

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **224660**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **408971**

(22) Data zgłoszenia: **23.07.2014**

(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-triazoli i sposób otrzymywania analogów 1,2,4-triazoli**

(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 224660 B1

Opis wynalazku

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

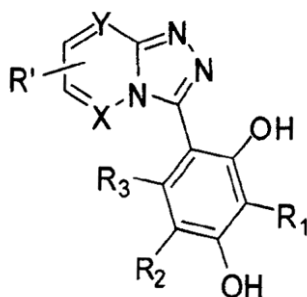
W zależności od budowy analogi 1,2,4-triazoli skondensowane z 6-członowymi pierścieniami karbo- i heterocyklicznymi wykazują zróżnicowane działanie biologiczne. Związki bazujące na układzie 1,2,4-triazolo[3,4-*a*]ftalazyny znane są głównie jako antagoniści receptorów GABA (głównie podjednostek $\alpha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

Skondensowany układ 1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyny generalnie otrzymywany jest w reakcji cyklizacji pochodnych 3-hydrazynowych, 3-hydrazydowych lub 3-hydrazonowych pirydazyny z użyciem stosownych czynników zamykających układy liniowe i odpowiednich środowisk reakcyjnych. Znane są opisy między innymi z publikacji: Deeb A., Hassaneen M., Kotb M., *Heteroatom Chemistry*, 2005, 16, 278–284. Pyridazine Derivatives and Related Compounds, Part 8: Synthesis of Different Heterocycles from 3-Hydrazinopyridazine; Collins I., Castro J. L., Street L.J., *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 781–784. Rapid analogue synthesis of trisubstituted triazolo[4,3-*b*]pyridazines; Skoumbourdis A.P., LeClair C.A., Stefan E., Tuijanski A.G., Maguire W., Titus S.A., Huang R., Auld D.S., Inglesse J., Austin C.P., Michnick S.W., Xia M., Thomas C.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 3686–3692. Exploration and optimization of substituted triazolothiadiazines and triazolopyridazines as PDE4 inhibitors, pozwalające w poszczególnych przypadkach na otrzymanie ograniczonego zakresu modyfikacji podstawowego układu.

Skondensowany układ 1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirimidyny najczęściej otrzymywany jest w analogicznych procesach cyklizacji z zastosowaniem odpowiednio 2-hydrazynowych (hydrazonowych) pochodnych. Także kondensacja 1,2-dihydro-2-tiooksopirymidyn-4(3*H*)onów z chlorkami hydrazonylu prowadzi do opisywanych połączeń, co znane jest z publikacji Hassaneen H.M., Abdelhadi H.A., Abdallah T.A., *Tetrahedron* 2001, 57, 10133–10138. Novel synthesis of 1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyrimidin-5-one derivatives. Niestandardowa reakcja otrzymywania 1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirimidyny przedstawiona jest natomiast przez Dandia A., Singh R., Singh D., Kapil A., *Letters in Organic Chemistry*, 2009, 6, 100–105. Facile Regioselective Green Synthesis of Triazolo [4,3-*a*] Pyrimidines in Aqueous Medium, gdzie wieloskładnikowa kondensacja 2-amino-1,3,4-triazolu, aktywnej grupy metylowej cyanooctanu etylu oraz aldehydu 4-chlorobenzoesowego (grupa karbonylowa) prowadzi do opisywanych układów.

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.

Istotą wynalazku są nowe analogi 1,2,4-triazoli o wzorze ogólnym I:



Wzór ogólny I

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

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

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

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

$R' = H, Cl, Br, F_3C-$

$X = N, Y = CH$ w pierwszym wariantcie

zaś w drugim wariantcie $X = CH, Y = N$.

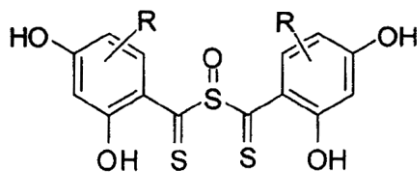
Wśród wielu możliwych analogów 1,2,4 triazoli, ze względu na ich właściwości antyproliferacyjne istotne są między innymi następujące związki:

- 6-chloro-3-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna,
- 6-chloro-3-(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna,
- 6-chloro-3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna,
- 6-chloro-3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna,
- 6-chloro-3-(2,3,4-trihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna,
- 3-(2,4-dihydroksyfenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirymidyna,
- 3-(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirymidyna,
- 3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirymidyna,
- 3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirymidyna,

Sposób otrzymywania związków z grupy 3-arylopodstawionych 1,2,4-triazoli polega na reakcji heteroarylohydrazyn z szeregiem modyfikowanych odczynników tioarylodujących. 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 sposób otrzymywania analogów 1,2,4-triazoli o Wzorze ogólnym I, w którym do roztworu wprowadza się substraty, po czym wydziela się produkt znamieny tym, że w jednowodorotlenowym alkoholu z dodatkiem pirydyny poddaje się reakcji heteroarylohydrazynę z substancją E o Wzorze ogólnym II:



Wzór ogólny II

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

po czym uzyskaną mieszaninę poreakcyjną rozdziela się na osad I i przesącz I, który następnie zatęże się, zaś uzyskany tym sposobem osad II krystalizuje się z wodnego roztworu jednowodorotlenowego alkoholu. Jednowodorotlenowy alkohol korzystnie stanowi etanol albo metanol. W przypadku gdy związek końcowy wypada z roztworu podczas przebiegu reakcji, to osad I łączy się z osadem II, po czym ich mieszaninę poddaje się krystalizacji. Wśród heteroarylohydrazyn szczególnie przydatna jest 3-chloro-6-hydrazynopirydazyna albo 2-hydrazyno-4-(trifluorometylo)pirymidyna.

Natomiast 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],

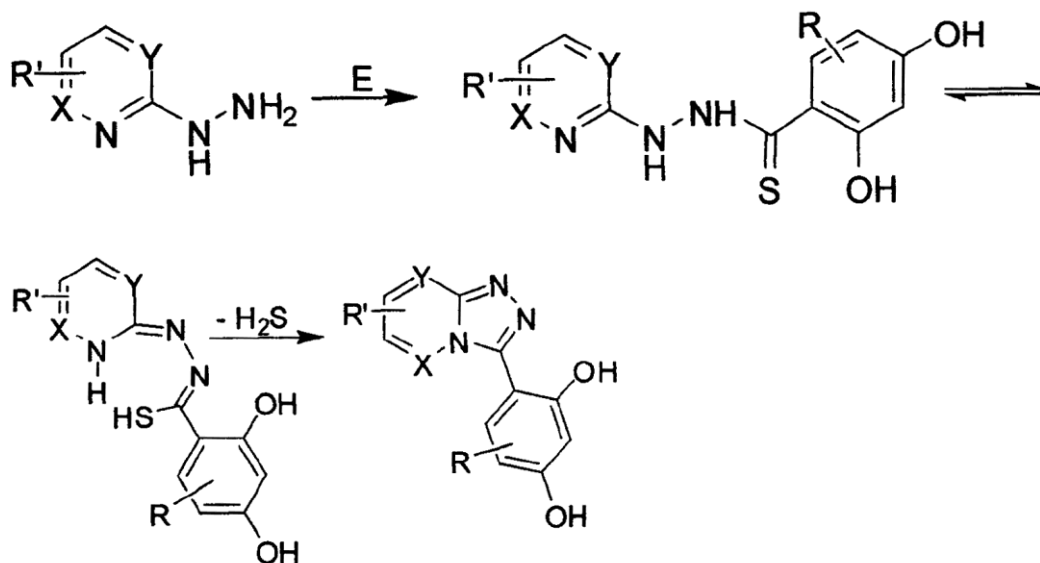
S5MTB: sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksy-5-metylofenylo)metanotionu],

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

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

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

Synteza przebiega według Schematu



Schemat

Przejściowe izomeryzujące formy liniowe mogą być uznane za część sztywnego, w miarę koplarnego 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 zasadowości 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 uwzględnia 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 – Wzór III

6-chloro-3-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazyna

0,007 mola 3-chloro-6-hydrazynopirydazyny oraz 0,007 mola sulfotlenku bis[(2,4-dihydroksyenylo)metanotyonu] (STB) przenoszono do 35 mL EtOH i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę po reakcyjną przefiltrowano na gorąco przez lejek Büchnera. Otrzymano osad I i przesącz I, przy czym osad I odrzucono. Przesącz I zatężono do sucha, dodano 32 mL układu rozpuszczalników MeOH/woda (1:1) i pozostawiono na 24 h. Wydzielony osad II odfiltrowano i przekryształizowano z 20 mL układu rozpuszczalników MeOH/woda (2:3). Otrzymano związek o Wzorze III.

Wydajność 68%, t.t. 201–203°C (R). Dla wzoru: $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClN}_4\text{O}_2$, $M=262,65$

obliczono: C, 50,30; H, 2,69; N, 21,33;

otrzymano: C, 50,22; H, 2,68; N, 21,29.

IR (KBr, cm^{-1}): 3090 (OH + $\text{C}_{\text{AR}}\text{-H}$), 1627 (C=N), 1564 (C=C), 1539 (C=C), 1473, 1416, 1304, 1233, 1185 (C-OH), 1133, 1086, 1013, 973, 844, 810, 779, 745, 704;

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 11,20 (s, 1H, C₂-OH), 9,95 (s, 1H, C₄-OH), 8,52 (d, $J=9,8$ Hz, 1H, C₈-H), 8,13 (d, $J=8,2$ Hz, 1H, C₆-H), 7,54 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, C₇-H), 8,0 (dd, $J=7,8$ i 2,4 Hz, 1H, C₅-H), 6,51 (d, $J=2,5$ Hz, 1H, C₃-H); MS (EI, m/z): 262 (M⁺, 21), 227 (10), 205 (5), 199 (18), 171 (8), 121 (9), 168 (85), 108 (2), 79(4), 52 (4), 39 (5).

Przykład 2 – Wzór IV

6-chloro-3-(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pirydazyna

0,0017 mola 3-chloro-6-hydrazynopirydazyny oraz 0,0017 mola S3MTB przenoszono do 8,5 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu 2,5 h. Mieszaninę poreakcyjną na gorąco przefiltrowano przez lejek Büchnera. Otrzymano osad I i przesącz I, przy czym osad I odrzucono. Przesącz I zatężono a wydzielony osad II przekrystalizowano z układu rozpuszczalników metanol/woda (4 mL) (2:3). Otrzymano związek o wzorze IV.

Wydajność 73%, t.t. 151–152°C. Dla wzoru: C₁₂H₉ClN₄O₂, M=276,68

obliczono: C, 52,09; H, 3,28; N, 20,25;

otrzymano: C, 51,94; H, 3,30; N, 20,18.

IR (KBr, cm⁻¹): 3434, 3099 (OH), 3043 (C_{AR}-H), 2924 (CH), 1621 (C=N), 1533 (C=C), 1459, 1386, 1323, 1267, 1235, 1206, 1168 (C-OH), 1134, 1085, 1054, 951, 894, 855, 814, 795, 778, 758, 742, 707, 628;

^1H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 11,62 (s, 1H, C₂-OH), 9,99 (s, 1H, C₄-OH), 8,55 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, C₈-H), 8,24 (d, $J=8,5$ Hz, 1H, C₆-H), 7,58 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, C₇-H), 6,62 (d, $J=8,7$ Hz, 1H, C₅-H), 2,10 (s, 3H, CH₃); MS (EI, m/z): 276 (M⁺, 53), 241 (100), 213 (3), 138 (3), 94 (8), 64 (5), 39 (5).

Przykład 3 – Wzór V

6-chloro-3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pirydazyna

0,0017 mola 3-chloro-6-hydrazynopirydazyny oraz 0,0017 mola SEBT przenoszono do 8,5 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę poreakcyjną na gorąco przefiltrowano przez lejek Büchnera. Otrzymano osad I i przesącz I, przy czym osad I odrzucono. Przesącz I zatężono a wydzielony osad II przekrystalizowano z układu rozpuszczalników metanol/woda (5 mL) (3:1). Otrzymano związek o wzorze V. Wydajność 71%, t.t. 141–143°C. Dla wzoru: C₁₃H₁₁ClN₄O₂, M=290,71

obliczono: C, 53,71; H, 3,81; N, 19,27;

otrzymano: 53,84; H, 3,80; N, 19,36.

IR(KBr, cm⁻¹): 2965 (OH, C_{AR}-H), 2924 (CH), 1617 (C=N), 1559 (C=C), 1439,1407, 1274, 1245, 1141, 1089, 1039, 1013, 972, 930, 903, 846, 802, 766, 744;

^1H NMR(500 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 9,95 (s, 1H, C₄-OH), 8,51 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, C₈-H), 7,79 (s, 1H, C₆-H), 7,54 (d, $J=9,7$, 1H, C₇-H), 6,56 (s, 1H, C₃-H), 2,54 (m, 2H, CH₂CH₃), 1,16 (t, 3H, CH₂CH₃); MS (EI, m/z): 290 (M⁺, 32), 277 (33), 275 (100), 78 (4), 69 (5), 64 (4).

Przykład 4 – Wzór VI

6-chloro-3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pirydazyna

0,0017 mola 3-chloro-6-hydrazynopirydazyny oraz 0,0017 mola SCITB przenoszono do 8,5 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej i przefiltrowano przez lejek Büchnera. Otrzymano osad I i przesącz I, przy czym osad I odrzucono. Przesącz I zatężono a wydzielony osad II przekrystalizowano z układu rozpuszczalników metanol/woda (2:3). Otrzymano związek o wzorze VI.

Wydajność: 69%, t.t. 167–168°C. Dla wzoru: C₁₁H₆Cl₂N₄O₂, M=297,10 obliczono: C, 44,47; H, 2,04; N, 18,86; otrzymano: C, 44,38; H, 2,03; N, 18,92.

IR (KBr, cm⁻¹): 3419 (OH), 3086 (C_{AR}-H), 2922 (C-H), 1611 (C=N), 1562 (C=C), 1539 (C=C), 1493, 1478, 1410, 1337, 1298, 1261, 1234, 1183 (C-OH), 1158, 1095, 1057, 1018, 991, 944, 898, 837, 783, 757, 739;

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm) 11,82 (s, 1H, C₂-OH), 10,87 (s, 1H, C₄-OH), 8,54 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, C₈-H), 7,94 (s, 1H, C₆-H), 7,57 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, C₇-H), 6,56 (s, 1H, C₃-H); MS (EI, m/z, B): 297 (M⁺, 2), 296 (100), 262 (13), 233 (12), 205 (6), 170 (12), 158 (6), 142 (10), 134 (5), 99 (7), 79 (5), 69 (7), 51 (5), 38 (15), 36 (44).

Przykład 5 – Wzór VII

6-Chloro-3-(2,3,4-trihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-b]pirydazyn

0,0017 mola 3-chloro-6-hydrazynopirydazyny oraz 0,0017 mola sulfotlenku bis[(2,3,4-trihydroksyfenylo)metanotyonu] (S3TTB) przenoszono do 8,5 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę poreakcyjną przefiltrowano na gorąco przez lejek Büchnera. Otrzymano osad I i przesącz I,

przy czym osad I odrzucono. Przesącz I zatężono, a wydzielony osad II przekrystalizowano z układu rozpuszczalników metanol/woda (2:3) (4 mL). Otrzymano związek o wzorze VII.

Wydajność 63%, t.t. 172–172°C. Dla wzoru: $C_{11}H_7N_4O_2Cl$, $M=278,66$

obliczono: C, 47,41; H, 2,53; N, 20,11;

otrzymano: C, 47,50; H, 2,50; N, 20,16.

IR (KBr, cm^{-1}): 3397 (OH), 3228 (OH), 1630 (C=N), 1508 (C=C), 1479, 1420, 1328, 1297, 1231, 1174 (C-OH), 1083, 1010, 980, 897, 801, 720;

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 11,81 (s, 1H, C_2 -OH), 10,32 (s, 1H, C_4 -OH), 8,85 (s, 1H, C_3 -H), 8,54 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, C_8 -H), 7,87 (d, $J=9,7$ Hz, 1H, C_7 -H), 6,65 (d, $J=7,3$ Hz, 1H, C_6 -H), 6,52 (d, $J=7,3$ Hz, 1H, C_5 -H); MS (EI, m/z): 278 (M^{+} , 21), 276 (14), 258 (7), 244 (17), 215 (12), 200 (51), 168 (85), 158 (10), 152 (39), 128 (13), 112 (25), 95 (13), 79 (32), 72 (15), 69 (30), 45 (24), 39 (36), 36 (49).

Przykład 6 – Wzór VIII

3-(2,4-dihydroksyfenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-a]pirymidyna

0,0014 mola 2-hydrazyno-(4-trifluorometylo)pirymidyny oraz 0,0014 mola STB przenoszono do 7 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej i przefiltrowano przez lejek Büchnera. Otrzymano osad I i przesącz I, przy czym osad I odrzucono. Przesącz I zatężono i dodano 12 mL układu rozpuszczalników metanol/woda (1:1). Wydzielony osad II przekrystalizowano z 6 mL metanolu. Otrzymano związek o wzorze VIII. Wydajność 66%, t.t. 185–186°C. Dla wzoru: $C_{12}H_7F_3N_4O_2$, $M=296,19$

obliczono: C, 48,66; H, 2,38; N, 18,91;

otrzymano: C, 48,54; H, 2,37; N, 18,86.

IR (KBr, cm^{-1}): 3201, 3117 (OH), 1630 (C=N), 1587 (C=C), 1555 (C=C), 1528, 1455, 1432, 1402, 1375, 1337, 1302, 1274, 1201 (C-OH), 1159, 1087, 1005, 978, 969, 866, 819, 784, 776, 761, 716, 686, 653, 640.

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$, δ): 10,94 (s, 1H, C_2 -OH), 10,13 (s, 1H, C_4 -OH), 9,75 (d, $J=6,9$ Hz, 1H, C_6 -H), 7,97 (d, $J=8,6$ Hz, 1H, C_6 -H), 7,89 (d, $J=6,9$ Hz, 1H, C_5 -H), 6,50 (d, $J=8,6$ i 2,3 Hz, 1H, C_5 -H), 6,42 (d, $J=2,3$ Hz, 1H, C_3 -H); MS (EI, m/z): 296 (M^{+}), 278, 340, 227, 166, 121, 109, 80, 52, 40.

Przykład 7 – Wzór IX

3-(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-a]pirymidyna

0,0014 mola 2-hydrazyno-4-(trifluorometylo)pirymidyny oraz 0,0014 mola S3MTB przenoszono do 7 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę poreakcyjną na gorąco przefiltrowano przez lejek Büchnera. Otrzymano osad I i przesącz I. Przesącz I zatężono, a wydzielony osad II połączono z osadem I, przefiltrowano i przekrystalizowano z 4 mL układu rozpuszczalników metanol/woda (3:1). Otrzymano związek o wzorze IX.

Wydajność 82%, t.t. 280–281°C. Dla wzoru: $C_{13}H_9F_3N_4O_2$, $M=310,23$ obliczono: C, 50,33; H, 2,92; N, 18,06; otrzymano: C, 50,41; H, 2,92; N, 18,02.

IR (KBr, cm^{-1}): 3176 (OH), 2927 (C-H), 1617 (C=N), 1553 (C=C), 1436, 1402, 1382, 1341, 1294, 11592 (C-OH), 1154, 1101, 1074, 1014, 966, 910, 877, 859, 821, 798, 784, 770, 728, 715;

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$, δ , ppm): 11,23 (s, 1H, C_2 -OH), 10,02 (s, 1H, C_4 -OH), 9,75 (d, $J=6,9$ Hz, 1H, C_6 -H), 7,89 (d, $J=6,9$ Hz, 1H, C_5 -H), 7,84 (d, $J=8,6$ Hz, 1H, C_6 -H), 6,57 (d, $J=8,6$ Hz, 1H, C_5 -H), 2,08 (s, 3H, CH_3); MS (EI, m/z, B): 310 (M^{+} , 100), 296 (6), 281 (10), 265 (4), 253 (4), 223 (3), 164 (16), 148 (11), 119 (4), 94(4), 65 (4), 39(4).

Przykład 8 – Wzór X

3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-a]pirymidyna

0,0014 mola 2-hydrazyno-4-(trifluorometylo)pirymidyny oraz 0,0014 mola sulfotlenku bis[(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotyonu] (SETB) przenoszono do 7 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu (3 h). Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej, po czym przefiltrowano. Otrzymano przesącz I i osad I, przy czym osad I odrzucono. Przesącz I zatężono do sucha, dodano 5 ml eteru dietylowego, wymieszano i pozostawiono na (1 h) w temperaturze pokojowej. Po przefiltrowaniu otrzymany osad II przekrystalizowano z 5 mL układu rozpuszczalników metanol/woda (3:2).

Wydajność 76%, t.t. 196°C. Dla wzoru: $C_{14}H_{11}F_3N_4O_2$, $M=324,26$

obliczono: C, 51,86; H, 3,42; N, 17,28;

otrzymano: C, 51,78; H, 3,44; N, 17,21.

IR (KBr, cm^{-1}): 3245 (OH), 3057 ($\text{C}_{\text{AR}}\text{-H}$), 2948 (C-H), 1623 (C=N), 1592 (C=N), 1507 (C=C), 1492, 1451, 1370, 1328, 1275, 1247, 1218 (C-OH), 1186, 1144, 1039, 1008, 922, 835, 791, 763, 730;
 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 10,76 (s, 1H, $\text{C}_2\text{-OH}$), 10,11 (s, 1H, $\text{C}_4\text{-OH}$), 9,76 (d, $J=6,9$ Hz, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$), 7,90 (d, $J=6,7$ Hz, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$), 7,84 (s, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$), 6,40 (s, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 2,55 (q, 2H, CH_2CH_3), 1,17 (s, 3H, CH_2CH_3); MS (EI, m/z, B): 324 ($\text{M}^{+\bullet}$, 38), 309 ($\text{M}^{+\bullet}\text{-CH}_3$, 100), 212 (15), 181 (24), 164 (8), 165 (16), 149 (6), 121 (3), 68 (8), 65 (5), 39 (4).

Przykład 9 – Wzór XI

3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenilo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-a]pirymidyna

0,0014 mola 2-hydrazyno-4-(trifluorometylo)pirymidyny oraz 0,0014 mola SCITB przenoszono do 7 mL metanolu i ogrzewano we wrzeniu 3 h. Mieszaninę poreakcyjną pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej i przefiltrowano przez lejek Büchnera. Otrzymano osad I i przesącz I. Przesącz I zatężono a uzyskany osad II połączono z osadem I. Mieszaninę osadów przekrystalizowano z układu rozpuszczalników metanol/woda (1:1) (6 mL). Otrzymano związek o wzorze XI. Wydajność: 68%, t.t. 188–189°C. Dla wzoru: $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_2$, $M=330,65$

obliczono: C, 43,59; H, 1,83; N, 16,94;

otrzymano: C, 43,66; H, 1,82; N, 17,00.

IR (KBr, cm^{-1}): 3260 (OH), 3072 ($\text{C}_{\text{AR}}\text{-H}$), 2954 (C-H), 2849 (C-H), 1606 (C=N), 1583 (C=C), 1484, 1445, 1364, 1335, 1304, 1273, 1252, 1224, 1192 (C-OH), 1159, 1142, 1050, 1000, 909, 829, 789, 758, 724;

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 10,94 (s, 1H, $\text{C}_2\text{-OH}$), 10,47 (s, 1H, $\text{C}_4\text{-OH}$), 8,79 (d, $J=4,9$ Hz, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$), 8,14 (s, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$), 7,28 (d, $J=4,9$ Hz, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$), 6,65 (s, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$); MS (EI, m/z, B): 331 ($\text{M}^++1,67$), 330 (M^+ , 2), 261 (3), 189 (34), 187 (100), 178 (4), 164 (5), 131 (6), 94 (4), 69 (6).

Użytą w powyższych przykładach 3-chloro-6-hydrazynopirydazynę (3-chloro-6-hydrazinopyridazine) zakupiono wg katalogu Aldrich, nr kat. 632619, zaś 2-hydrazyno-4-(trifluorometylo)pirymidynę {N-[4-(trifluoromethyl)pirimidin-2-yl]hydrazine lub 2-hydrazyno-4-(trifluoromethyl)pirimidine} zakupiono wg katalogu Fluorochem, nr kat. 017278.

Przykład porównawczy

Otrzymane związki 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 ID_{50} (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 ID_{50} nie wyższy niż 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [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 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Jako kontrolę zastosowano cisplatynę w stężeniach 100, 10, 1, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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% CO_2 w 37°C.

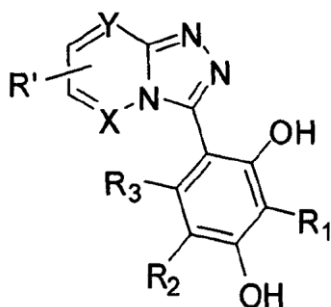
Badania wykonano w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Tabela 1. Aktywność antyproliferacyjna związków

Przykład	R	HCV29T	A549	T47D	SW707
		ID ₅₀ [μg/mL]			
1	R ₁ =R ₂ =R ₃ = =H	10,03 ± 2,50	3,40 ± 1,10	7,10 ± 0,20	1,80 ± 1,40
2	R ₁ =-CH ₃	20,70 ± 4,84	nie badano	nie badano	nie badano
3	R ₂ =-C ₂ H ₅	4,29 ± 0,84	26,26 ± 8,89	12,87 ± 4,41	4,25 ± 0,87
4	R ₂ =-C ₂ H ₅	9,23 ± 0,14	nie badano	nie badano	nie badano
5	R ₁ =-OH	34,12 ± 11,60	nie badano	nie badano	nie badano
6	R ₁ =R ₂ =R ₃ = =H	3,91 ± 0,43	5,30 ± 2,64	0,61 ± 0,30	3,28 ± 0,56
7	R ₁ =-CH ₃	32,37 ± 5,08	nie badano	nie badano	nie badano
8	R ₂ =-C ₂ H ₅	10,11 ± 3,55	nie badano	nie badano	nie badano
9	R ₂ =-Cl	3,53 ± 0,14	4,29 ± 0,36	1,34 ± 0,65	3,20 ± 0,18
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-triazoli 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-

R = H, Cl, Br, F₃C-

X = N, Y=CH albo X = CH, Y=N.

2. Analog według zastrz. 1 **znamienny tym**, że stanowi go 6-chloro-3-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna.

3. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 6-chloro-3-(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna.

4. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 6-chloro-3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo [4,3-*b*]pirydazyna.

5. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 6-chloro-3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna.

6. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 6-chloro-3-(2,3,4-trihydroksyfenylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pirydazyna.

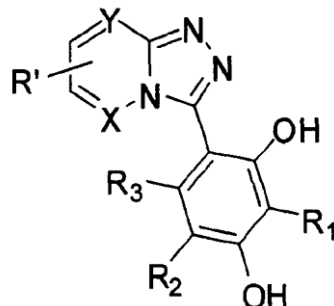
7. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(2,4-dihydroksyfenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo [4,3-*a*]pirymidyna.

8. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pirymidyna.

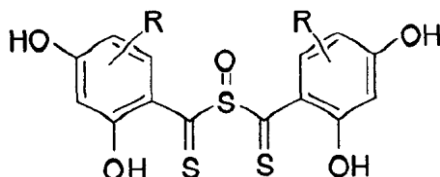
9. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo[4,3-a]pirymidyna.

10. Analog według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stanowi go 3-(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)-7-(trifluorometylo)-1,2,4-triazolo [4,3-a]pirymidyna.

11. Sposób otrzymywania analogów 1,2,4-triazoli 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 heteroarylohydrazynę z substancją o Wzorze ogólnym II:



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

po czym uzyskaną mieszaninę poreakcyjną rozdziela się na osad I i przesącz I, który następnie zatęża się, po czym uzyskany osad II krystalizuje się z wodnego roztworu jednowodorotlenowego alkoholu.

12. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że osad I łączy się z osadem II.

13. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że heteroarylohydrazynę stanowi 3-chloro-6-hydrazynopirydazyna.

14. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że heteroarylohydrazynę stanowi 2-hydrazyno-4-(trifluorometylo)pirymidyna.

15. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że substancję o Wzorze ogólnym II stanowi sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu].

16. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że substancję o Wzorze ogólnym II stanowi sulfotlenek bis[(5-etylo-2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu].

17. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że substancję o Wzorze ogólnym II stanowi sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksy-3-metylofenylo)metanotionu].

18. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że substancję o Wzorze ogólnym II stanowi sulfotlenek bis[(5-chloro-2,4-dihydroksyfenylo)metanotionu].

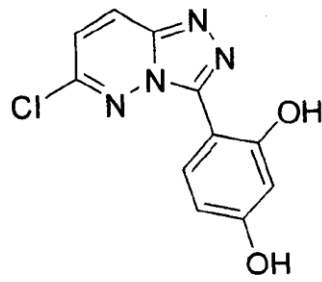
19. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że substancję o Wzorze ogólnym II stanowi sulfotlenek bis[(2,3,4-trihydroksyfenylo)metanotionu].

20. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że substancję o Wzorze ogólnym II stanowi sulfotlenek bis[(2,4-dihydroksy-5-metylofenylo)metanotionu].

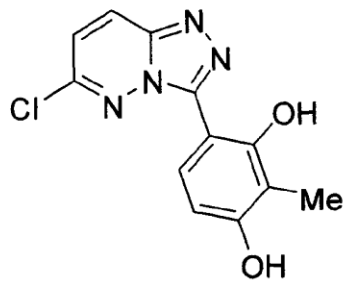
21. Sposób według zastrz. 11, **znamienny tym**, że jednowodorotlenowy alkohol stanowi etanol albo metanol.

Rysunki

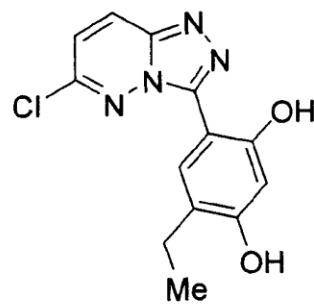
Wzór III



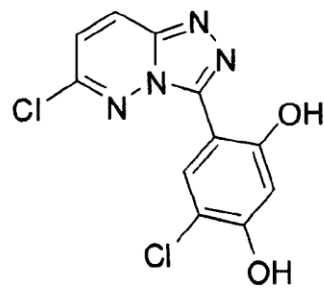
Wzór IV



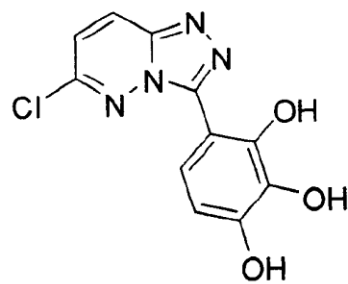
Wzór V



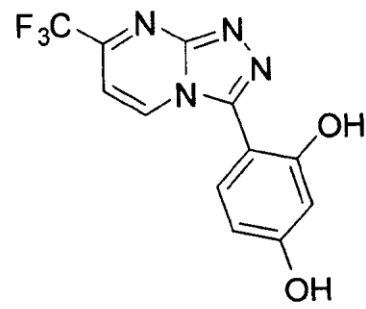
Wzór VI



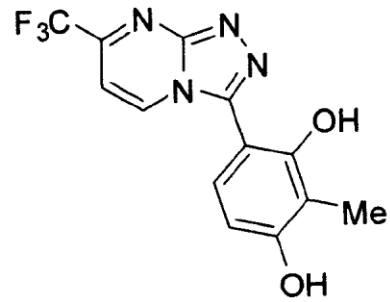
Wzór VII



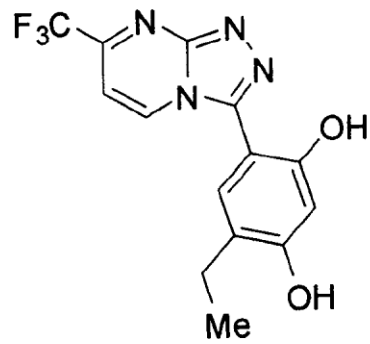
Wzór VIII



Wzór IX



Wzór X



Wzór XI

