



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **427994**

(22) Data zgłoszenia: **30.11.2018**

(51) Int. Cl.
C07D 487/12 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenylo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b]-
[1,2,4]triazyny, sposób ich wytwarzania, ich zastosowania oraz kompozycja
farmaceutyczna zawierająca chiralną sulfonamidową pochodną
5-fenylo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
01.06.2020 BUP 12/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
14.06.2021 WUP 12/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny
w Białymstoku, Białystok, PL
UNIwersytet Przyrodniczo-
-humanistyczny w Siedlcach, Siedlce, PL
UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANNA BIELAWSKA, Jurowce, PL
KRZYSZTOF BIELAWSKI, Jurowce, PL
MARIUSZ MOJZYCH, Siedlce, PL
KATARZYNA KOTWICA-MOJZYCH, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marta Kawczyńska

Opis wynalazku

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe, chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowania związane z aktywnością przeciwnowotworową, cytotoksyczną i/lub cytostatyczną, w szczególności względem komórek nowotworowych, zwłaszcza komórek raka sutka, jak również kompozycje farmaceutyczne je zawierające.

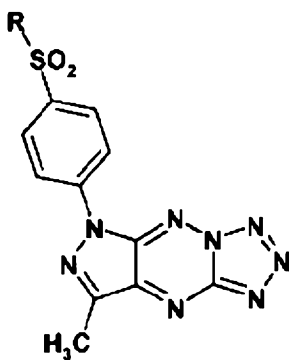
Ze stanu techniki znana jest pochodna 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny, która wykazuje działanie przeciwnowotworowe, jak również znane są sposoby jej syntezy (Mojzych M, *Chem. Soc. Pak.*, 2011, 33, 123–128; Mojzych M, Rykowski A, *Heterocycles*, 2004, 63, 1829–1838).

Z patentu nr PL-198966 oraz z piśmiennictwa (Mojzych M, Rykowski A, *Heterocycles*, 2004, 63, 1829–1838) znana jest 5-fenilo-7-metylo-1*H*-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyna oraz synteza 1-fenilo-3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny.

Celem niniejszego wynalazku było dostarczenie nowych związków nadających się do leczenia nowotworu, zwłaszcza raka sutka, w szczególności zaś związków o działaniu cytotoksycznym, cytostatycznym i antyproliferacyjnym. Celem niniejszego wynalazku było także dostarczenie sposobu wytwarzania takich związków oraz kompozycji farmaceutycznych do leczenia nowotworu, zwłaszcza raka sutka.

Cele te zrealizowano przy pomocy rozwiązań przedstawionych w załączonych zastrzeżeniach patentowych. Nieoczekiwanie stwierdzono bowiem, że cele te można zrealizować z zastosowaniem chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny.

Przedmiotem wynalazku jest chiralna pochodna 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o ogólnym wzorze 1:



wzór 1

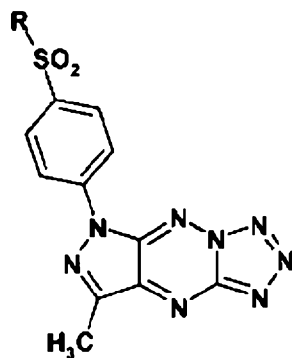
w którym R oznacza grupę wybraną z grupy składającej się z grupy (S)-(+)-2-amino-1-butanolowej, grupy (R)-(-)-2-amino-1-butanolowej, grupy (S)-(+)-2-amino-3-metylo-1-butanolowej, grupy (R)-(-)-2-amino-3-metylo-1-butanolowej, grupy (S)-(+)-1-amino-2-propanolowej, grupy (R)-(-)-1-amino-2-propanolowej, grupy (S)-(+)-leucynolowej, grupy (R)-(-)-leucynolowej, grupy (S)-(+)-3-amino-1,2-propanodiolowej, grupy (R)-(-)-3-amino-1,2-propanodiolowej, grupy (S)-(+)-2-amino-1-propanolowej i grupy (R)-(-)-2-amino-1-propanolowej.

Korzystnie w związku o wzorze 1 według wynalazku R oznacza grupę (S)-(+)-1-amino-2-propanolową.

Korzystnie w związku o wzorze 1 R oznacza grupę (S)-(+)-leucynolową.

Korzystnie w związku o wzorze 1 według wynalazku R oznacza grupę (S)-(+)-2-amino-1-propanolową.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto sposób wytwarzania chiralnej pochodnej sulfonamidowej 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1.



wzór 1

w którym R oznacza grupę wybraną z grupy składającej się z grupy (S)-(+)-2-amino-1-butanolowej, grupy (R)-(-)-2-amino-1-butanolowej, grupy (S)-(+)-2-amino-3-metylo-1-butanolowej, grupy (R)-(-)-2-amino-3-metylo-1-butanolowej, grupy (S)-(+)-1-amino-2-propanolowej, grupy (R)-(-)-1-amino-2-propanolowej, grupy (S)-(+)-leucynolowej, grupy (R)-(-)-leucynolowej, grupy (S)-(+)-3-amino-1,2-propanodiolowej, grupy (R)-(-)-3-amino-1,2-propanodiolowej, grupy (S)-(+)-2-amino-1-propanolowej i grupy (R)-(-)-2-amino-1-propanolowej, znamienny tym, że 1-fenilo-3-metylo-5-metylosulfonylo-1H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazynę przekształca się w odpowiednią 1-(para-chlorosulfonylofenylo)-3-metylo-5-metylosulfonylo-1H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazynę w reakcji z kwasem chlorosulfonowym, a następnie tak otrzymaną pochodną chlorosulfonową poddaje reakcji z enancjomerem chiralnego aminoalkoholu wybranym z grupy składającej się z (R)-(-)-1-amino-2-propanolu, S-(+)-1-amino-2-propanolu, R-(+)-2-amino-1-propanolu, S-(+)-2-amino-1-propanolu, R-(+)-2-amino-3-metylo-1-butanolu, S-(+)-2-amino-3-metylo-1-butanolu, R-3-amino-1,2-propanediolu, S-3-amino-1,2-propanediolu, R-(+)-leucynolu, S-(+)-leucynolu, (R)-(+)-2-amino-1-butanolu i (S)-(+)-2-amino-1-butanolu, po czym prowadzi się reakcję substytucji nukleofilowej z azydkiem sodu w bezwodnym etanolu.

Korzystnie otrzymaną tak chiralną pochodną sulfonamidową 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny oczyszcza się ponadto chromatograficznie, korzystnie z zastosowaniem chromatografii cieczowej.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto chiralna pochodna jak określono powyżej do zastosowania jako lek.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto chiralna pochodna jak określono powyżej do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto chiralna pochodna jak określono powyżej do zastosowania jako lek do leczenia raka sutka.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto chiralna pochodna jak określono powyżej do zastosowania jako środek cytostatyczny.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto chiralna pochodna jak określono powyżej do zastosowania jako środek cytotoksyczny.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto kompozycja farmaceutyczna, charakteryzująca się tym, że zawiera chiralną pochodną jak określono powyżej oraz farmaceutycznie akceptowalny nośnik, rozcieńczalnik lub zaróbkę.

Korzystnie kompozycja według wynalazku zawiera jako składnik aktywny chiralną pochodną o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza grupę (S)-(+)-1-amino-2-propanolową.

Korzystnie kompozycja według wynalazku zawiera jako składnik aktywny zawiera chiralną pochodną o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza grupę (S)-(+)-leucynolową.

Korzystnie kompozycja według wynalazku zawiera jako składnik aktywny zawiera chiralną pochodną o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza grupę (S)-(+)-2-amino-1-propanolową.

Chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 będące przedmiotem niniejszego zgłoszenia patentowego mają w pełni odmienną strukturę od związków opisanych w piśmiennictwie i charakteryzują się tym, że podstawnik R w ogólnym wzorze 1 oznacza grupę (S)-(+)-1-amino-2-propanolową, (R)-(-)-1-amino-2-propanolową, (S)-(+)-2-amino-1-propanolową, (R)-(-)-2-amino-1-propanolową, (S)-(+)-2-amino-3-metylo-1-butanolową, (R)-(-)-2-amino-3-metylo-1-butanolową, (S)-(+)-3-amino-1,2-propanodiolową, (R)-(-)-2-amino-

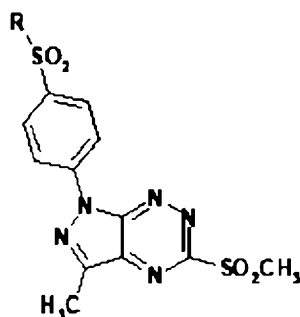
-1,2-propanodiolową, (S)-(+)-leucynolową, (R)-(-)-leucynolową, (S)-(+)-2-amino-1-butanolową lub (R)-(-)-2-amino-1-butanolową.

W wyniku przeprowadzonych prób i badań okazało się, że związki według wynalazku, o ogólnym wzorze 1, wykazują działania przeciwnowotworowe, cytotoksyczne, cytostatyczne i antyproliferacyjne względem komórek nowotworowych, w szczególności komórek raka sutka, i mogą być zatem stosowane jako leki, w szczególności leki do leczenia nowotworów, zwłaszcza raka sutka. Dzięki swoim właściwościom związki według wynalazku mogą być także stosowane jako środki cytostatyczne i/lub cytotoksyczne.

Wyniki badań biologicznych dla związków według wynalazku przedstawiono w przykładach, w szczególności w Tabeli 2 (związki numer 1 do 12).

Chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny będące przedmiotem niniejszego zgłoszenia patentowego otrzymywane są nowym sposobem wytwarzania, innym niż sposoby wytwarzania znane w stanie techniki.

Sposób wytwarzania chiralnej pochodnej sulfonamidowej 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku polega na wprowadzeniu do 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny chiralnego podstawnika sulfonamidowego. W pierwszym etapie syntezy znaną 1-fenilo-3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazynę przekształca się w odpowiednią 1-(para-chlorosulfonylofenilo)-3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazynę poprzez reakcję z kwasem chlorosulfonowym. W kolejnym etapie tak otrzymaną pochodną chlorosulfonową poddaje się reakcji z odpowiednim enancjomerem chiralnego aminoalkoholu. Odpowiedni enancjomer chiralnego aminoalkoholu wybierany jest z grupy składającej się z: (R)-(-)-1-amino-2-propanolu, S-(+)-1-amino-2-propanolu, R-(+)-2-amino-1-propanolu, S-(+)-2-amino-1-propanolu, R-(+)-2-amino-3-metyl-1-butanolu, S-(+)-2-amino-3-metyl-1-butanolu, R-3-amino-1,2-propanediolu, S-3-amino-1,2-propanediolu, R-(+)-leucynolu, S-(+)-leucynolu, (R)-(+)-2-amino-1-butanolu i (S)-(+)-2-amino-1-butanolu, w zależności odżądanego produktu końcowego sposobu wytwarzania według wynalazku. W tej wyniku reakcji otrzymuje się odpowiednią chiralną pochodną sulfonamidową o ogólnym wzorze 2:



wzór 2

w którym R oznacza grupę jak zdefiniowano we wzorze 1, którą następnie poddaje się reakcji z azydkiem sodu w bezwodnym etanolu z otrzymaniem odpowiedniej chiralnej pochodnej sulfonamidowej 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1.

Otrzymaną tak nową chiralną pochodną sulfonamidową 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku można korzystnie oczyszczać chromatograficznie, na przykład z zastosowaniem chromatografii cieczowej.

Przykładowy sposób wytwarzania reprezentatywnej chiralnej pochodnej sulfonamidowej 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku przedstawiono w przykładzie 1. Wzory stosowanych grup aminowych (podstawnik R w ogólnym wzorze 1) obecnych w nowych chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku przedstawiono w załączonej Tabeli 1. W Tabeli 1 podano także odpowiednie temperatury topnienia i wydajności otrzymywania związków według wynalazku (związki numer 1 do 12).

Chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku można stosować w zastosowaniach według wynalazku w postaci kompozycji farmaceutycznych. Kompozycja farmaceutyczna według wynalazku zawiera,

oprócz związku według wynalazku jako składnika aktywnego, farmaceutycznie akceptowalny nośnik, rozcieńczalnik lub zaróbkę. Farmaceutycznie akceptowalne nośniki, rozcieńczalniki i zaróbki są znane specjalistom w dziedzinie niniejszego wynalazku i obejmują ciekłą lub nieciekłą bazę kompozycji. Określenie „akceptowalny” oznacza tu, że składniki stosowanej tu kompozycji farmaceutycznej mogą być zmieszane z farmaceutycznie aktywnym składnikiem jak tu zdefiniowano, czyli jednym i/lub więcej niż jednym związkiem według wynalazku, i innym składnikiem w taki sposób, że nie wystąpi żadna interakcja, która mogłaby, w zwykłych warunkach stosowania, istotnie zmniejszyć farmaceutyczną skuteczność kompozycji. Stosowane farmaceutycznie akceptowalne nośniki, rozcieńczalniki i zaróbki muszą posiadać wystarczająco wysoką czystość i wystarczająco niską toksyczność, żeby czynić je odpowiednimi do podawania osobnikowi, który ma być leczony, jak wiadomo w dziedzinie niniejszego wynalazku. Kompozycję farmaceutyczną według wynalazku można wytwarzać w standardowy sposób. Sposoby wytwarzania kompozycji farmaceutycznych zawierających co najmniej jeden składnik aktywny i farmaceutycznie akceptowalny nośnik, rozcieńczalnik lub zaróbkę są znane w dziedzinie niniejszego wynalazku. Kompozycje farmaceutyczne według wynalazku zawierające jako składnik aktywny co najmniej jeden związek według wynalazku można stosować do leczenia nowotworów, zwłaszcza raka sutka.

Oznaczanie aktywności przeciwnowotworowej nowosyntetyzowanych chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku przeprowadzono w warunkach *in vitro*. Badania aktywności przeciwnowotworowej przeprowadzono zarówno z wykorzystaniem komórek estrogenozależnego raka sutka MCF-7 jak i komórek estrogenoniezależnego raka sutka MDA-MB-231. W skrócie, na hodowlach komórek estrogenozależnego raka sutka MCF-7 oraz estrogenoniezależnego raka sutka MDA-MB-231 przeprowadzono pomiar działania cytotoksycznego i cytostatycznego chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku, a także oceniono wpływ takich chiralnych pochodnych według wynalazku na biosyntezę DNA badanych linii komórek nowotworowych. Pomiar działania cytotoksycznego i cytostatycznego chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku wykonano metodą Carmichael'a, określając żywotność komórek przy użyciu soli tetrazolowej (MTT) w badaniu MTT. Jest to badanie kolorymetryczne, wykorzystujące aktywność oksydoredukcyjną mitochondriów komórek. W żywych komórkach, pod wpływem mitochondrialnej dehydrogenazy, zastosowany barwnik ulega przekształceniu z żółtej soli tetrazolowej do purpurowego formazanu. Przemiana ta nie zachodzi w martwych komórkach. Żywotność komórek inkubowanych w obecności badanych chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku przedstawiano jako procent wartości kontrolnych. Badanie wpływu chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku na proces biosyntezy DNA przeprowadzono na liniach komórkowych raka sutka, poprzez pomiar wbudowywania [³H]-tymidyny do DNA badanych komórek nowotworowych. Dokładny, przykładowy opis oznaczania aktywności przeciwnowotworowej nowosyntetyzowanych chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku w warunkach *in vitro* przedstawiono w przykładzie 2. W Tabeli 2 zestawiono wyniki badania aktywności cytotoksycznej, cytostatycznej i antyproliferacyjnej chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku.

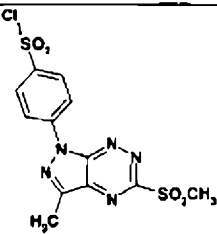
Przeprowadzone badania wykazały, że chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku wykazują zarówno działanie cytostatyczne, jak i działanie cytostatyczne. Przeprowadzone badania wykazały też, że chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku wykazują aktywność przeciwnowotworową, zarówno w przypadku komórek nowotworowych estrogenozależnego raka sutka (MCF-7), jak i w przypadku komórek nowotworowych estrogenoniezależnego raka sutka (MDA-MB-231). Przeprowadzone badania pokazują zatem, że chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku można stosować jako leki, zwłaszcza leki przeciwnowotworowe, do leczenia nowotworów, zwłaszcza raka sutka, zarówno estrogenozależnego jak i estrogenoniezależnego. Przeprowadzone badania pokazują również, że chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku mogą być stosowane jak środki cytostatyczne, a także jako środki cytotoksyczne.

Niniejszy wynalazek zostanie poniżej zilustrowany za pomocą przykładów wykonania, które nie mają jednak w jakikolwiek sposób ograniczać zakresu ochrony wynalazku jak zdefiniowano w zastrzeżeniach patentowych. O ile nie wskazano inaczej, stosowano znane i/lub komercyjnie dostępne urządzenia, metody, parametry, warunki reakcji, odczynniki i zestawy, takie jakie powszechnie stosuje się w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek i jakie są zalecane przez wytwórców odpowiednich odczynników i zestawów.

Przykład 1

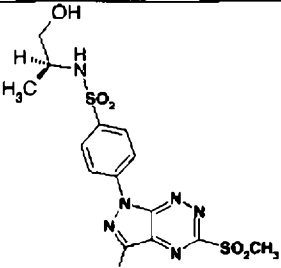
Sposób wytwarzania 1-[4-(chlorosulfonylo)fenylo]-3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo[4,3-*c*][1,2,4]triazyny

Do kolby zawierającej 2 ml kwasu chlorosulfonowego ochłodzonego w mieszaninie wody z lodem do temperatury 0–5°C dodano 1-fenylo-3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazynę (1156 mg, 4 mmole). Początkowo reakcję prowadzono w temperaturze 0–5°C, a następnie w temperaturze pokojowej przez 2 godziny kontrolując przebieg reakcji na płytkach TLC. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną wylano na wodę z lodem i ekstrahowano z chlorkiem metylenu (4 x 50 ml). Połączone ekstrakty wysuszono nad bezwodnym MgSO₄. Po odparowaniu chlorku metylenu na wyparce otrzymany surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując mieszaninę chlorek metylenu : metanol (50:1) jako eluent. Końcowy produkt otrzymano w postaci żółtego osadu.

	Wydajność 65%; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2,91 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 8,29 (d, 2H, <i>J</i> = 9,2 Hz), 8,81 (d, 2H, <i>J</i> = 9,2 Hz).
--	--

Sposób wytwarzania (5)-4-(3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo(4,3-*e*)[1,2,4]triazyn-1-*ylo*)-*N*-(1-hydroksy-propan-2-*ylo*)benzenosulfonamid

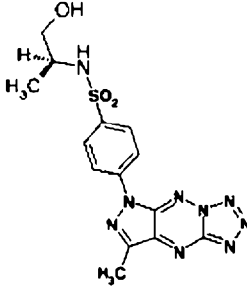
Otrzymaną w powyższy sposób pochodną chlorosulfonową (0,64 mmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu (5 ml) i dodano 3,5-krotny nadmiar (*S*)-(+)-2-amino-1-propanolu. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej do całkowitego zaniku substratu (kontrola TLC). Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik odparowano na wyparce, a otrzymany surowy produkt oczyszczono następnie na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent mieszaninę CH₂Cl₂:MeOH (25:1).

	Wydajność 75%. Temperatura topnienia: 215-219 °C; ¹H NMR (metanol) δ: 1,04 (d, 3H, <i>J</i> = 6,6 Hz), 2,85 (s, 3H), 3,35-3,38 (m, 2H), 3,49 (q, 1H, <i>J</i> = 5,8 Hz), 3,58 (s, 3H), 8,13 (d, 2H, <i>J</i> = 9,1 Hz), 8,65 (d, 2H, <i>J</i> = 8,7 Hz); ¹³C NMR (metanol) δ: 11,13, 17,99, 41,05, 52,55, 66,90, 121,37, 129,63, 139,31, 141,45, 142,31, 147,46, 149,91, 162,89;
---	---

Sposób wytwarzania 1-(*S*)-4-(7-metylo-pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyn-5-*ylo*)-*N*-(1-hydroksy-propan-2-*ylo*)benzenosulfonamidu

Otrzymaną w powyższy sposób chiralną pochodną sulfonamidową z grupą metylosulfonową (0,33 mmol) rozpuszczono w bezwodnym etanolu (3–5 ml) i dodano azydek sodu (21 mg, 0,33 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika do zaniku substratu. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymany tak surowy produkt reakcji oczyszczono. Otrzymaną w powyższy

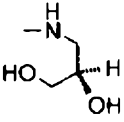
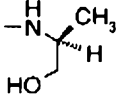
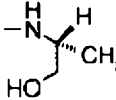
sposób chiralną pochodną sulfonamidową 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku oczyszczono następnie na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent układ CH₂Cl₂:MeOH (50:1).

 Związek numer 11	Wydajność 91%. Temperatura topnienia: 197-202 °C; ¹H NMR (metanol) δ: 1,01 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 2,85 (s, 3H), 3,47 (q, 1H, J = 5,4 Hz), 4,57 (s, 1H), 8,10 (d, 2H, J = 8,8 Hz), 8,45 (d, 2H, J = 8,8 Hz); ¹³C NMR (metanol) δ: 11,18, 17,96, 52,51, 66,88, 120,21, 129,67, 140,66, 141,94, 143,33, 148,30, 148,86, 149,33.
--	--

W analogiczny sposób jak opisano powyżej zsyntetyzowano pozostałe chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1 według wynalazku (związki 1 do 10 i 12 w Tabeli 1 poniżej), stosując odpowiednie enancjomery chiralnych aminoalkoholi podane w poniższej Tabeli 1 zamiast (S)-(+)-2-amino-1-propanolu. W poniższej Tabeli 1 podano stosowane enancjomery chiralnych aminoalkoholi oraz odpowiednie temperatury topnienia nowosyntetyzowanych chiralnych pochodnych sulfonamidowych według wynalazku oraz wydajności ich otrzymywania z zastosowaniem sposobu wytwarzania według wynalazku.

Tabela 1. Chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenylo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b]-[1,2,4]triazyny według wynalazku.

Numer związku	Stosowane grupy aminowe (podstawnik R w ogólnym wzorze 1)	Temp. topnienia °C	Wydajność (%)
1		174-176	86
2		175-177	58
3		170-174	80
4		168-172	81
5		173-176	69
6		167-172	66
7		157-160	76
8		159-161	88
9		167-171	73

Numer związku	Stosowane grupy aminowe (podstawnik R w ogólnym wzorze 1)	Temp. topnienia °C	Wydajność (%)
10		169-172	73
11		197-202	91
12		198-202	87

Przykład 2

Aktywność przeciwnowotworową, cytostatyczną, cytotoksyczną i antyproliferacyjną chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny według wynalazku badano w warunkach *in vitro* w następujący sposób.

Komórki estrogenozależnego raka sutka MCF-7 (ATCC, Manassas, VA, USA) hodowano w pożywce DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 2 mmol/dm³ glutaminy, 50 U/cm³ penicyliny, 50 µg/cm³ streptomycyny w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Następnie komórki liczone w hemocytometrze i przenoszono w ilości 1 x 10⁶ komórek na „oczko” w 1 ml pożywki hodowlanej z butelek „Costar” (Sigma, USA), w których prowadzono hodowlę, do 6-oczkowych płytek „Nunc” (Wiesbaden, Niemcy). Do przenoszenia komórek wykorzystano bezwapniowy bufor fosforanowy z dodatkiem 0,05% trypsyny i 0,02% EDTA. Po 48 godzinach pożywkę hodowlaną wymieniono na pożywkę DMEM, która nie zawierała czerwieni fenolowej i płodowej surowicy bydlęcej (FBS). Tak przygotowane komórki inkubowano przez 24 godziny z badanymi związkami i stosowano do dalszych doświadczeń.

Komórki estrogenoniezależnego raka sutka MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, VA, USA) hodowano w pożywce DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), 2 mmol/dm³ glutaminy, 50 U/cm³ penicyliny, 50 µg/cm³ streptomycyny w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂. Następnie komórki liczone w hemocytometrze i przenoszono w ilości 1 x 10⁶ komórek na „oczko” w 1 ml pożywki hodowlanej z butelek „Costar” (Sigma, USA), w których prowadzono hodowlę, do 6-oczkowych płytek „Nunc” (Wiesbaden, Niemcy). Do przenoszenia komórek wykorzystano bezwapniowy bufor fosforanowy z dodatkiem 0,05% trypsyny i 0,02% EDTA. Po 48 godzinach pożywkę hodowlaną wymieniono na pożywkę DMEM, która nie zawierała czerwieni fenolowej i płodowej surowicy bydlęcej (FBS). Tak przygotowane komórki inkubowano przez 24 godziny z badanymi związkami i użyto do dalszych doświadczeń.

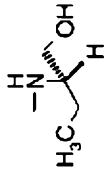
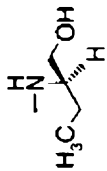
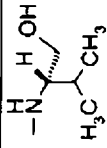
Pomiar cytotoksyczności badanych związków wykonano metodą Carmichael'a (Carmichael J et al, *Cancer Res.*, 1987, 47: 943–946), określając żywotność komórek przy użyciu soli tetrazolowej (MTT) w teście MTT. W żywych komórkach, pod wpływem mitochondrialnych dehydrogenaz, zastosowany barwnik ulega przemianom do purpurowego formazanu. Przemiana ta nie zachodzi w martwych komórkach. Komórki inkubowano 24 godziny w inkubatorze zapewniającym odpowiednie warunki, tj. w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂ wraz z pożywką zawierającą różne stężenia badanych związków. Po 24-godzinnej inkubacji komórki płukano trzy razy (3x1 ml) PBS. Następnie dodano 1 ml PBS oraz 50 µl MTT o stężeniu 5 mg/cm³ PBS i kontynuowano inkubację przez 4 godziny. Po upływie wymaganego czasu podłoże usunięto, a do komórek dodano 1 ml 0,1 M kwasu solnego w absolutnym izopropanolu i komórki odstawiono na 10 minut. W tak przygotowanym lizacie komórek mierzono absorbancję przy długości fali 630 nm. Wynik absorbancji uzyskany w hodowlach komórek

kontrolnych przyjęto za 100%. Natomiast żywotność komórek inkubowanych w obecności badanych związków przedstawiono jako procent wartości kontrolnych. Poziom istotności p wyznaczono nieparametrycznym testem U Manna-Whitney'a za pomocą programu SigmaStat. Wyniki przy poziomie istotności $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie. Wartości IC_{50} (ang. inhibitory concentration 50 – stężenie powodujące 50-procentową redukcję przeżywalności komórek) dla linii MCF-7 i MDA-MB-231 wyznaczono na podstawie analizy zależności zastosowanych stężeń badanych związków i stopnia przeżywalności komórek za pomocą programu Statistica 10 PL.

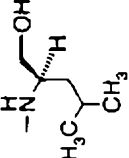
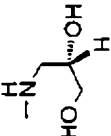
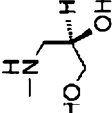
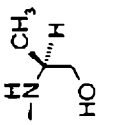
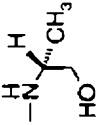
Ponadto oceniono wpływ związków według wynalazku na proces biosyntezy DNA poprzez pomiar wbudowywania [3H]-tymidyny do DNA badanych komórek. Komórki inkubowano 24 godziny w inkubatorze zapewniającym odpowiednie warunki, tj. w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO_2 wraz z pożywką zawierającą różne stężenia badanych związków. Badane związki dodano do pożywki hodowlanej i inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie pożywkę wymieniono na świeżą i do każdego oczka dodano 0,5 μCi [3H]-tymidyny (aktywność właściwa 6,7 Ci/mmol) i komórki dalej inkubowano przez 4 godziny w inkubatorze w atmosferze zawierającej 5% CO_2 , w temperaturze 37°C. Po tym czasie pożywkę usunięto, a powierzchnię komórek przemyto trzy razy (3x1 ml) 0,05 M Tris-HCl o pH 7,4, zawierającym 0,11 molowy NaCl. Następnie komórki przemyto dwa razy (2x1 ml) 5% roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA) i rozpuszczono w 1 ml 0,1 molowego NaOH zawierającym 1% SDS. Po 5 minutach uzyskany lizat komórkowy przenoszono do fiolek scyntylacyjnych zawierających 2 ml płynu scyntylacyjnego i mierzono radioaktywność. Intensywność biosyntezy DNA w komórkach kontrolnych, wyrażona w dpm radioaktywnej tymidyny wbudowanej do DNA badanych komórek, w przeliczeniu na 1×10^6 komórek przyjęto za 100%. Wartości z prób badanych wyrażono jako procent wartości kontrolnej. Poziom istotności p wyznaczono nieparametrycznym testem U Manna-Whitney'a za pomocą programu SigmaStat. Wyniki przy poziomie istotności $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie. Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono wartości IC_{50} (ang. inhibitory concentration 50 – stężenie hamujące o 50% wbudowywanie [3H]-tymidyny).

W poniższej Tabeli 2 podano wyniki badania działania przeciwnowotworowego, cytostatycznego, cytotoksycznego i antyproliferacyjnego wobec komórek nowotworowych nowosyntetyzowanych chiralnych pochodnych sulfonamidowych 5-fenyl-7-metylo-pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny według wynalazku.

Tabela 2. Cytotoksyczne i cytostatyczne aktywności nowych chiralnych pochodnych sulfonamidowych wzorze ogólnym **1** po 24 godzinach inkubacji.

Numer związku	Stosowane grupy aminowe (podstawnik R w ogólnym wzorze 1)	MTT, IC ₅₀ (μM)		[³ H]-tymidyna, IC ₅₀ (μM)	
		MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
1		0,32 ± 0,01	1,99 ± 0,02	0,30 ± 0,03	2,09 ± 0,01
2		0,21 ± 0,01	1,89 ± 0,02	0,31 ± 0,02	1,99 ± 0,02
3		0,23 ± 0,02	1,85 ± 0,02	0,19 ± 0,02	1,80 ± 0,01

Numer związku	Stosowane grupy aminowe (podstawnik R w ogólnym wzorze 1)	MTT, IC ₅₀ (μM)		[³ H]-tymidyna, IC ₅₀ (μM)	
		MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
4		0,26 ± 0,01	1,98 ± 0,01	0,37 ± 0,01	2,16 ± 0,01
5		0,23 ± 0,02	1,71 ± 0,01	0,29 ± 0,01	1,97 ± 0,03
6		0,29 ± 0,03	2,06 ± 0,03	0,32 ± 0,03	2,36 ± 0,03
7		0,19 ± 0,03	1,70 ± 0,02	0,29 ± 0,02	1,78 ± 0,02

Numer związku	Stosowane grupy aminowe (podstawnik R w ogólnym wzorze 1)	MTT, IC ₅₀ (μM)		[³ H]-tymidyna, IC ₅₀ (μM)	
		MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
8		0,20 ± 0,01	2,80 ± 0,01	0,31 ± 0,02	2,99 ± 0,03
9		1,96 ± 0,01	1,75 ± 0,02	2,35 ± 0,01	1,89 ± 0,02
10		2,21 ± 0,01	1,98 ± 0,02	2,43 ± 0,02	2,41 ± 0,01
11		0,53 ± 0,01	1,62 ± 0,01	0,61 ± 0,03	1,80 ± 0,01
12		0,43 ± 0,02	1,71 ± 0,02	0,65 ± 0,02	1,99 ± 0,03

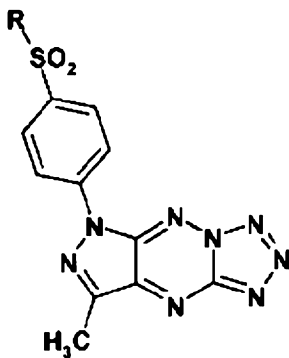
Przeprowadzane badania wykazały, że badane chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny według wynalazku wykazują silne działania przeciwnowotworowe, cytostatyczne, cytotoksyczne i antyproliferacyjne. Dla komórek estrogenozależnych raka piersi MCF-7 wartość IC_{50} dla związku o najsilniejszych właściwościach hamujących wzrost komórek zmierzona metodą Carmichaela wynosiła $0,19 \mu M$ (związek numer 7 w Tabeli 2). Ponadto przeprowadzone badania wskazały, że badane chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny według wynalazku w znacznym stopniu obniżały przeżywalność komórek estrogenoniezależnego raka sutka (MDA-MB-231). W tym przypadku wartość IC_{50} dla najsilniejszego związku wynosiła $1,62 \mu M$ (związek numer 11 w Tabeli 2).

Przeprowadzone badania wykazały także, że wszystkie badane chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny według wynalazku hamują biosyntezę DNA w komórkach nowotworowych, w szczególności estrogenozależnego raka sutka (MCF-7) jak i estrogenoniezależnego raka sutka (MDA-MB-231). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia testowanych związków maleje stopień wbudowywania $[^3H]$ -tymidyny do DNA badanych komórek nowotworowych. Największą aktywność antyproliferacyjną na komórki MCF-7 wykazał związek, którego wartość IC_{50} wynosiła $0,19 \mu M$ (związek numer 3 w Tabeli 2). Z kolei wartość IC_{50} dla związku, który w największym stopniu hamował wbudowywanie $[^3H]$ -tymidyny do DNA komórek estrogenoniezależnego raka sutka (MDA-MB-231) wynosiła $1,78 \mu M$ (związek numer 7 w Tabeli 2).

Przeprowadzone badania wykazały, że chiralne pochodne sulfonamidowe 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny według wynalazku wykazują wysoką aktywność przeciwnowotworową, cytostatyczną, cytotoksyczną i antyproliferacyjną w stosunku do komórek nowotworowych, w szczególności komórek raka sutka, a zatem mogą być stosowane w leczeniu nowotworów, w szczególności raka sutka.

Zastrzeżenia patentowe

1. Chiralna pochodna 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o ogólnym wzorze 1:

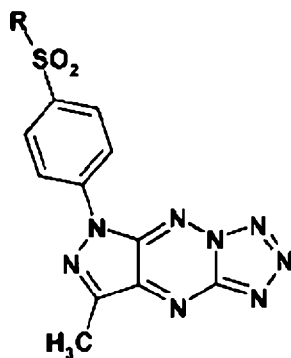


wzór 1

w którym R oznacza grupę wybraną z grupy składającej się z grupy (S)-(+)-2-amino-1-butanolowej, grupy (R)-(-)-2-amino-1-butanolowej, grupy (S)-(+)-2-amino-3-metylo-1-butanolowej, grupy (R)-(-)-2-amino-3-metylo-1-butanolowej, grupy (S)-(+)-1-amino-2-propanolowej, grupy (R)-(-)-1-amino-2-propanolowej, grupy (S)-(+)-leucynolowej, grupy (R)-(-)-leucynolowej, grupy (S)-(+)-3-amino-1,2-propanodiolowej, grupy (R)-(-)-3-amino-1,2-propanodiolowej, grupy (S)-(+)-2-amino-1-propanolowej i grupy (R)-(-)-2-amino-1-propanolowej.

2. Chiralna pochodna według zastrzeżenia 1, **znamienna tym**, że R oznacza grupę (S)-(+)-1-amino-2-propanolową.
3. Chiralna pochodna według zastrzeżenia 1, **znamienna tym**, że R oznacza grupę (S)-(+)-leucynolową.
4. Chiralna pochodna według zastrzeżenia 1, **znamienna tym**, że R oznacza grupę (S)-(+)-2-amino-1-propanolową.

5. Sposób wytwarzania chiralnej pochodnej sulfonamidowej 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny o wzorze ogólnym 1



wzór 1

- w którym R oznacza grupę wybraną z grupy składającej się z grupy (S)-(+)-2-amino-1-butanolowej, grupy (R)-(-)-2-amino-1-butanolowej, grupy (S)-(+)-2-amino-3-metylo-1-butanolowej, grupy (R)-(-)-2-amino-3-metylo-1-butanolowej, grupy (S)-(+)-1-amino-2-propanolowej, grupy (R)-(-)-1-amino-2-propanolowej, grupy (S)-(+)-leucynolowej, grupy (R)-(-)-leucynolowej, grupy (S)-(+)-3-amino-1,2-propanodiolowej, grupy (R)-(-)-3-amino-1,2-propanodiolowej, grupy (S)-(+)-2-amino-1-propanolowej i grupy (R)-(-)-2-amino-1-propanolowej, **znamienny tym**, że 1-fenilo-3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo[4,3-e][1,2,4]-triazynę w reakcji z kwasem chlorosulfonowym, a następnie tak otrzymaną pochodną chlorosulfonową poddaje reakcji z enancjomerem chiralnego aminoalkoholu wybranym z grupy składającej się z (R)-(-)-1-amino-2-propanolu, S-(+)-1-amino-2-propanolu, R-(-)-2-amino-1-propanolu, S-(+)-2-amino-1-propanolu, R-(-)-2-amino-3-metyl-1-butanolu, S-(+)-2-amino-3-metyl-1-butanolu, R-3-amino-1,2-propanediolu, S-3-amino-1,2-propanediolu, R-(-)-leucynolu, S-(+)-leucynolu, (R)-(+)-2-amino-1-butanolu i (S)-(+)-2-amino-1-butanolu, po czym prowadzi się reakcję substytucji nukleofilowej z azydkiem sodu w bezwodnym etanolu.
6. Sposób wytwarzania według zastrz. 5, **znamienny tym**, że ponadto otrzymaną chiralną pochodną sulfonamidową 5-fenilo-7-metylo-pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny oczyszcza się chromatograficznie, korzystnie z zastosowaniem chromatografii cieczowej.
 7. Chiralna pochodna jak określono w dowolnym z zastrzeżeń 1 do 4 do zastosowania jako lek.
 8. Chiralna pochodna jak określono w dowolnym z zastrzeżeń 1 do 4 do zastosowania jako lek do leczenia nowotworu.
 9. Pochodna jak określono w dowolnym z zastrzeżeń 1 do 4 do zastosowania jako lek do leczenia raka sutka.
 10. Pochodna jak określono w dowolnym z zastrzeżeń 1 do 4 do zastosowania jako środek cytostatyczny.
 11. Pochodna jak określono w dowolnym z zastrzeżeń 1 do 4 do zastosowania jako środek cytotoksyczny.
 12. Kompozycja farmaceutyczna, **znamienna tym**, że zawiera chiralną pochodną jak określono w jednym z zastrzeżeń 1 do 4 oraz farmaceutycznie akceptowalny nośnik, rozcieńczalnik lub zaróbkę.
 13. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 12, **znamienna tym**, że jako składnik aktywny zawiera chiralną pochodną o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza grupę (S)-(+)-1-amino-2-propanolową.
 14. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 12, **znamienna tym**, że jako składnik aktywny zawiera chiralną pochodną o ogólnym wzorze 1, w którym R oznacza grupę (S)-(+)-leucynolową.
 15. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 12, **znamienna tym**, że jako składnik aktywny zawiera chiralną pochodną o ogólnym wzorze 1, w który R oznacza grupę (S)-(+)-2-amino-1-propanolową.