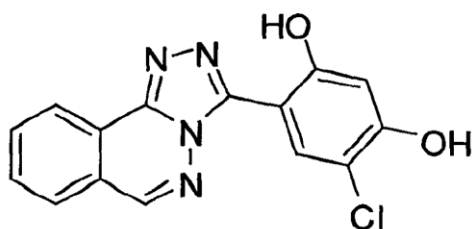
Wzór V



Wzór VI



Wzór VII



Wzór VIII

