

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236074**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **421488**

(22) Data zgłoszenia: **04.05.2017**

(51) Int.Cl.

C07D 401/02 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 417/02 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Opis patentowy
przedrukowano ze względu
na zauważone błędy

(54) **Pochodne Triapiny, sposób ich otrzymywania oraz ich zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

05.11.2018 BUP 23/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.11.2020 WUP 19/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET ŚLĄSKI W KATOWICACH,
Katowice, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

JAROSŁAW POLAŃSKI, Katowice, PL

MARTA REJMUND, Sosnowiec, PL

KAMILA GAJCY, Tychy, PL

MONIKA PYRKOSZ-BULSKA, Konopiska, PL

ANNA MROZEK-WILCZKIEWICZ, Katowice, PL

KATARZYNA MALARZ, Bielsko-Biała, PL

ROBERT MUSIOŁ, Będzin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Mariusz Grzesiczak

PL 236074 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne Triapiny, sposób ich otrzymywania oraz ich zastosowanie. Nowe pochodne Triapiny według wynalazku mają określoną, jednoznaczną budowę chemiczną i nie zostały dotychczas opisane w literaturze.

Triapina należąca do grupy α -N-heterocyklicznych tiosemikarbazonów jest chelatorem żelaza, który wykazuje swoją aktywność przeciwnowotworową w wyniku blokowania kluczowego etapu syntezy DNA poprzez hamowanie reduktazy rybonukleotydydowej, enzymu odpowiedzialnego za replikację komórek nowotworowych. Aktywność antyproliferacyjna Triapiny jest związana z koordynacją wewnątrzkomórkowego żelaza przy udziale donorowych atomów NNS występujących w strukturze jej cząsteczki. Ponieważ w szybko namnażających się komórkach nowotworowych obserwuje się nadekspresję reduktazy rybonukleotydydowej, projektowanie α -N-heterocyklicznych tiosemikarbazonów jako skutecznych inhibitorów reduktazy i ich potencjalne zastosowanie do terapii przeciwnowotworowej jest atrakcyjnym celem naukowców.

Triapina jest obecnie poddawana badaniom klinicznym obejmującym szerokie spektrum nowotworów i została już przebadana w ponad 30 testach klinicznych I i II fazy. Jak do tej pory badania potwierdziły jej wysoką aktywność głównie wobec hematologicznych typów nowotworów, natomiast nie wykazała ona zadowalającej aktywności przeciwko guzom litym, jak niedrobnokomórkowy rak płuc, czy rak nerki. Przyczyny lekooporności komórek nowotworowych na jej działanie nie są do końca znane i są obecnie przedmiotem badań. Ponadto wykazuje ona szereg skutków ubocznych, co zahamowało jej kliniczną aplikację. Znane są *N*-metylowe pochodne Triapiny, które zostały zsyntezowane w celu zbadania mechanizmu działania Triapiny oraz lekooporności komórek nowotworowych, opisane przez Kowol C.R. i współ. „Impact of Metal Coordination on Cytotoxicity of 3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone (Triapine) and Novel Insights into Terminal Dimethylation” *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 5032–5043. Ich aktywność przeciwnowotworowa została opisana między innymi w pracach Heffeter P. i współ. „Impact of terminal dimethylation on the resistance profile of α -N-heterocyclic Thiosemicarbazones Biochemical Pharmacology” **2012**, *83*, 1623–1633; oraz Kowol C.R. i współ. „Impact of NH₂-Metylation of Triapine on the Physicochemical Properties, Anticancer Activity, and Resistance Circumvention” *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 6739–6752. Na podstawie tych badań wykazano, że dimetylacja wolnej grupy aminowej obecnej w strukturze Triapiny zwiększa aktywność jej strukturalnych analogów ponad stokrotnie. W badaniach cytotoksyczności w większości przypadków terminalna dimetylacja grupy aminowej prowadziła do wzrostu aktywności pochodnych Triapiny i ostatecznie wysunięto wniosek, że dimetylacja jednej lub dwóch grup aminowych w strukturze Triapiny jest cennym narzędziem do pokonania lekooporności na działanie Triapiny. Można zatem wnioskować, że celowe jest wprowadzenie do struktury Triapiny poszczególnych podstawników, których obecność może znacząco wpłynąć na ich potencjalną aktywność antyproliferacyjną.

Zastosowanie Triapiny oraz serii innych nowych α -N-heterocyklicznych tiosemikarbazonów opartych na strukturze Triapiny, jako potencjalnych leków na choroby nowotworowe, zostało także opisane przez zespół Richardson D.R i współ. w wielu pracach, między innymi: „Dipyridyl thiosemicarbazone chelators with potent and selective antitumor activity form iron complexes with redox activity.” *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6510–6521; Jansson, P. J. i współ. “The renaissance of polypharmacology in the development of anticancer therapeutics: Inhibition of the “Triad of Death” in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones.” *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 255–260; Yu, Y i współ. “Iron chelators for the treatment of cancer. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2689–2702. Wśród zsyntezowanych największe potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej wykazują Dp44mT oraz nowszej generacji DpC. Obecnie prowadzone są badania na ich aktywność cytotoksyczną, jednakże już na poziomie obecnych doniesień naukowych widać większy potencjał nowszego DpC, gdyż w przeciwieństwie do Dp44mT, nie powoduje uszkodzenia mięśnia sercowego, nawet jeśli jest podawany w zdecydowanie wyższych dawkach. W przeciwieństwie do Dp44mT i Triapiny, DpC nie indukuje utleniania oksyhemoglobiny *in vivo*, DpC wykazało wyraźną aktywność *in vivo* po podaniu doustnym i dożylnym, podczas gdy Dp44mT nie było doustnie tolerowane. W stosunku do metylowych pochodnych Triapiny oraz Dp44mT, który także w swojej strukturze zawiera grupę aminową podstawioną dwiema grupami metylowymi, DpC zawiera bardziej rozbudowany podstawnik w tym miejscu.

Wyniki z dotychczasowych badań przekonują, że nadal istnieje potrzeba projektowania nowych pochodnych Triapiny w celu rozszerzenia spektrum jej działania i pokonania lekooporności, co stało się celem twórców niniejszego wynalazku.

Istotę wynalazku stanowią nowe pochodne Triapiny, których struktura chemiczna jest przedstawiona wzorem ogólnym 1, gdzie **A** oznacza atom azotu albo siarki albo węgla, natomiast **R** oznacza:

- pierścień fenyłowy również podstawiony atomem fluoru albo grupą metoksyłową albo grupą cyjanową albo grupą nitrową oraz trifluorometylową, albo podstawiony atomem chloru, albo
 - pierścień pirydynowy również podstawiony grupą trifluorometylową, bądź podstawiony atomem chloru i grupą trifluorometylową, albo
 - grupę metylową podstawioną dwiema grupami fenyłowymi, albo
 - karboksylan tert-butylu, albo
 - pierścień pirymidynowy, albo
 - grupę cyjanową, albo
 - pierścień pirazynowy,
- przy czym **R** nie występuje, gdy **A** oznacza atom siarki.

Istotę wynalazku stanowi również sposób otrzymywania nowych pochodnych Triapiny, których struktura chemiczna jest przedstawiona wzorem ogólnym 1, gdzie **A** oznacza atom azotu albo siarki albo węgla, natomiast **R** oznacza:

- pierścień fenyłowy również podstawiony atomem fluoru albo grupą metoksyłową albo grupą cyjanową albo grupą nitrową oraz trifluorometylową, albo podstawiony atomem chloru, albo
- pierścień pirydynowy również podstawiony grupą trifluorometylową, bądź podstawiony atomem chloru i grupą trifluorometylową, albo
- grupę metylową podstawioną dwiema grupami fenyłowymi, albo
- karboksylan tert-butylu, albo
- pierścień pirymidynowy, albo
- grupę cyjanową, albo
- pierścień pirazynowy,

przy czym **R** nie występuje, gdy **A** oznacza atom siarki,

polegający na tym, że tiOSEMIKARBAZYD poddaje się kondensacji w reaktorze mikrofalowym o wartości pola co najmniej 30W, korzystnie 50W, z 2-karbaldehydem-3-aminopirydyny w stosunku stechiometrycznym, używając jako rozpuszczalnika metanolu bądź korzystnie etanolu, w temperaturze od 40 do 120°C, korzystnie w zakresie od 80 do 86°C, w czasie niezbędnym do przereagowania substratów, zazwyczaj od 10 do 45 minut. Reakcję prowadzi się wobec katalitycznych ilości kwasu organicznego, korzystnie lodowatego kwasu octowego. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik oddestylowuje się, korzystnie na wyparce destylacyjnej, a następnie produkt poddaje się krystalizacji z użyciem lekkiego alkoholu, korzystnie etanolu. W rezultacie uzyskuje się pochodną Triapiny.

Istotę wynalazku stanowi również zastosowanie nowych pochodnych Triapiny o wzorze ogólnym 1, jak określono wyżej, jako substancji czynnych do wytwarzania środków farmaceutycznych przeznaczonych do stosowania w terapii przeciwnowotworowej. Nowo otrzymane według niniejszego wynalazku strukturalne pochodne Triapiny wykazują aktywność przeciwnowotworową zwłaszcza wobec komórek nowotworu jelita grubego. Większość otrzymanych tym sposobem pochodnych w badaniach biologicznych wykazała wyższą aktywność przeciwnowotworową w stosunku do samej Triapiny, która w badaniach na liniach komórkowych HCT116+/+ osiągnęła wartość $IC_{50} = 1.23 \mu M \pm 0.14$. Ponadto, również w stosunku do jednej z wyżej wspomnianych metylowych pochodnych Triapiny - H₂NNHMe (Kowol C.R. i współ. *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 6739–6752), większość pochodnych Triapiny według niniejszego wynalazku wykazała zwiększoną aktywność cytotoksyczną w badaniach z wykorzystaniem tego samego szczepu linii komórkowych, odpowiednio IC_{50} dla metylowej pochodnej Triapiny osiągnęło wartość $0.64 \mu M \pm 0.14$ (HCT-116 (+/+)) oraz $1.11 \mu M \pm 0.44$ (HCT-116(-/-)).

Sposób według wynalazku jest przedstawiony w poniższych przykładach wykonania zawierających szczególnie syntetyczne oraz spektroskopowe związków; w tabeli 1 przedstawiono struktury opisanych przykładami pochodnych Triapiny, natomiast w tabeli 2 – wyniki testów na aktywność antyproliferacyjną związków wobec kilku linii komórek nowotworowych (przykład 17).

P r z y k ł a d 1: N²-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-(4-fluorofenylo)piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR160**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień fenyłowy podstawiony atomem fluoru.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 128,55 mg (1 mmol) oraz 4-(4-fluorofenylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazyd 254,33 mg (1 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadło

magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz 2 krople lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 83°C przez 20 minut. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik oddestylowano na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.44 (bs, 1H, NH); 8.53 (s, 1H, CH); 7.84 (d, 1H; *J* = 3.9 Hz), 7.17 (s, 2H, NH₂), 7.13-7.04 (m, 4H, CH); 7.03-6.96 (m, 2H, CH), 4.08 (s, 4H, CH₂); 3.18 (s, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 180.1; 157.6; 155.8; 149.5; 147.8; 144.2; 137.2; 134.2; 124.5; 122.4; 117.9; 115.8; 49.3; 48.6. Wydajność: 70%.

Przykład 2: *N'*-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-(4-metoksyfenylo)piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR166**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień fenylowy podstawiony grupą metoksylową.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 128,55 mg (1 mmol) oraz 4-(4-metoksyfenylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazyd 266,36 mg (1 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadełko magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 80°C przez 30 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem etanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.43 (bs, 1H, NH); 8.52 (s, 1H, CH); 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.1 Hz, *J*₂ = 1.7 Hz), 7.17 (s, 2H, NH₂), 7.09 (m, 2H, CH); 6.96 (m, 2H, CH), 6.85 (m, 2H, CH), 4.07 (s, 4H, CH₂), 3.70 (s, 3H, CH₃), 3.11 (s, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 101 MHz, ppm): 180.1; 153.7; 149.4; 145.3; 144.2; 137.1; 134.2; 124.5; 122.4; 118.3; 114.8; 55.7; 50.0; 48.8. Wydajność: 59%.

Przykład 3: *N'*-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-fenylo-piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR167**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień fenylowy.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 128,55 mg (1 mmol) oraz (4-fenyl-1-piperazyno)tiokarbohydrazyd 236,34 mg (1 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadełko magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 40W. Reakcję prowadzono w temperaturze 82°C przez 25 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem etanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.44 (bs, 1H, NH); 8.53 (s, 1H, CH); 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.0 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.25 (t, 2H; *J* = 7.8 Hz), 7.18 (s, 2H, NH₂); 7.10 (m, 2H, CH), 6.99 (d, 2H; *J* = 8.2 Hz), 6.82 (t, 1H; *J* = 7.3 Hz), 4.09 (s, 4H, CH₂); 3.26 (s, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 180.0; 150.9; 149.5; 144.2; 137.2; 134.2; 129.5; 124.5; 122.4; 119.6; 116.0; 48.6; 48.3. Wydajność: 83%.

Przykład 4: *N'*-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-(4-cyjanofenylo)piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR169**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień fenylowy podstawiony grupą cyjanową.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 128,55 mg (1 mmol) oraz 4-(4-cyjanofenylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazyd 261,35 mg (1 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadełko magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 83°C przez 20 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.42 (bs, 1H, NH); 8.54 (s, 1H, CH); 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.1 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.62 (d, 2H; *J* = 8.7 Hz), 7.17 (s, 2H, NH₂); 7.09 (m, 2H, CH), 7.02 (d, 2H; *J* = 8.8 Hz), 4.10 (s, 4H, CH₂), 3.53 (s, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 179.9; 152.9; 149.6; 144.2; 137.2; 134.2; 133.8; 124.5; 122.5; 120.6; 114.0; 98.5; 47.9; 45.8. Wydajność: 74%.

Przykład 5: *N'*-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-tiomorfolino-1-karbotiohydrazyd (**MR170**)

Według wzoru 1, A = S, R nie istnieje.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 128,55 mg (1 mmol) oraz (4-tiomorfolino)tiokarbohydrazyd 177,29 mg (1 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadełko magnetyczne,

dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 80°C przez 20 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.34 (bs, 1H, NH); 8.53 (s, 1H, CH); 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.17 (s, 2H, NH₂); 7.09 (m, 2H, CH), 4.23 (m, 4H, CH₂), 2.71 (s, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 179.6; 149.7; 144.2; 137.1; 134.2; 124.5; 122.4; 51.8; 26.88. Wydajność: 51%.

Przykład 6: *N*'-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-[(4-trifluorometylo)-2-pirydylo]piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR174**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień pirydynowy podstawiony grupą trifluorometylową

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 85,61 mg (0,67 mmol) oraz 4-[5(trifluorometylo)-2-pirydynylo]piperazyno-1-tiokarbohydrazyd 203,33 mg (0,67 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 83°C przez 20 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.42 (bs, 1H, NH); 8.54 (s, 1H, CH); 8.46 (d, 1H, *J* = 2,5 Hz), 7.85 (m, 2H, CH), 7.18 (s, 2H, NH₂); 7.08 (m, 2H, CH), 6.97 (d, 1H; *J* = 9.1 Hz), 4.09 (s, 4H, CH₂), 3.80 (s, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 101 MHz, ppm): 180.0; 160.3; 149.6; 145.7; 144.2; 137.1; 135.0; 134.2; 126.4; 124.5; 122.5; 113.8; 106.7; 47.9; 43.8. Wydajność: 47%.

Przykład 7: *N*'-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-(2-pirydylo)piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR191**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień pirydynowy.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 128,55 mg (1 mmol) oraz [4-(2-pirydynylo)-1-piperazyno]tiokarbohydrazyd 237,33 mg (1 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – metanolu oraz 2 krople lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 75W. Reakcję prowadzono w temperaturze 80°C przez 30 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.41 (bs, 1H, NH); 8.54 (s, 1H, CH); 8.15 (d, 1H, *J* = 4.9 Hz), 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.1 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.58 (m, 1H, CH), 7.18 (s, 2H, NH₂); 7.09 (m, 2H, CH), 6.86 (d, 1H; *J* = 8.6 Hz), 6.68 (m, 1H, CH), 4.07 (m, 4H, CH₂), 3.64 (m, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 101 MHz, ppm): 180.1; 159.0; 149.5; 148.0; 144.2; 138.1; 137.1; 134.2; 124.5; 122.5; 113.7; 107.5; 48.3; 44.4. Wydajność: 38%.

Przykład 8: *N*'-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-(metylodifenilo)piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR203**)

Według wzoru 1, A = N, R = grupa metylowa podstawiona dwoma grupami fenylowymi.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 64,26 mg (0,5 mmol) oraz (4-metylodifenilo-1-piperazyno)tiokarbohydrazyd 163,23 mg (0,5 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – metanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 73°C przez 45 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.30 (bs, 1H, NH); 8.46 (s, 1H, CH); 7.82 (dd, 1H; *J*₁ = 4.1 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.45 (d, 4H; *J* = 7.2 Hz), 7.32 (t, 4H; *J* = 7.6 Hz), 7.21 (t, 2H; *J* = 7.3 Hz), 7.14 (s, 2H, NH₂); 7.06 (m, 2H, CH), 3.94 (m, 4H, CH₂), 2.39 (m, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 180.0; 149.3; 144.2; 142,7; 137.1; 134.2; 129.1; 128.1; 127.5; 124.4; 122.5; 74.9; 51.6; 48.9. Wydajność: 56%.

Przykład 9: *N*'-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]hydrazynylo)karbotionylo]piperazyno-1-karbosylan tert-butylu (**MR231**)

Według wzoru 1, A = N, R = karboksylan tert-butylu.

2-karbalddehyd-3-aminopirydyny 64,28 mg (0,5 mmol) oraz tert-butylo-4-(hydrazynylokarbotio-nylo)piperazyno-1-tiokarbohidrazyd 130,18 mg (0,5 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 83°C przez 20 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz, ppm): 11.39 (bs, 1H, NH); 8.51 (s, 1H, CH), 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.19-7.13 (s, 2H, NH₂); 7.12-7.05 (m, 2H, CH), 3.93 (m, 4H, CH₂), 3.44 (m, 4H, CH₂), 1.43 (s, 9H, CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 180.2; 154.3; 149.2; 144.3; 136.9; 133.9; 124.5; 122.8; 79.7; 48.4; 28.5. Wydajność: 20%.

P r z y k ł a d 10: *N*'-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-[2-nitro-4-(trifluorometylo)fenylo]piperazyno-1-karbotiohidrazyd (**MR232**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień fenylowy podstawiony grupą nitrową oraz trifluorometylową.

2-karbalddehyd-3-aminopirydyny 64,28 mg (0,5 mmol) oraz 4-[2-nitro-4-(trifluorometylo)fenylo]piperazyno-1-tiokarbohidrazyd 174,67 mg (0,5 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadełko magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 83°C przez 20 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz, ppm): 11.42 (bs, 1H, NH); 8.53 (s, 1H, CH); 8.20 (d, 1H, *J* = Hz), 7.91-7.83 (m, 2H, CH), 7.47 (d, 1H; *J* = 8.9 Hz), 7.21-7.13 (s, 2H, NH₂); 7.11 (dd, 1H; *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.07 (dd, 1H; *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz), 4.09 (m, 4H, CH₂), 3.38 (m, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 180.1; 149.7; 147.5; 144.3; 138.9; 137.2; 134.2; 130.5; 124.4; 123.0; 122.5; 121.1; 56.5; 49.3; 47.9; 19.0. Wydajność: 75%.

P r z y k ł a d 11: *N*'-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-(2-pirymidyno)piperazyno-1-karbotiohidrazyd (**MR233**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień pirymidynowy.

2-karbalddehyd-3-aminopirydyny 64,28 mg (0,5 mmol) oraz [4-(2-pirymidynilo)-1-piperazyno]tiokarbohidrazyd 119,16 mg (0,5 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadełko magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz 2 krople lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 80°C przez 20 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz, ppm): 11.43 (bs, 1H, NH); 8.53 (s, 1H, CH); 8.41 (d, 1H, *J* = Hz), 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.22-7.13 (s, 2H, NH₂); 7.11 (dd, 1H; *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.07 (dd, 1H; *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz), 6.69 (t, 1H, *J* = 4.7 Hz), 4.05 (m, 4H, CH₂), 3.86 (m, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 180.1; 161.5; 158.5; 149.4; 144.2; 137.1; 134.2; 124.5; 122.5; 111.0; 48.4; 43.2. Wydajność: 39%.

P r z y k ł a d 12: *N*'-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-fenylopiperydylo-1-karbotiohidrazyd (**MR235**)

Według wzoru 1, A = C, R = pierścień fenylowy.

2-karbalddehyd-3-aminopirydyny 64,28 mg (0,5 mmol) oraz (4-fenylo-1-piperazyno)-1-tiokarbohidrazyd 117,67 mg (0,5 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadełko magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 83°C przez 40 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (4-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.35 (bs, 1H, NH); 8.52 (s, 1H, CH); 7.83 (dd, 1H; *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.34-7.29 (m, 2H, CH), 7.28-7.26 (m, 2H, CH), 7.23-7.19 (m, 2H, NH₂); 7.10 (dd, 1H; *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.06 (dd, 1H; *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz), 4.93 (d, 2H, *J* = 13.2 Hz); 3.19 (m, 2H, CH₂), 2.89 (m, 1H, CH₂), 1.88 (dd, 1H; *J*₁ = 13.5 Hz, *J*₂ = 3.4 Hz), 1.66 (m, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 179.7; 148.9; 145.8; 144.2; 137.0; 134.2; 128.9; 127.2; 126.7; 124.4; 122.5; 49.6; 42.1; 33.3. Wydajność: 50%.

Przykład 13: *N'*-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-(4-chlorofenylo)piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR236**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień fenyłowy podstawiony atomem chloru.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 64,28 mg (1 mmol) oraz 4-(4-chlorofenylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazyd 135,39 mg (1 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 85°C przez 20 minut. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik oddestylowano na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz, ppm): 11.45 (bs, 1H, NH); 8.53 (s, 1H, CH); 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.28-7.25 (m, 2H, CH), 7.22-7.14 (s, 2H, NH₂), 7.12-7.09 (dd, 1H; *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.08-7.06 (dd, 1H; *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz), 6.99 (m, 2H, CH), 4.08 (t, 4H, *J* = 5.3 Hz); 3.27 (t, 4H, *J* = 5.2 Hz).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 180.1; 149.7; 149.5; 144.2; 137.2; 134.2; 129.1; 124.5; 123.1; 122.5; 117.3; 48.4; 48.0. Wydajność: 83%.

Przykład 14: *N'*-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-[3-chloro-5-(trifluorometylo-2-pirydylo)]piperazyno-1-karbotiohydrazyd (**MR237**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień pirydynowy podstawiony atomem chloru i grupą trifluorometylową

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 64,28 mg (0,5 mmol) oraz [4-(6-chloro-5-trifluorometylo)-2-pirydylo]piperazyno-1-tiokarbohydrazyd 169,89 mg (0,5 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 82°C przez 20 minut. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik oddestylowano na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji, z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz, ppm): 11.44 (bs, 1H, NH); 8.59 (dd, 1H; *J*₁ = 2.3 Hz, *J*₂ = 1.1 Hz), 8.53 (s, 1H, CH); 8.23 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.1 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.21-7.14 (s, 2H, NH₂); 7.12-7.09 (dd, 1H; *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.09-7.05 (dd, 1H; *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz), 4.10 (m, 4H, CH₂), 3.63 (m, 4H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 180.3; 159.5; 149.6; 144.2; 143.6; 137.2; 136.9; 134.2; 125.0; 124.5; 122.5; 120.0; 119.1; 48.3; 48.1. Wydajność: 64%.

Przykład 15: *N'*-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-cyjanopiperidyno-1-karbotiohydrazyd (**MR238**)

Według wzoru 1, A = C, R = grupa cyjanowa.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 64,28 mg (0,5 mmol) oraz (4-cyjanopiperidyno-1-tiokarbohydrazyd 92,13 mg (0,5 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz kroplę lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 50W. Reakcję prowadzono w temperaturze 83°C przez 20 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.38 (bs, 1H, NH); 8.50 (s, 1H, CH); 7.84 (dd, 1H; *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 7.16 (s, 2H, NH₂); 7.12-7.02 (m, 2H, CH), 4.22 (m, 2H, CH₂); 3.71 (m, 2H, CH₂), 3.20 (m, 1H, CH₂), 1.98 (m, 2H, CH₂), 1.77 (m, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 126 MHz, ppm): 179.9; 149.4; 144.2; 137.1; 134.1; 124.5; 122.6; 60.3; 47.3; 28.5; 25.8. Wydajność: 67%.

Przykład 16: *N'*-[2-(3-aminopirydylo)metyleno]-4-(2-pirazynylo)pirazynylo-1-karbotiohydrazyd (**MR242**)

Według wzoru 1, A = N, R = pierścień pirazynowy.

2-karbaldehyd-3-aminopirydyny 32,14 mg (0,25 mmol) oraz [4-(2-pirazynylo)-1-piperazyno]tiokarbohydrazyd 59,58 mg (0,25 mmol) umieszczono w naczyniu reakcyjnym, zaopatrzonym w mieszadło magnetyczne, dodano 5 ml rozpuszczalnika – etanolu oraz 2 krople lodowatego kwasu octowego i umieszczono w reaktorze mikrofalowym ustawionym na moc 30W. Reakcję prowadzono w temperaturze 83°C przez 20 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce destylacyjnej. Otrzymany produkt poddano krystalizacji z użyciem metanolu otrzymując odpowiednią pochodną Triapiny.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 500 MHz, ppm): 11.44 (bs, 1H, NH); 8.54 (s, 1H, CH); 8.35 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 8.12 (dd, 1H; $J_1 = 2.7$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz) 7.88 (d, 1H; $J = 2.6$ Hz), 7.84 (dd, 1H; $J_1 = 4.2$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 7.22-7.14 (s, 2H, NH_2); 7.12-7.05 (m, 2H, CH), 4.09 (m, 4H, CH_2), 3.72 (m, 4H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 126 MHz, ppm): 180.0; 154.7; 149.6; 144.2; 141.9; 137.2; 134.2; 133.1; 131.7; 124.5; 122.5; 48.0; 43.8. Wydajność: 70%.

Przykład 17: Aktywność przeciwnowotworowa pochodnych Triapiny.

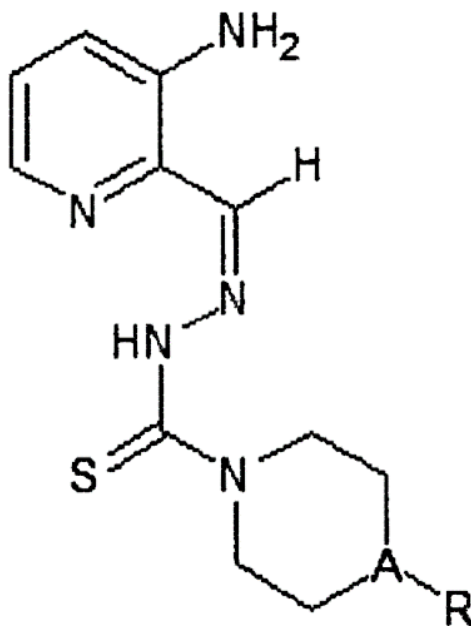
Aktywność antyproliferacyjną badanych związków oznaczono wobec kilku linii komórek nowotworowych; HCT 116 typu dzikiego ($p53^{+/+}$), HCT 116 z nokautem genu kodującego białko p53 ($p53^{-/-}$), MCF-7, U-251, Hs 683. Dodatkowo wykonano badania na linii komórek prawidłowych; NHDF, w celu określenia selektywności. Komórki wysiano na przezroczyste płytki w ilości 5 tysięcy na dołek i pozostawiono na 24 godziny w inkubatorze hodowlanym (37°C ; 5% CO_2). Następnie podawano r-ry badanych związków w zakresie stężeń (25–0,1 μM). Tak przygotowane komórki poddano 72h inkubacji, po czym przeprowadzono ocenę żywotności komórek w teście MTS. Do każdej studzienki na płytce 96 dołkowej dodano 20 μL roztworu MTS oraz 100 μL medium bez czerwieni fenolowej i inkubowano przez 1 h. Wartości absorbancji odczytano w spektrofotometrze przy długości 490 nm. Wyniki testów są przedstawione w tabeli 2 poniżej w przeliczeniu na wartości IC_{50} . Obliczeń dokonano w programie GraphPad Prism. Każdy eksperyment został powtórzony co najmniej, 3-krotnie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowe pochodne Triapiny, których struktura chemiczna jest przedstawiona wzorem ogólnym 1, gdzie **A** oznacza atom azotu albo siarki albo węgla, natomiast **R** oznacza:
 - pierścień fenyłowy również podstawiony atomem fluoru albo grupą metoksyłową albo grupą cyjanową albo grupą nitrową oraz trifluorometyłową, albo podstawiony atomem chloru, albo
 - pierścień pirydynowy również podstawiony grupą trifluorometyłową, bądź podstawiony atomem chloru i grupą trifluorometyłową, albo
 - grupę metylową podstawioną dwiema grupami fenyłowymi, albo
 - karboksylan tert-butylu, albo
 - pierścień pirymidynowy, albo
 - grupę cyjanową, albo
 - pierścień pirazynowy,przy czym **R** nie występuje, gdy **A** oznacza atom siarki.
2. Sposób otrzymywania nowych pochodnych Triapiny, których struktura chemiczna jest przedstawiona wzorem ogólnym 1, gdzie **A** oznacza atom azotu albo siarki, albo węgla, natomiast **R** oznacza:
 - pierścień fenyłowy również podstawiony atomem fluoru albo grupą metoksyłową albo grupą cyjanową albo grupą nitrową, oraz trifluorometyłową, albo podstawiony atomem chloru, albo
 - pierścień pirydynowy również podstawiony grupą trifluorometyłową, bądź podstawiony atomem chloru i grupą trifluorometyłową, albo
 - grupę metylową podstawioną dwiema grupami fenyłowymi, albo
 - karboksylan tert-butylu, albo
 - pierścień pirymidynowy, albo
 - grupę cyjanową, albo
 - pierścień pirazynowy,przy czym **R** nie występuje, gdy **A** oznacza atom siarki,
znamienny tym, że tiosemikarbazyd poddaje się kondensacji w reaktorze mikrofalowym o wartości pola co najmniej 30W, korzystnie 50W, z 2-karbaldehydem-3-aminopirydyny w stosunku stechiometrycznym, używając jako rozpuszczalnika metanolu bądź korzystnie etanolu, w temperaturze od 40 do 120°C , korzystnie w zakresie od 80 do 86°C , w czasie niezbędnym do przereagowania substratów, zazwyczaj od 10 do 45 minut, wobec katalitycznych ilości kwasu organicznego, korzystnie lodowatego kwasu octowego, po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik oddestylowuje się, korzystnie na wyparce destylacyjnej, a następnie produkt poddaje się krystalizacji z użyciem lekkiego alkoholu, korzystnie etanolu.

3. Zastosowanie nowych pochodnych Triapiny o wzorze ogólnym 1, jak określono w zastrz. 1, jako substancji czynnych do wytwarzania środków farmaceutycznych przeznaczonych do stosowania w terapii przeciwnowotworowej.
4. Zastosowanie według zastrz. 3 do wytwarzania środków farmaceutycznych przeznaczonych do leczenia raka jelita grubego.

Rysunki



WZÓR 1

Tabela 1

Nazwa	Struktura	Nazwa	Struktura
MR160		MR231	
MR166		MR232	
MR167		MR233	
MR169		MR235	
MR170		MR236	
MR174		MR237	
MR191		MR238	
MR203		MR242	

Tabela 2

Symbol	HCT-116(+/+)	HCT-116(-/-)
MR160	0,53 $\mu\text{M} \pm 0,08$	0,15 $\mu\text{M} \pm 0,07$
MR166	1,33 $\mu\text{M} \pm 0,21$	0,18 $\mu\text{M} \pm 0,09$
MR167	1,52 $\mu\text{M} \pm 0,44$	0,13 $\mu\text{M} \pm 0,01$
MR169	1,45 $\mu\text{M} \pm 0,45$	0,75 $\mu\text{M} \pm 0,35$
MR170	1,46 $\mu\text{M} \pm 0,19$	0,53 $\mu\text{M} \pm 0,04$
MR174	0,42 $\mu\text{M} \pm 0,11$	0,12 $\mu\text{M} \pm 0,06$
MR191	1,90 $\mu\text{M} \pm 0,29$	0,14 $\mu\text{M} \pm 0,02$
MR203	0,31 $\mu\text{M} \pm 0,02$	0,48 $\mu\text{M} \pm 0,03$
MR231	0,76 $\mu\text{M} \pm 0,24$	1,13 $\mu\text{M} \pm 0,05$
MR232	0,14 $\mu\text{M} \pm 0,02$	0,27 $\mu\text{M} \pm 0,01$
MR233	0,67 $\mu\text{M} \pm 0,05$	0,65 $\mu\text{M} \pm 0,05$
MR235	0,14 $\mu\text{M} \pm 0,02$	0,28 $\mu\text{M} \pm 0,01$
MR236	0,12 $\mu\text{M} \pm 0,01$	0,17 $\mu\text{M} \pm 0,02$
MR237	0,17 $\mu\text{M} \pm 0,01$	0,16 $\mu\text{M} \pm 0,01$
MR238	0,35 $\mu\text{M} \pm 0,12$	0,53 $\mu\text{M} \pm 0,04$
MR242	0,43 $\mu\text{M} \pm 0,11$	0,34 $\mu\text{M} \pm 0,04$