



(11) **121030 B1**

(51) Int.Cl.

C07D 239/70 (2006.01);

C07D 487/12 (2006.01);

A61K 31/505 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2000 01172**

(22) Data de depozit: **15.09.1999**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.11.2006** BOPI nr. 11/2006

(30) Prioritate:

16.09.1998 US 09/154.435;
23.08.1999 US 09/379.300

(86) Cerere internațională PCT:

Nr. US 99/21103 15.09.1999

(87) Publicare internațională:

Nr. WO 00/15231 23.03.2000

(73) Titular:

**• KING PHARMACEUTICALS RESEARCH
AND DEVELOPMENT, INC.,
7001 WESTON PARKWAY, CARY, NORTH
CAROLINA, US**

(72) Inventatori:

**• BARALDI PIER GIOVANNI,
VIA FOSSATO DI MONTARA, 17-19,
I-44100, FERRARA, IT;**
**• BOREA PIER ANDREA,
VIA DEL TURCO, 14, I-44100, FERRARA, IT**

(74) Mandatar:

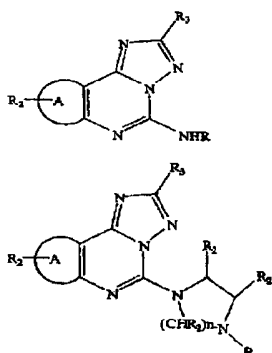
**ROMINVENT S.A.,
STR. ERMIL PANGRATTI, NR. 35,
SECTOR 1, BUCUREȘTI**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 95/01356

(54) DERIVAȚI TRIAZOLOPIRIMIDINICI, CA MODULATORI AI RECEPTORULUI PENTRU ADENOZINĂ A₃

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la compușii cu formulele I sau II:



sau

În care R, R¹, R², R³ și A au semnificațiile date în descriere și care au activitate agonistă selectivă față de receptorul A₃ adenosinergic. Acești compuși pot fi utilizați într-o compoziție farmaceutică, pentru tratarea bolilor cauzate de activarea excesivă a receptorului A₃, sau pot fi utilizați într-o aplicație de diagnosticare, pentru determinarea legării relative a altor compuși la receptorul A₃. Compușii pot fi marcați, spre exemplu, cu markerii fluorescenți sau radioactivi, iar markerii pot fi utilizați pentru determinarea *in vivo* sau *in vitro* a prezenței celulelor tumorale care posedă o concentrație ridicată de receptori A₃ adenosinergici.

Revendicări: 19

Figuri: 4

Examinator: chimist GRUIA AMELIA-ELENA



Orice persoană interesată are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a hotărârii de acordare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii acesteia

RO 121030 B1

RO 121030 B1

Prezenta invenție se referă la unii derivați pirazolo-triazolo-pirimidinici, triazolo-triazolo-pirimidinici și imidazolo-triazolo-pirimidinici, și la utilizarea lor în practica medicală, ca modulatori ai receptorilor A_3 pentru adenzină.

Au fost caracterizate, din punct de vedere farmacologic, trei clase principale de receptori adenzinici, clasificați ca A_1 , A_2 și A_3 . Receptorii A_1 sunt cuplați cu inhibarea adenilat ciclazei prin proteinele G_i și, de asemenea, s-a arătat că se cuplează și cu alte sisteme mesagere secundare, incluzând inhibarea sau stimularea turnoverului fosfoinozitolului și activarea canalelor ionice. Receptorii A_2 sunt, în continuare, divizați în două subtipuri: A_{2a} și A_{2b} , la care agoniștii adenzinici activează adenilat ciclaza, cu afinitate ridicată și, respectiv, cu afinitate scăzută. Secvența receptorului A_3 a fost identificată prima oară într-o bibliotecă de cDNA din testicule de șobolan, iar această secvență, donată ulterior prin omologie cu alți receptori dintr-o bibliotecă de cDNA din creier de șobolan, cuplați cu proteina G, s-a dovedit a corespunde unui receptor adenzinic nou, funcțional.

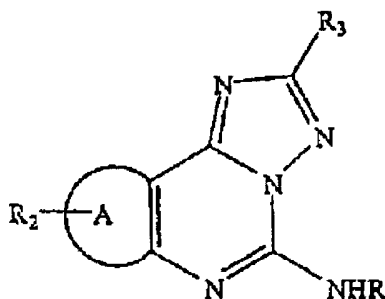
Descoperirea receptorului A_3 a deschis noi perspective terapeutice în domeniul purinelor. În particular, receptorul A_3 mediază procesele inflamatorii, hipotensive și de granulare a celulelor mastice. Aparent, acest receptor are, de asemenea, un rol în sistemul nervos central. Agonistul IB-MECA selectiv pentru A_3 induce depresia comportamentală și prin administrare cronică protejează împotriva ischemiei cerebrale. De asemenea, s-a găsit că agoniștii selectivi pentru A_3 , în concentrații ridicate, induc apoptoza în celulele leucemice umane HL-60. Acestea, precum și alte descoperiri au făcut din receptorul A_3 o țintă terapeutică promițătoare. Antagoniștii selectivi pentru receptorul A_3 sunt considerați, fie potențiali agenți antiinflamatori, fie posibili agenți antiischemici. Recent, antagoniștii lui A_3 au constituit obiectul elaborării de medicamente antiasmatic, antidepresive, antiaritmice, protectoare renale, antiparkinsoniene și de amplificare cognitivă.

Se cunosc derivați triazolopirimidinici care au în moleculă grupări amino nesubstituite în poziția 5, care acționează ca modelatori ai receptorului A_2 (WO 95/01356).

De aceea, un obiect al prezentei invenții îl constituie furnizarea de compuși și de metode de preparare și de utilizare ale acestora, care sunt agoniști, parțial agoniști și/sau antagoniști ai receptorului A_3 pentru adenzină.

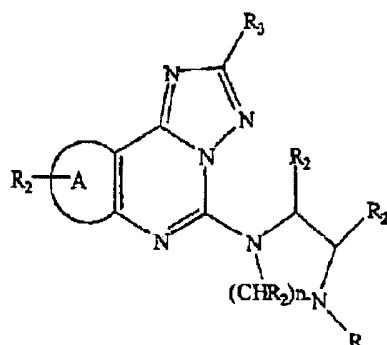
Sunt descriși compuși utili ca modulatori puternici, chiar selectivi ai receptorului A_3 pentru adenzină, cu activitate de antagoniști ai acestui receptor, precum și metode de preparare și utilizare ale acestora.

Prezenta invenție se referă la compușii cu următoarea formulă generală:



RO 121030 B1

sau



în care:

A este imidazol, pirazol sau triazol;

R este $-C(X)R_1$, $C(X)-N(R_1)_2$, $-C(X)OR_1$, $-C(X)SR_1$, $-SO_nR_1$, $-SO_nOR_1$, $-SO_nSR_1$ sau $SO_n-N(R_1)_2$;

R_1 este hidrogen, alchil, alchil substituit, alchenil, alchenil substituit, alchinil, alchinil substituit, aril, heteroaril, heterociclu, alchenil inferior, alcanol inferior sau, dacă este legat de un atom de azot, atunci, luat împreună cu atomul de azot formează un inel azetidinic sau un inel heterociclic din 5...6 membri, conținând unul sau mai mulți heteroatomi, cum ar fi N, O, S;

R_2 este hidrogen, alchil, alchenil, alchinil, alchil substituit, alchenil substituit, alchinil substituit, aralchil, aralchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit sau aril;

R_3 este furan, pirol, tiofen, benzofuran, benzopirol, benzotiofen, substituit opțional cu unul sau mai mulți substituenți, așa cum s-a descris aici, pentru inelele heteroarilice substituite;

X este O, S sau NR^1 ;

n este 1 sau 2;

analogi radiomarcați ai acestora, analogi marcați fluorescent ai acestora și săruri ale acestora, acceptabile din punct de vedere farmaceutic.

Un alt obiect al prezentei invenții este o metodă de tratare a hipertensiunii, inflamațiilor, reacțiilor alergice, degranulării celulelor mastice, a tumorilor și hipoxiei cardiace și de protecție împotriva ischemiei cerebrale, metodă constând în administrarea unei cantități eficiente dintr-un compus cu formulele menționate, la un pacient care are nevoie de un asemenea tratament.

De asemenea, invenția are ca obiect și metoda de determinare la un pacient, a prezenței celulelor tumorale care posedă o concentrație mare de receptori A_3 adenzinici, metodă constând în:

a) administrarea unui compus definit cu formulele de mai sus, la pacient, metodă care include un marker care poate fi detectat după legarea compusului de celulele tumorale;

b) legarea compusului la celulele tumorale;

c) detectarea markerului.

Un alt obiect al prezentei invenții se referă la o metodă de determinare într-o probă celulară, a prezenței celulelor tumorale care posedă o concentrație mare de receptori A_3 adenzinici, metodă constând în:

a) prepararea unei suspensii din celulele respective, într-un mediu de cultură celulară;

b) administrarea la celulele respective, a unui compus definit cu formulele de mai sus, care include un marker detectabil după legarea compusului de celulele tumorale;

- 1 c) legarea compusului de celulele tumorale;
2 d) detectarea markerului.

3 Invenția are ca obiect și o metodă de determinare a prezenței celulelor tumorale
4 rămase după îndepărtarea chirurgicală a unei tumori, metodă constând în:

- 5 a) administrarea la pacient, înainte, după sau în timpul îndepărtării chirurgicale a unei
6 tumori, a unui compus definit cu formulele de mai sus, care include un marker, care poate
7 fi detectat după legarea compusului de celulele tumorale reziduale;

- 8 b) legarea compusului la celulele tumorale reziduale;

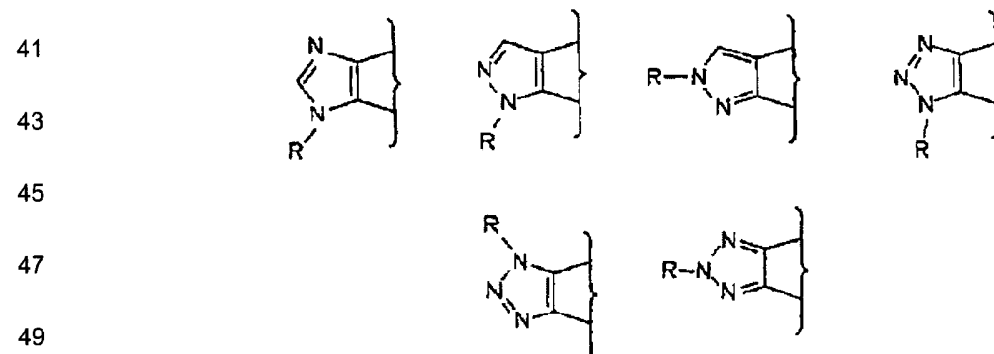
- 9 c) detectarea markerului.

10 În compușii definiți cu formulele de mai sus, de preferință, R^1 este hidrogen; alchil cu
11 C_1 până la C_8 ; alchenil cu C_2 până la C_7 , alchinil cu C_2 până la C_7 ; cicloalchil cu C_3 până la
12 C_7 ; alchil cu C_1 până la C_5 substituit cu unul sau mai mulți atomi de halogen, grupări hidroxi,
13 alcoxi cu C_1 până la C_4 , cicloalchil cu C_3 până la C_7 sau grupări cu formulele $-N(R^1)_2$,
14 $-C(O)N(R^1)_2$; aril, aril substituit, în care substituția este selecționată din grupul alcătuit din
15 alcoxi cu C_1 până la C_4 , alchil cu C_1 până la C_4 , nitro, amino, ciano, haloalchil cu C_1 până la
16 C_4 , haloalcoxi cu C_1 până la C_4 , carboxi, carboxiamido; aralchil cu C_7 până la C_{10} , în care
17 partea arilică poate fi substituită cu unul sau mai mulți din substituenții indicați mai sus,
18 pentru grupul aril; o grupare cu formula $-(CH_2)_m-Het$, în care Het este un inel heterociclic
19 aromatic sau nearomatic cu 5...6 membri, conținând unul sau mai mulți heteroatomi selectați
20 din grupul alcătuit din N, O și S, iar m este un număr întreg de la 1 la 5.

21 Grupările alchil cu C_1 până la C_8 preferate sunt: metil, etil, propil, butil și izopentil.
22 Exemple de grupări cicloalchil cu C_3 - C_7 includ: ciclopropil, ciclopentil și ciclohexil. Exemple
23 de grupări alchil cu C_1 - C_5 , substituite cu grupări cicloalchil cu C_3 - C_7 , includ: ciclohexilmetil,
24 ciclopentilmetil și 2-ciclopentiletil. Exemple de grupări alchil cu C_1 - C_5 substituite includ: 2-
25 hidroxietyl, 2-metoxietyl, trifluormetil, 2-fluoretil, 2-cloretil, 3-aminopropil, 2-(4-metil-1-pipe-
26 razin)etil, 2-(4-morfolinil)etil, 2-aminocarboniletil, 2-dimetilaminoetil, 3-dimetilaminopropil.
27 Arilul este de preferință fenil, opțional substituit cu Cl, F, grupări metoxi, nitro, ciano, metil,
28 trifluormetil, difluormetoxi. Exemple de grupări heterociclice cu 5...6 membri, conținând N,
29 O și/sau S, includ: piperazinil, morfolinil, tiazolil, pirazolil, piridil, furil, tienil, pirolil, triazolil,
30 tetrazolil. Exemple de grupări aralchil cu C_7 - C_{10} conțin benzil sau fenetil substituite opțional
31 cu unul sau mai mulți substituenți selecționați dintre: Cl, F, metoxi, nitro, cian, metil,
32 trifluormetil și difluormetoxi. De preferință, R^1 este hidrogen, alchil cu C_1 - C_8 , aril sau aralchil
33 cu C_7 - C_{10} , opțional substituite, de preferință, cu atomi de halogen. De preferință, X este O,
34 R_2 este alchil sau alchil substituit cu C_2 - C_3 , iar R_3 este furan.

35 Compuși preferați, în mod deosebit, sunt cei în care R este o grupare fenetil, în care
36 inelul fenil este substituit cu unul sau mai mulți substituenți aleși din grupul alcătuit din: atomi
37 de clor, fluor, grupări metoxi, nitro, cian, metil, trifluormetil și difluormetoxi.

38 Posibilele semnificații ale lui A pot fi reprezentate prin următoarele formule
39 structurale:



RO 121030 B1

Compușii pot fi utilizați într-o metodă pentru modularea receptorilor A ₃ adenosinici la un mamifer, inclusiv la om. Metodele implică administrarea unei cantități eficiente dintr-un compus cu formula I, suficientă pentru a modera receptorii A ₃ adenosinici la un mamifer. Utilizările compușilor includ:	1
- tratarea hipertensiunii;	5
- tratarea tulburărilor inflamatorii, cum ar fi artrita reumatoidă și psoriazisul;	7
- tratarea tulburărilor alergice, cum ar fi febra fânului (guturaiul) și rinitele alergice;	9
- degranularea celulelor mastice;	11
- agenți antitumorali;	13
- tratarea hipoxiei cardiace; și	15
- protecția împotriva ischemiei cerebrale;	17
- utilizări în diagnosticare, spre exemplu, pentru a determina prezența uneia sau a mai multora dintre stările medicale descrise mai sus, sau într-un test de screening, pentru a determina eficacitatea altor compuși pentru legarea de receptorul Ado A ₃ (adică, prin inhibarea competitivă, așa cum s-a determinat prin diferite teste de legare), așa cum este descris în Jacobson și Van Rhee, <i>Purinergic approaches to experimental therapy</i> , Jacobson și Jarvis, ed., Wiley, New York, 1997, pp. 101-128; Mathot et al., <i>Brit. J. Pharmacol.</i> 116: 1957-1964 (1995); Van der Wenden și colab., <i>J. Med. Chem.</i> 38: 4000-4006 (1995); și van Calenberg, <i>J. Med. Chem.</i> 40: 3765-3772 (1997), ale căror conținuturi sunt încorporate aici ca referințe.	19
Compușii pot fi utilizați, de asemenea, într-o metodă pentru inhibarea parțială sau completă a adenilat ciclazei (A ₃) la un mamifer, inclusiv la om. Metodele implică administrarea unei cantități eficiente dintr-un compus cu formula I, suficientă pentru inhibarea completă sau parțială a adenilat ciclazei la mamifere. De asemenea, compușii pot fi marcați și utilizați pentru detectarea prezenței celulelor tumorale conținând liganzi A ₃ pentru adenosină, la un pacient sau într-o probă celulară, prin: punerea în contact a celulelor cu compusul marcat, permițând compusului să se lege de receptorii A ₃ și detectarea prezenței markerului.	21
Compușii pot fi utilizați într-o formulare farmaceutică, care include un compus cu formula I și unul sau mai mulți excipienți. Pentru prepararea compușilor, pot fi utilizați diverși intermediari chimici.	23
- fig. 1 este un grafic reprezentând curba de saturare a reacției de legare a lui [¹²⁵ I]AB-MECA (fmol/mg proteină) de receptorii A ₃ umani exprimați în celulele HEK 293, în funcție de concentrația molară a lui [¹²⁵ I]AB-MECA.	25
- fig. 2 este un grafic reprezentând curba de saturare a reacției de legare a lui [¹²⁵ I]AB-MECA (fmol/mg proteină) de receptorii A ₃ umani exprimați în linia celulară JURKAT, în funcție de concentrația molară a lui [¹²⁵ I]AB-MECA. Așa cum reiese din figură, densitatea receptorului A ₃ detectată a fost de aproximativ 300 fmol/mg proteină în membranele celulelor Jurkat care utilizează [¹²⁵ I]AB-MECA.	27
- fig. 3 și 4 sunt grafice care reprezintă saturarea legării unui analog tritiat al compusului 47-5-[[[4-metoxifenil]amino]carbonil]amino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (compusul 102) (fmol/mg proteină) de receptorii A ₃ umani exprimați în linia celulară JURKAT, în funcție de concentrația molară a compusului 102. Datele din aceste figuri indică prezența receptorilor A ₃ adenosinici în celulele tumorale umane, în densități ridicate. Spre exemplu, s-au detectat aproximativ 1300 fmol/mg proteină în celulele Jurkat și 650 fmol/mg proteină în celulele HL60. De aceea, compusul 102 este un instrument mult mai sensibil pentru detectarea receptorilor A ₃ adenosinici decât [¹²⁵ I]AB-MECA. Aceste constatări au facilitat determinarea prezenței receptorilor A ₃ în multe tumori umane.	29

Prezenta cerere de brevet de invenție face cunoscuți compuși utili ca modulatori puternici, chiar selectivi, ai receptorilor pentru adenzină, cu activitate de agonști de A_3 și, în unele cazuri, de antagonști de A_3 , precum și metode de preparare și utilizare ale acestora.

Compușii pot fi utilizați într-o metodă de modulare a receptorilor A_3 adenzinici la un mamifer, inclusiv la om. Metodele implică administrarea unei cantități eficiente dintr-un compus cu formula I, suficientă pentru a modera receptorii A_3 adenzinici ai mamiferului.

Compușii pot fi utilizați într-o formulare farmaceutică care include un compus cu formula I și unul sau mai mulți excipienți. Pentru prepararea compuşilor pot fi utilizați diverși intermediari chimici.

Definiții

Așa cum s-a utilizat aici, un compus este un agonist al unui receptor A_1 adenzinic, dacă este capabil să inhibe complet adenilat ciclaza (A_3) și dacă este capabil să înlocuiască [125 I]-AB-MECA într-un test de legare competitivă.

Așa cum a fost utilizat aici, un compus este un agonist parțial al unui receptor A_3 adenzinic, dacă este capabil să inhibe parțial adenilat ciclaza (A_3) și dacă este capabil să înlocuiască [125 I]-AB-MECA într-un test de legare competitivă.

Așa cum a fost utilizat aici, un compus este un antagonist al unui receptor A_3 adenzinic, dacă este capabil să prevină inhibarea datorată unui agonist și dacă este capabil să înlocuiască [125 I]-AB-MECA într-un test de legare competitivă.

Așa cum a fost utilizat aici, un compus este selectiv pentru receptorul A_3 dacă raportul dintre activitatea A_1/A_3 și A_2/A_3 este mai mare de 50, preferabil, între 50 și 100 și, mai preferabil, mai mare de 100.

Așa cum a fost utilizat aici, termenul "alchil" se referă la grupări alchilice monovalente liniare, ramificate sau ciclice, având, de preferință, de la 1 la 20 atomi de carbon, mai preferabil 1...10 atomi de carbon ("alchil inferior") și, cel mai convenabil, 1...6 atomi de carbon. Acest termen este exemplificat prin grupări cum ar fi metil, etil, *n*-propil, izopropil, -butil, izobutil, *n*-hexil și alții asemănători. Termenii "alchilen" și "alchilen inferior" se referă la radicali bivalenți ai alcanului corespunzător. Mai mult, așa cum au fost utilizate aici, alte resturi având denumirile derivate din alcani, cum ar fi: alcoxil, alcanoil, alchenil, cicloalchenil etc., când sunt modificate prin "inferior", au lanțuri carbonice de 10 sau mai puțini atomi de carbon. În acele cazuri în care numărul minim de atomi de carbon este mai mare de 1, spre exemplu, alchenil (minimum 2 atomi de carbon) și cicloalchil (minimum 3 atomi de carbon), trebuie înțeles că "inferior" înseamnă cel puțin numărul minim de atomi de carbon.

Așa cum a fost utilizat aici, termenul "alchil substituit" se referă la o grupare alchil cu, de preferință, de la 1 la 10 atomi de carbon ("alchil inferior substituit"), având 1...5 substituenți și, preferabil, 1...3 substituenți selectați din grupul constând din: alcoxi, alcoxi substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloalchenil, cicloalchenil substituit, acil, acilamino, aciloxi, amino, amino substituit, aminoacil, aminoaciloxi, oxilamino, ciano, halogen, hidroxil, ceto, tioceto, carboxil, carboxilalchil, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi substituit, aril, ariloxi, heteroaril, heteroaril oxil, heterociclic, hidroxihamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alchil, -SO-alchil substituit, -SO-aril, -SO-heteroaril, -SO₂-alchil, -SO₂-alchil substituit, -SO₂-aril, -SO₂-heteroaril și mono- și di-alchilamino, mono- și di-(alchil substituit)amino, mono- și di-alhamino, mono- și di-heteroarilamino, mono- și di-heterociclic amino și amine di-substituite nesimetrice, având substituenți diferiți, selectați dintre: alchil, aril, heteroaril și heterociclic. Așa cum au fost utilizate aici, alte părți având prefixul "substituit" tind să includă unul sau mai mulți dintre substituenții listați mai sus.

RO 121030 B1

Așa cum a fost utilizat aici, termenul "alcaril" se referă la o grupare alchil cu un substituent aril. Legarea se face prin gruparea alchil. "Aralchil" se referă la o grupare ari) cu un substituent alchil, unde legarea se face prin gruparea aril.	1
Așa cum a fost utilizat aici, termenul "alcoxi" se referă la gruparea "alchil-O-", unde alchilul este cel definit mai sus. Grupări alcoxi preferate includ, spre exemplu, metoxi, etoxi, <i>n</i> -propoxi, <i>izo</i> -propoxi, <i>n</i> -butoxi, <i>terț</i> -butoxi, <i>sec</i> -butoxi, <i>n</i> -pentoxi, <i>n</i> -hexoxi, 1,2-dimetilbutoxi și similari.	3
Așa cum a fost utilizat aici, termenul "alchenil" se referă la grupări alchenil având, de preferință, de la 2 la 10 atomi de carbon și, mai preferabil, 2...6 atomi de carbon și având cel puțin 1 și, preferabil, 1...2 situsuri de nesaturare alchenilice. Grupări alchenil preferate includ: etenil ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), <i>n</i> -propenil ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), <i>izo</i> -propenil ($-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$) și similari.	5
Așa cum a fost utilizat aici, termenul "alchinil" se referă la grupări alchinil având, de preferință, de la 2 la 10 atomi de carbon și, mai preferabil, 2...6 atomi de carbon și având cel puțin 1 și, preferabil, 1...2 situsuri de nesaturare alchinilice.	7
Așa cum a fost utilizat aici, termenul "acil" se referă la grupările alchil-C(O)-, alchil-C(O)-substituit, cicloalchil-C(O)-, cicloalchil-C(O)-substituit, aril-C(O)-, heteroaril-C(O)-și heterociclic-C(O), unde alchil, alchil substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, aril, heteroaril și heterociclic sunt așa cum au fost definite aici.	9
Așa cum a fost utilizat aici, termenul "acilmino" se referă la gruparea -C(O)NRR, unde fiecare R este, în mod independent, hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, heteroaril sau heterociclic în care alchil, alchil substituit, aril, heteroaril și heterociclic sunt așa cum au fost definite aici.	11
Așa cum a fost utilizat aici, termenul "aril" se referă la o grupare carbociclică aromatică nesaturată cu 6...14 atomi de carbon, având un singur inel (de exemplu, fenil) sau inele multiple condensate (de exemplu, naftil sau antril). Arili preferați includ: fenil, naftil și similari. În afara constrângerilor date prin definiția pentru substituentul arilic, asemenea grupări arilice pot fi substituite opțional cu 1...5 substituenți și, preferabil, cu 1...3 substituenți aleși din grupul alcătuit din: hidroxi, acil, alchil, alcoxi, alchenil, alchinil, alchil substituit, alcoxi substituit, alchenil substituit, alchinil substituit, amino, amino substituit, aminoacil, aciloxi, acilamino, alcaril, aril, ariloxi, azido, carboxil, carboxilalchil, cian, halo, nitro, heteroaril, heteroariloxi, heterociclic, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilamino, tioalcoxi, tioalcoxi substituit, tioariloxi, tioheteroariloxi, -SO-alchil, -SO-alchil substituit, -SO-aril, -SO-heteroaril, -SO ₂ -alchil, -SO ₂ -alchil substituit, -SO ₂ -aril, -SO ₂ -heteroaril, trihalometil. Substituenții preferați includ alchil, alcoxi, halo, cian, nitro, trihalometil și tioalcoxi.	13
Așa cum a fost utilizat aici, termenul "cicloalchil" se referă la grupări alchil ciclice cu 3...12 atomi de carbon, având un singur inel ciclic sau inele multiple condensate. Asemenea grupări cicloalchil includ, spre exemplu, structuri cu un singur ciclu, cum ar fi: ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, ciclooctil și similaril, sau structuri ciclice multiple, cum ar fi: adamatil și similari.	15
Așa cum a fost utilizat aici, termenii "halo" sau "halogen" se referă la fluor, clor, brom și iod, și sunt, de preferință, fie fluor, fie clor.	17
Așa cum a fost utilizat aici, termenul "heteroaril" se referă la o grupare carbociclică aromatică cu 1...15 atomi de carbon și 1...4 heteroatomi selectați din grupul alcătuit din: oxigen, azot și sulf în cel puțin un inel (dacă există mai mult de un inel).	19

RO 121030 B1

În afara constrângerilor date prin definiția pentru substituentul heteroaril, asemenea grupări heteroaril pot fi substituite opțional cu 1...5 substituenți și, de preferință, cu 1...3 substituenți selectați din grupul constând din: hidroxi, acil, alchil, alcoxi, alchenil, alchinil, alchil substituit, alcoxi substituit, alchenil substituit, alchinil substituit, amino, amino substituit, aminoacil, aciloxi, acilamino, alcaril, aril, ariloxi, azido, carboxil, carboxilalchil, ciano, halo, nitro, heteroaril, heteroariloxi, heterociclic, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilaminno, tioalcoxi, tioalcoxi substituit, tioariloxi, tioheteroariloxi, -SO-alchil, -SO-alchil substituit, -SO-aril, -SO-heteroaril, -SO₂-alchil, -SO₂-alchil substituit, -SO₂-aril, -SO₂-heteroaril, și trihalometil. Substituenții preferați includ: alchil, alcoxi, halo, ciano, nitro, trihalometil și tioalcoxi. Astfel de grupări heteroaril pot avea un singur inel (de exemplu, piridil sau furil) sau inele multiple condensate (de exemplu, in-dolizil sau benzotienil).

“Heterociclu” sau “heterociclic” se referă la o grupare monovalentă saturată sau nesaturată, având un singur inel sau inele multiple condensate, cu 1...15 atomi de carbon și cu 1...4 heteroatomi selectați din grupul alcătuit din: azot, sulf și oxigen, în cadrul ciclului.

În afara constrângerilor date prin definiția pentru substituentul heterociclic, asemenea grupări heterociclice pot fi opțional substituite cu 1...5 substituenți selectați din grupul alcătuit din: alchil, alchil substituit, alcoxi, alcoxi substituit, aril, ariloxi, halo, nitro, heteroaril, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi substituit, tioariloxi, trihalometil și similari. Asemenea grupări heterociclice pot avea un singur inel sau inele multiple condensate.

Deoarece pentru oricare dintre grupările de mai sus, care conțin 1 sau mai mulți substituenți, se înțelege, desigur, că asemenea grupări nu conțin orice substituție sau schemă de substituție care să fie nepractică din punct de vedere steric și/sau nefezabilă din punct de vedere sintetic.

Așa cum au fost utilizați aici, “derivații acidului carboxilic” și “derivații acidului sulfonic” se referă la -C(X)R₁, -C(X)-N(R₁)₂, -C(X)OR₁, -C(X)SR₁, -SOR₁, -SO_nOR₁, SO_nSR₁ sau -SO_n-N(R₁)₂, unde X este O, S sau NR¹, unde R¹ este hidrogen, alchil, alchil sau aril substituit și derivați activați ai acestora, cum ar fi: anhidride, esteri și halogenuri, cum ar fi: cloruri, bromuri și ioduri, care pot fi utilizate pentru cuplarea derivaților acidului carboxilic și ai acidului sulfonic la capătul 5'-amină, utilizând chimia de cuplare standard.

“Săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic” se referă la săruri acceptabile din punct de vedere farmaceutic, ale unui compus cu formulele IA, IB sau IC, săruri care sunt derivate dintr-o varietate de ioni organici și anorganici, bine cunoscuți în domeniu, și includ, sub formă de exemplu, numai, sodiu, potasiu, calciu, magneziu, amoniu, tetraalchilamoniu și similari; iar când molecula conține o funcționalitate de bază, săruri de acizi organici sau anorganici, cum ar fi: clorură, bromură, tartrat, mesilat, acetat, maleat, oxalat și similari, pot fi utilizate drept sare acceptabilă din punct de vedere farmaceutic.

Termenul de “grupare de protecție” sau “grupare de blocare” se referă la orice grupare care, atunci când se leagă de una sau mai multe grupări hidroxil, amino sau carboxil ale compușilor (inclusiv ale intermediarilor acestora, cum ar fi aminolactamele, aminolactonele etc.), evită desfășurarea reacțiilor la aceste grupări, care grupări protectoare pot fi îndepărtate prin etape convenționale chimice sau enzimatic, pentru refacerea grupării hidroxil, amino sau carboxil. Grupări preferate de blocare pentru amino, îndepărtabile, includ substituenți convenționali, cum ar fi *t*-butoxicarbonil (*t*-BOC), benziloxicarbonil (CBZ) și similari, care pot fi îndepărtați în condiții convenționale, compatibile cu natura produsului.

RO 121030 B1

Prescurtări

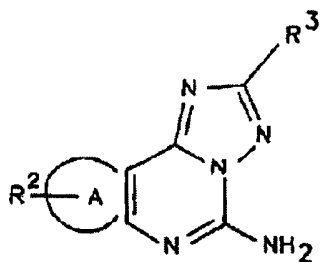
În prezenta lucrare, sunt utilizate următoarele prescurtări:

- [¹²⁵I]AB-MECA, [¹²⁵I]N⁶-(4-amino-3-iodbenzil)adenozin-5'-N-metiluronamidă;
- (R)-PIA, (R)-N⁶-(fenilizopropil)adenozină;
- DMSO, dimetilsulfoxid;
- I-AB-MECA, N⁶-(4-amino-3-iodbenzil)adenozin-5'-N-metiluronamidă;
- IB-MECA, N⁶-(3-iodbenzil)adenozin-5'-N-metiluronamidă;
- K_i, constantă de inhibiție de echilibru;
- NECA, 5'-N-etilcarboxamido adenozină;
- THF, tetrahidrofuran;
- Tris, tris(hidroximetil)aminometan.

Prepararea compușilor

Specialiștii în chimie organică vor recunoaște că grupările funcționale reactive și (fragile) trebuie, adesea, să fie protejate înaintea unei anumite reacții și, apoi, readuse la forma lor originală, după desăvârșirea ultimei reacții. În mod obișnuit, grupările sunt protejate prin convertirea lor într-un derivat relativ stabil. Spre exemplu, o grupare hidroxil poate fi transformată într-o grupare eterică, iar o grupare amino într-o amidă sau carbamat. Metode de protejare și de deprotejare, cunoscute și ca metode de "blocare" și de "deblocare", sunt bine cunoscute și mult practicate în domeniu, de exemplu, a se vedea: T. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley, New York (1981) sau *Protective Groups in Organic Chemistry*, Ed., J.F.W. McOmie, Plenum Press, London (1973).

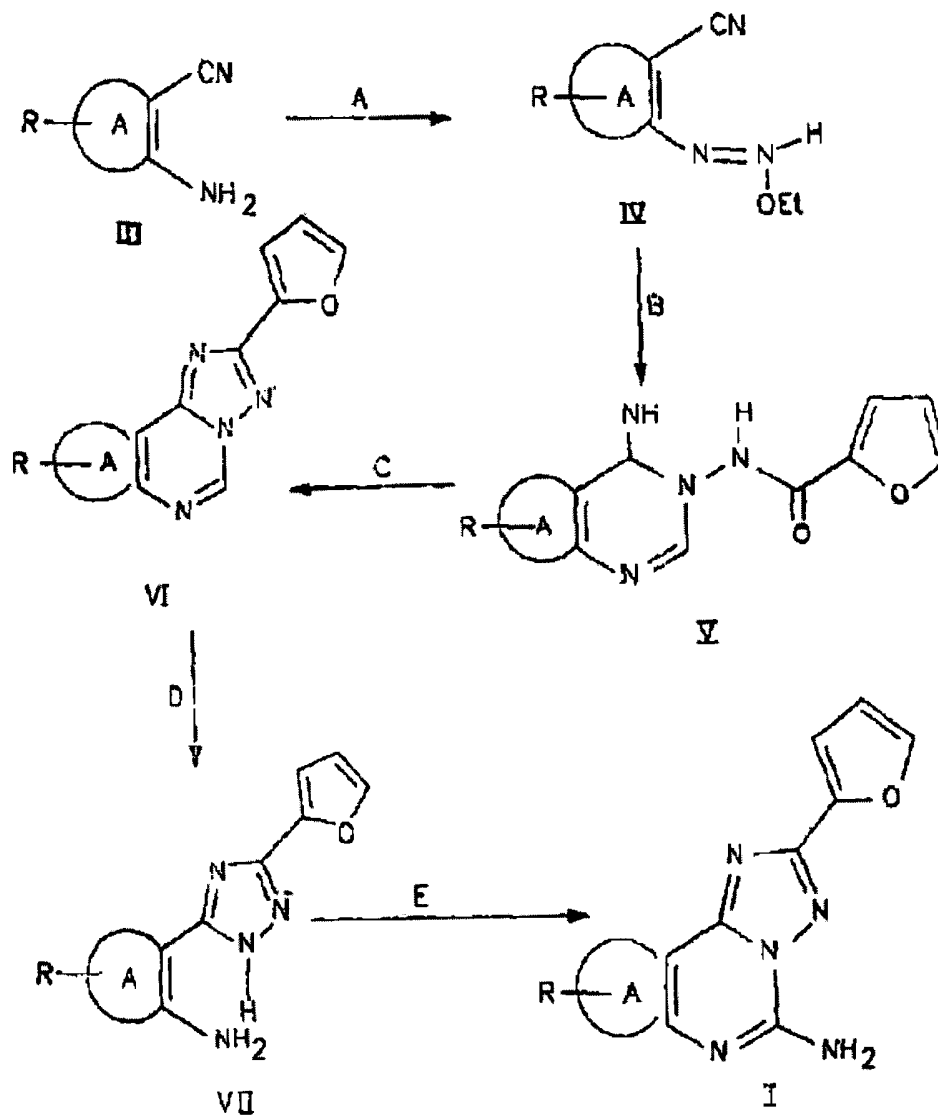
Compușii sunt preparați, de preferință, prin reacția unui compus cu formula II de mai jos, cu un derivat corespunzător al acidului carboxilic sau al acidului sulfonic, cu ajutorul reacțiilor chimice cunoscute.



II

Compușii cu formula II pot fi preparați folosind următoarele scheme I și II, ilustrate, unde R³ este furan.

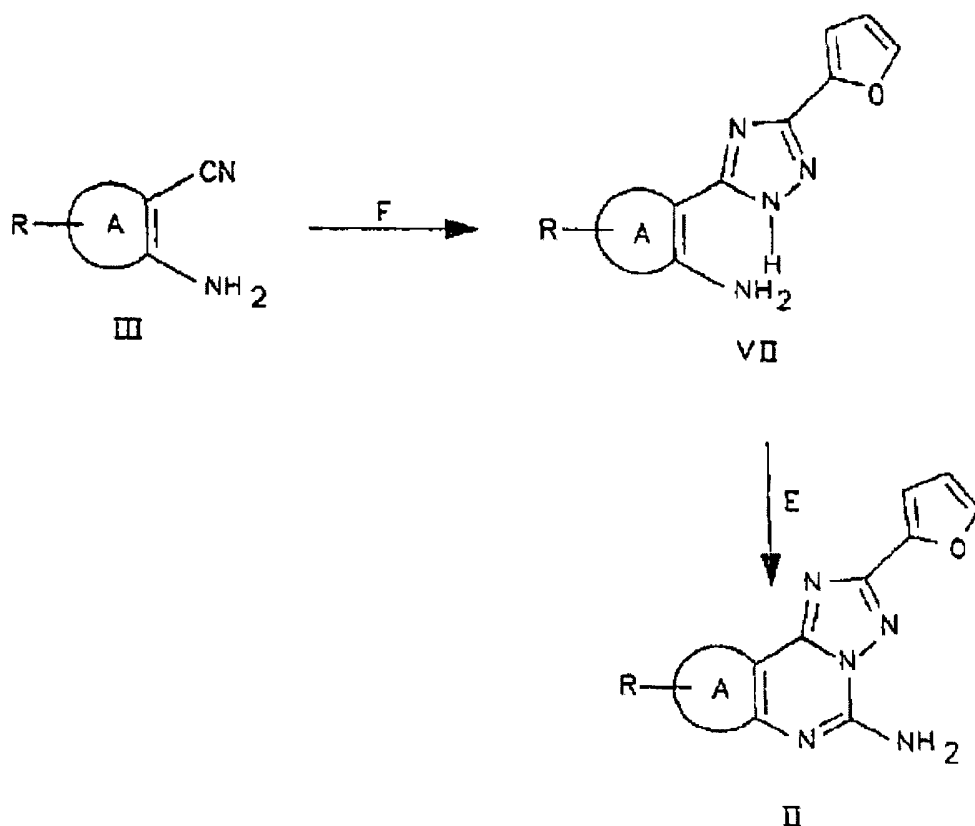
Schema I



Reactivi: A) trietil ortoformiat; B) hidrazida acidului 2-furoic, 2-metoxietanol; C) PhOPh, 260°C; D) HCl 10%, cu refluxare; E) cianamidă, pTsOH, N-metilpirolidonă.

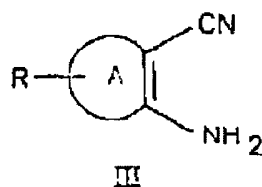
RO 121030 B1

Schema II



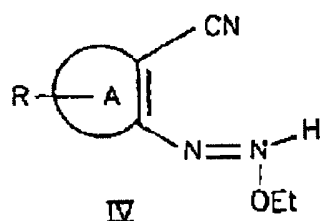
Reactivi: F) hidrazida acidului furoic, difenil eter; E) cianamidă, pTsOH, N-metil-pirolidonă.

Compușii cu formula II pot fi preparați fie printr-o cale indirectă, descrisă în schema I, fie printr-o cale directă, descrisă în Schema II. Materialele de plecare corespunzătoare pentru ambele scheme sunt nitrilii orto-amino heterociclici cu formula III, preparați în general conform procedeele sintetice cunoscute în literatură și raportate în cartea lui E. C. Taylor și A. McKillop (vol. 7, din seriile *Advances in Organic Chemistry*, Ed., Interscience, 1970).

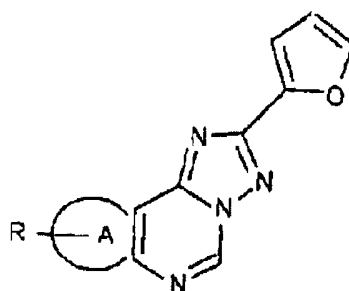


Orto-amino nitrilii III sunt transformați în imidații corespunzători cu formula IV, prin reacția cu un exces de etil ortoformiat, la temperatură de refluxare, timp de 8...10 h. Reacția conduce, după evaporarea etil ortoformiatului, la imidații IV corespunzători, substanțial puri, cu un randament ridicat, așa cum se evidențiază prin analiza spectrului RMN (rezonanță magnetică nucleară) a ^1H în IR a produșilor de reacție brute:

RO 121030 B1

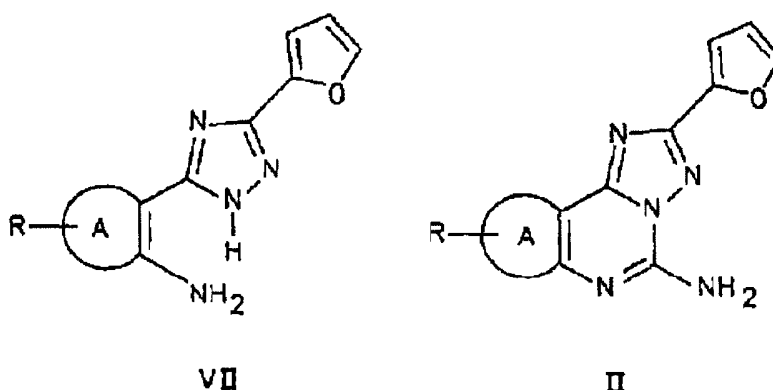


Imidații cu formula IV sunt supuși, apoi, unei secvențe de două reacții, care permit obținerea structurilor triciclice cu formula VI, la un randament ridicat:



Secvența de reacție include: a) reacția cu hidrazida acidului 2-furoic într-o soluție de 2-metoxietanol, la temperatura de reflux, timp de 8...10 h, pentru obținerea compușilor intermediari cu formula V; b) ciclizarea termică a celui din urmă, cu formarea compușilor corespunzători cu formula VI, prin încălzirea în difenil eter la temperatura de 260°C, timp de 0,5...1 h.

Compușii triciclici VI sunt apoi hidrolizați cu HCl la reflux, timp de 1...3 h, pentru a da triazolii VII, care, în final, sunt ciclizați în compușii II doriți, cu cianamidă în N-metil pirolidonă la reflux și în prezența acidului *para*-toluensulfonic (Schema I).

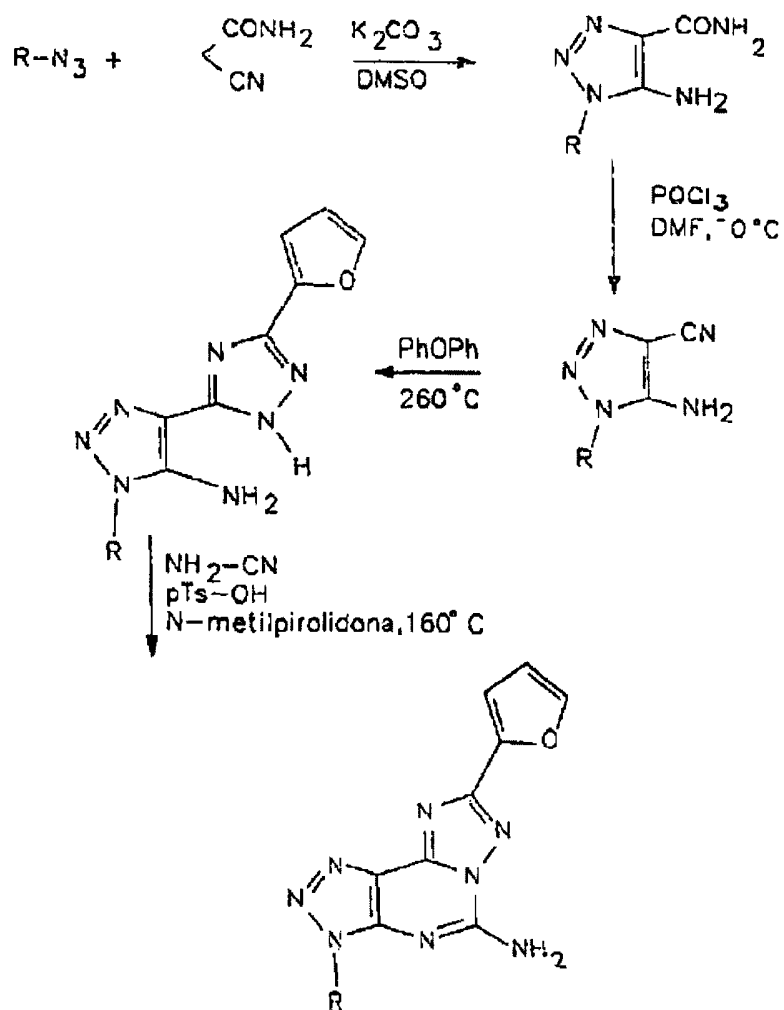


În unele cazuri, triazolii VII pot fi obținuți prin încălzirea directă în difenil eter, a *orto*-amino nitrilului III cu hidrazida acidului 2-furoic. Triazolii VII sunt apoi ciclizați, așa cum s-a descris mai sus, în schema II. În următoarele scheme III, IV și V, sunt raportate mai detaliat sintezele compușilor cu formula II, în care A este un inel triazolic.

RO 121030 B1

Schema III

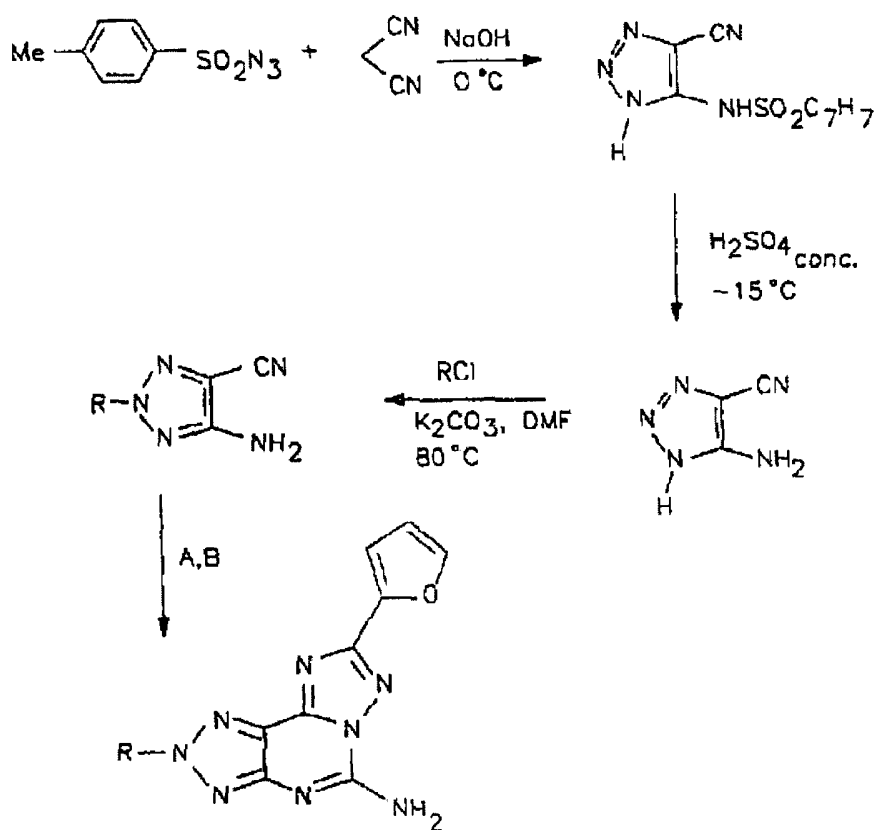
Sinteza derivaților 5-amino-7-substituit-2(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazolo
[1,5-c]pirimidinici



RO 121030 B1

Schema IV

Sinteza derivaților 5-amino-8-substituit-2(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinici

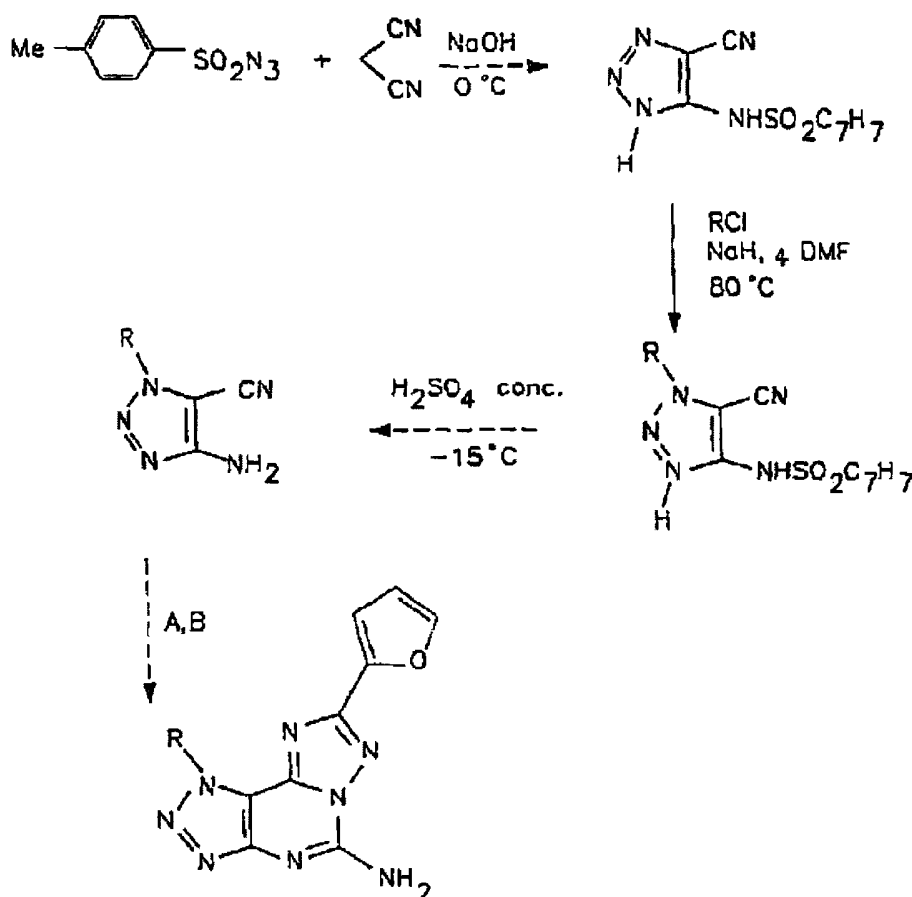


Reactivi: A) hidrazida acidului furoic, PhOPh, 260 °C; B) NH₂CN, pTsOH, N-metilpirolidonă.

RO 121030 B1

Schema V

Sinteza derivaților 5-amino-9-substituit-2(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinici



Reactivi: A) hidrazida acidului furoic, PhOPh, 260 °C; B) NH₂CN, pTsOH, N-metil-pirolidonă.

În final, compușii II, conținând 5-amino, sunt reacționați cu acizi carboxilici, acizi sulfonici, acizi carboxilici activați, acizi sulfonici activați, acizi tiocarboxilici, acizi tiocarboxilici activați și similari, pentru a forma compușii doriți.

Acizii carboxilici activați includ halogenuri, esteri, anhidride și alți derivați cunoscuți că reacționează cu aminele pentru a forma amide. Acizii sulfonici activați includ halogenurile sulfonice, cum ar fi sulfonyl clorurile.

Nu este necesar în toate cazurile să se utilizeze derivați ai acizilor carboxilici și sulfonici activați. Acizii înșiși pot fi cuplați cu aminele, utilizând metode chimice de cuplare standard, spre exemplu, utilizând diciclohexil diimida (DCI) și alți agenți de cuplare folosiți în mod uzual. Condițiile de cuplare adecvate, pentru formarea legăturilor amidice, sunt bine cunoscute de către specialiștii din domeniul sintezei peptidelor.

În general, chimia de mai sus poate fi utilizată pentru prepararea 8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinelor atunci când se folosesc ca materiale de plecare 3-cian-2-aminopirazoli. 3-cian-2-amino-pirazoli pot să reacționeze cu o halogenură alchilică (RX) într-un solvent aprotic polar, cum ar fi dimetil formamida (DMF) pentru a furniza

o grupare R pe unul dintre atomii de azot ai ciclului. Compusul rezultat poate fi refluxat cu trietil ortoformiat, pentru a furniza un ester imino etilic, care poate să reacționeze cu hidrazida furoică, preferabil prin utilizarea unei trape Dean-Stark pentru eliminarea azeotropă a apei produse în reacție, în scopul formării 8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinelor. Pentru utilizarea în reacțiile chimice ulterioare, produșii pot fi purificați prin cromatografie, spre exemplu, în (EtOAc/hexan 1:1).

Produsul acestei reacții poate să reacționeze cu un acid adecvat, cum ar fi HCl, la reflux, urmat de reacția cu cianamidă într-un solvent, cum ar fi N-metil pirolidona cu acid *para*-toluensulfonic catalitic la temperaturi ridicate, pentru a forma 5-amino-8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinele.

Acești compuși amino-substituiți pot să reacționeze cu izocianați adecvați, pentru a forma compuși ureici, cu acizi carboxilici activați, cum ar fi hidracizii, pentru a forma amide, cu acizi sulfonici activați, cum ar fi halogenurile acizilor sulfonici, pentru a forma sulfonamide, sau cu alți derivați reactivi ai acizilor carboxilici sau sulfonici, pentru a forma alți compuși doriți.

Compușii triazolo-triazolo-pirimidinici pot fi preparați cu ajutorul reacțiilor chimice similare, dar plecând de la o azidă funcționalizată corespunzător și pusă să reacționeze cu $H_2NC(O)CH_2CN$, pentru a forma inelul heterociclic inițial, urmată de reacția grupării amidice cu un agent de deshidratare, cum ar fi $POCl_3$, pentru a forma un nitril. Ciano-aminotriazolul rezultat poate să fie supus reacției în aceeași manieră ca și 3-ciano-2-aminopirazolii discutați mai sus, pentru a prepara triazolo-triazolo-pirimidinele.

Sinteza analogilor radiomarcați

Compușii pot fi marcați cu orice radiomarker potrivit. Exemple de radiomarkeri potriviți includ 3H și ^{14}C , dar poate fi utilizat orice radiomarker substanțial netoxic, folosit în mod obișnuit în studiile farmacocinetice. Modalitățile de încorporare a radiomarkerilor în compuși organici sunt bine cunoscute de către specialiștii din domeniu.

Când compușii sunt compuși 5-[[fenil substituit]amino]carbonil]amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinici sau compuși 5-amino-8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinici, încorporarea unui marker tritium este, de departe, cea mai directă.

Într-o aplicație practică, o materie primă potrivită este un compus în care gruparea (ar)alchil din poziția 8-include o dublă legătură. Legătura dublă poate fi supusă reacției cu tritium, în prezența unui catalizator adecvat, spre exemplu, paladiu pe cărbune vegetal, sau a altor catalizatori de hidrogenare cunoscuți.

Spre exemplu, 5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-(1,2-ditritio-propil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (compusul 102) poate fi preparată prin adăugarea de tritium peste legătura dublă a 5-[[[(4-metoxi-fenil)amino]carbonil]amino-8-1-propenil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinei (compusul 101). Compusul 102 este discutat mai jos, în raport cu diferitele studii de afinitate a legării pe celulele canceroase JURKAT.

Alternativ, markerul tritium poate fi prezent pe compușii utilizați să reacționeze cu gruparea 5-amino, pentru a forma grupări amidice, ureice sau altele în poziția 5-. Spre exemplu, izocianații utilizați pentru prepararea compușilor 5-aminocarbonilamino descriși aici pot include un tritium sau alți radiomarkeri și, ca urmare, pot fi ușor încorporați în produsul final.

Într-o altă aplicație practică, radiomarkerul poate fi încorporat în moleculă, în timp ce sistemul ciclic este pus împreună cu acesta. Așa cum s-a discutat mai sus în legătură cu sinteza compușilor cu formula II, diverși compuși triciclici cu formula VI sunt hidrolizați cu HCl, pentru a da triazolii cu formula VII, care sunt ciclizați cu cianamidă la refluxare, în prezența acidului *para*-toluensulfonic, așa cum s-a arătat în schema I. Este relativ direct să se încorporeze un marker ^{14}C în această etapă din sinteză, utilizând cianamidă marcată cu ^{14}C .

RO 121030 B1

Compușii iodurați pot fi preparați, spre exemplu, prin încorporarea unui iod radioactiv în compusul aromatic utilizat pentru a reacționa cu gruparea 5-amină. Încorporarea iodului în inelele aromatice este bine cunoscută specialiștilor din domeniu. Este ușor să se încorporeze un atom de iod în compușii aromatici utilizați pentru a reacționa cu gruparea 5-amină în scopul preparării compușilor descriși aici.	1 3 5
În consecință, utilizând nu mai mult decât cunoștințele din domeniu, pot fi preparați rapid analogi radiomarcați adecvați.	7
<i>Sinteza analogilor marcați fluorescent</i>	
Ca și în cazul compușilor radiomarcați, sinteza compușilor marcați fluorescent este relativ directă. De preferință, grupările fluorescente sunt prezente în poziția R ₂ , deși este fezabilă, de asemenea, și substituția în poziția R ₃ . În una dintre aplicații, gruparea(ile) fluorescentă(e) include un inel furanic care poate fi atașat la poziția R ₃ . Alternativ, pot fi utilizate alte inele aromatice. Sunt bine cunoscuți specialiștilor din domeniu markerii fluorescenti, iar aceștia pot fi rapid atașați la compușii descriși aici, utilizând reacții chimice cunoscute.	9 11 13 15
<i>Metode de utilizare a compușilor</i>	
Compușii pot fi utilizați în toate indicațiile pentru agoniștii și antagoniștii receptorului A ₃ , incluzând:	17
- tratarea hipertensiunii;	19
- tratarea tulburărilor inflamatorii, cum ar fi artrita reumatoidă și psoriazisul;	
- tratarea tulburărilor alergice, cum ar fi febra fânului (guturaiul) și rinitele alergice;	21
- degranularea celulelor mastice;	
- agenți antitumorali;	23
- tratarea hipoxiei cardiace; și	
- protecția împotriva ischemiei cerebrale;	25
așa cum a fost descris, spre exemplu, în <i>Jacobson</i> , TIPS May 1998, pp. 185-191, al cărei conținut este încorporat aici ca referință.	27
O întrebuintare preferată a acestor compuși este în detectarea și/sau tratamentul cancerului. Așa cum s-a discutat mai jos, s-a arătat că celulele tumorale exprimă receptorul A ₃ . Se crede că receptorul A ₃ protejează celulele de lezarea ischemică, atunci când acestea nu primesc un aport adecvat de sânge. Câteva medicamente disponibile comercial, precum și medicamente aflate în curs de elaborare sunt puse în aplicare încet, pentru inhibarea exprimării VEGF care stopează aportul de sânge spre celulele tumorale. Cu toate acestea, agonismul receptorilor A ₃ adenzinici poate realiza un efect protector, oprind moartea celulelor tumorale, în timp ce celulele nu primesc un aport adecvat de sânge. Prin administrarea antagoniștilor acestor receptori, împreună cu compuși anti-VEGF sau cu alți compuși anti-angiogenici, celulele tumorale pot fi izolate de un nou aport de sânge, pierzând protecția față de prejudiciul ischemic pe care îl produce agonismul receptorilor A ₃ .	29 31 33 35 37
Compușii pot fi administrați unui pacient prin orice modalitate acceptabilă medical. Mijloace adecvate de administrare includ administrarea orală, rectală, topică sau parenterală (incluzând adminstrarea subcutanată, intramusculară și intravenoasă), deși sunt preferate administrarea orală sau parenterală.	39 41
Cantitatea de compus necesară, pentru ca acesta să fie eficient ca modulator al unui receptor adenzinic, va varia, desigur, în funcție de individul mamifer care trebuie tratat, și va fi, în ultimă instanță, la latitudinea medicului sau a veterinarului. Factorii care trebuie luați în considerare includ starea de boală care trebuie tratată, calea de administrare, natura formulării, greutatea corporală a mamiferului, aria suprafeței, vârsta și starea generală, și compusul particular care trebuie administrat. Cu toate acestea, o doză eficientă corespunzătoare este din domeniul de la aproximativ 0,1 ng/kg până la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală per zi, de preferință, din domeniul de la aproximativ 1 până la aproximativ 3 mg/kg per zi.	43 45 47 49 51

1 Doza zilnică totală poate fi administrată ca doză unică, doze multiple, de exemplu,
de 2...6 ori pe zi, sau prin infuzie intravenoasă pe o durată aleasă. Dozările peste sau sub
3 gama citată mai sus fac parte din domeniul prezentei invenții și pot fi administrate pacientului
individual, dacă dorește sau dacă este necesar. Spre exemplu, pentru un mamifer de 75 de
5 kg, o gamă de dozare este de aproximativ 75 până la aproximativ 220 mg per zi, iar o doză
tipică va fi de aproximativ 150 mg per zi. Dacă sunt indicate doze multiple, tratamentul ar
7 putea fi, tipic, de 50 mg dintr-un compus, administrate de 3 ori pe zi.

Într-o altă aplicație practică, compușii radiomarcați pot fi administrați unui pacient, în
9 scopul efectuării unui test de determinare a prezenței sau absenței celulelor tumorale cance-
roase care exprimă receptorii A_3 . Compușii descriși aici ca având o afinitate relativ ridicată
11 pentru subtipul de receptor A_3 , sunt administrați avantajos unui pacient, iar după ce compușii
s-au legat de receptorii A_3 prezenți în celulele tumorale, localizarea compușilor poate fi deter-
13 minată prin determinarea localizării compușilor radiomarcați. Procedee de determinare a
localizării și a densității compușilor radiomarcați sunt bine cunoscute specialiștilor din
15 domeniu.

De asemenea, poate fi avantajoasă utilizarea compușilor radiomarcați și/sau fluores-
17 cent marcați în timpul operațiilor chirurgicale pentru îndepărtarea țesutului canceros. Adesea,
chirurgii trebuie să se asigure de completa îndepărtare a țesutului canceros. Compușii radio-
19 marcați sau fluorescent marcați pot fi administrați unui pacient, fie înainte, fie în timpul inter-
venției chirurgicale și se vor lega de celulele canceroase prezente în pacient. Timpul de
21 administrare va varia în funcție de, printre alți factori, preluarea compusului particular de
către celulele tumorale particulare și de localizarea tumorii în corp. Astfel, chirurgul are un
23 test relativ direct pentru determinarea prezenței celulelor canceroase reziduale după
îndepărtarea tumorii. Prezența celulelor tumorale reziduale poate fi determinată prin
25 măsurarea fluorescenței sau a radioactivității la situsul operativ cu ajutorul procedeeleor
analitice bine cunoscute de către specialiștii din domeniu.

27 Detectarea celulelor canceroase *in vitro* poate fi efectuată prin administrarea com-
pușilor la o suspensie de celule în mediul de cultură celular, permiterea compusului să se
29 lege de receptorii A_3 adenozinici de pe celulele canceroase și detectarea markerului.

Formulări

31 Compușii descriși mai sus sunt administrați, de preferință, într-o formulare care in-
clude un compus activ, adică un compus cu formula I, împreună cu un purtător acceptabil
33 pentru modul de administrare. Sunt cunoscuți de către specialiștii din domeniu purtătorii
acceptabili din punct de vedere farmaceutic, adecvați.

35 Opțional, compozițiile pot include și alți ingrediente activi din punct de vedere terapeu-
tic, cum ar fi: agenții antivirali, antitumorali, antibacterieni, antiinflamatori, analgezicele și
37 imunosupresoarele. Purtătorul trebuie să fie acceptabil din punct de vedere farmaceutic, în
sensul de a fi compatibil cu ceilalți ingrediente ai formulării și nu vătămători pentru acceptorul
39 acestuia.

Formulările pot include purtători adecvați administrării orale, rectale, topice sau
41 parenterale (inclusiv, subcutanate, intramusculare și intravenoase). Sunt preferați purtătorii
potrivii pentru administrarea orală sau parenterală.

43 Formulările potrivite pentru administrarea parenterală includ, în mod convenabil, pre-
paratul apos steril al compusului activ, care este, de preferință, izotonic cu sângele primi-
45 torului. Așadar, asemenea formulări pot conține, în mod convenabil, apă distilată, dextroză
5% în apă distilată sau salină. Formulările utile includ, de asemenea, soluții concentrate sau
47 solide conținând compusul cu formula I, care, prin diluție cu un solvent corespunzător, dau
o soluție adecvată pentru administrarea parenterală de mai sus.

RO 121030 B1

Pentru administrarea enterală, compusul poate fi încorporat într-un purtător inert, în unități mici, cum ar fi: capsule, cașete, tablete sau pastile, fiecare dintre acestea conținând o cantitate predeterminată din compusul activ sub formă de pulbere sau granule; sau de suspensie sau soluție într-un lichid apos sau neapos, spre exemplu, un sirop, un elixir, o emulsie sau un lichid. Purtători adecvați pot fi amidonurile sau zaharurile și includ lubrifianți, aromatizanți, lianți și alte materiale de aceeași natură.

O tabletă poate fi fabricată prin comprimare sau turnare în forme, opțional cu unul sau mai mulți ingrediente suplimentare. Tabletele comprimate pot fi preparate prin comprimarea, într-o mașină corespunzătoare, a compusului activ într-o formă fără curgere, exemplu., pulbere sau granule, opțional amestecat cu ingrediente, de exemplu, lianți, lubrifianți, diluanți inerti, agenți activi de suprafață sau de dispersare. Tabletele turnate în forme pot fi obținute prin turnarea în forme, într-o mașină corespunzătoare, a amestecului format din compusul activ, pulverizat, cu orice purtător potrivit.

Un sirop sau o suspensie pot fi obținute prin adăugarea compusului activ la o soluție apoasă concentrată a unui glucid, de exemplu, sucroza, la care se pot adăuga, de asemenea, orice ingrediente. Astfel de ingrediente pot include aromatizanți, un agent pentru întârzierea cristalizării zahărului sau un agent de mărire a solubilității oricărui alt ingredient, de exemplu, un alcool polihidroxilic, spre exemplu, glicerol sau sorbitol.

De asemenea, compușii pot fi administrați local, prin aplicarea topică a unei soluții, alifii, creme, gel, loțiuni sau material polimeric (spre exemplu, Pluronic™, BASF), care pot fi preparați prin metodele convenționale, cunoscute în domeniul farmaceutic. În afara soluției, alifiei, cremei, gelului, loțiunii sau bazei polimerice și a ingredientului activ, astfel de formulări topice pot conține, de asemenea, antiseptice, parfumuri și agenți farmaceutici activi, suplimentari.

Formulările pentru administrarea rectală pot fi prezentate sub formă de supozitoare cu un purtător convențional, de exemplu, untul de cacao sau Witepsol S55 (Marcă înregistrată Dynamite Nobel Chemical, Germany), pe o bază de supozitor.

Alternativ, compusul poate fi administrat în lipozomi sau microsfele (sau microparticule). Metodele pentru prepararea lipozomilor și a microsferelor destinate administrării la un pacient sunt bine cunoscute de către specialiștii din domeniu. Brevetul **US 4789734**, al cărui conținut este încorporat aici ca referință, descrie metode pentru încapsularea materialelor biologice în lipozomi. În esență, materialul este dizolvat într-o soluție apoasă, se adaugă fosfolipidele și lipidele adecvate, împreună cu agenții de suprafață, dacă este nevoie, iar materialul este dializat sau sonicat, dacă este necesar. O trecere în revistă a metodelor cunoscute este furnizată de G. Gregoriadis, Chapter 14, "Liposomes", *Drug Carriers in Biology and Medicine*, pp. 287-341 (Academic Press, 1979). Microsfele formate din polimeri sau proteine sunt bine cunoscute specialiștilor din domeniu și pot fi proiectate pentru trecerea prin tractul gastrointestinal direct în circuitul sanguin. Alternativ, compusul poate fi încorporat, iar microsfelele sau compoziția de microsfele pot fi implantate pentru eliberarea lentă, într-o perioadă de timp cuprinsă între zile și luni. A se vedea, spre exemplu, brevetele **US 4906474**, **4925673** și **3625214**, ale căror conținuturi sunt încorporate aici ca referințe.

Microparticulele preferate sunt cele preparate din polimeri biodegradabili, cum ar fi poliglicolide, polilactide și copolimeri ai acestora. Specialiștii din domeniu pot determina rapid un sistem purtător corespunzător, în funcție de diferiți factori, incluzând viteza dorită de eliberare a medicamentului și dozarea dorită.

Formulările pot fi prezentate comod, sub formă de dozare unitară și pot fi preparate prin una dintre metodele bine cunoscute în domeniul farmaceutic. Toate metodele includ etapa de aducere a compusului activ în asociere cu un purtător, care constituie unul sau mai

RO 121030 B1

1 multe ingrediente. În general, formulările sunt preparate prin aducerea uniformă și intimă a
compusului activ în asociere cu un purtător lichid sau cu un purtător solid fin divizat și apoi,
3 dacă este necesar, aranjarea produsului într-o formă de dozare unitară dorită.

În afara ingredientelor menționate mai sus, formulările mai pot include și unul sau mai
5 multe ingrediente utilizate în domeniul formulărilor farmaceutice, de exemplu, diluanți, tam-
poane, agenți aromatizanți, lianți, agenți activi de suprafață, agenți de îngroșare, lubrifianți,
7 agenți de suspendare, conservanți (incluzând antioxidanți) și similari.

Determinarea gradului de activitate pentru compuși

9 Activitatea compușilor poate fi determinată rapid, utilizând nu mai mult decât experi-
mentarea de rutină, cu ajutorul oricăruia dintre testele următoare.

Testul de legare la receptorii adenozinici A₁ și A_{2A} extrași din șobolan

Obținerea membranelor

13 Șobolani masculi Wistar (200...250 g) pot fi decapitați, iar creierul întreg (mai puțin
materia albă, striatul și cerebelul) este desecat pe gheață. Țesuturile de creier pot fi dezinte-
15 grate într-un Polytron (poziția 5) în 20 de volume de tampon 50 mM Tris-HCl, pH=7,4. Apoi,
omogenizatul poate fi centrifugat la 48.000 g, timp de 10 min, iar depozitul resuspendat în
17 Tris-HCl, conținând 2 U/ml adenzin deaminază de tip VI (Sigma Chemical Company, St.
Louis, Mo., USA). După 30 min de incubare la 37°C, membranele pot fi centrifugate, iar
19 depozitele păstrate la -70°C. Țesuturile striate pot fi omogenizate cu un Polytron în 25
volume de tampon 50 mM Tris-HCl, conținând 10 mM MgCl₂, pH=7,4. Apoi, omogenatul
21 poate fi centrifugat la 48.000 g, timp de 10 min la 4°C și resuspendat în tampon Tris-HCl,
conținând 2 U/ml adenzin deaminază. După 30 min de incubare la 37°C, membranele pot
23 fi centrifugate, iar depozitul păstrat la -70°C.

Testul de legare cu ligand radiomarcant

25 Legarea [³H]-DPCPX (1,3-dipropil-8-ciclopentilxantină) la membranele de creier de
șobolan poate fi realizată, în esență, conform metodei descrise anterior de Bruns et al., *Proc.*
27 *Natl. Acad. Sci.* **77**, 5547-5551, 1980. Experimentele de dezlocuire pot fi efectuate în 0,25
ml de tampon conținând 1 nM de [³H]-DPCPX, 100 μl de membrane diluate de creier de
29 șobolan (100 μg de proteină/test) și cel puțin 6...8 concentrații diferite din compușii
examinați. Legarea nespecifică poate fi determinată în prezența a 10 nM de CHA (N⁶ciclo-
31 hexiladenozină), iar aceasta este întotdeauna < 10% din legarea totală. Timpii de incubare
sunt în mod caracteristic 120 min, la 25°C.

33 Legarea [³H]-SCH 58261 (5-amino-7-(2-feniletil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-
triazolo[1,5-c]pirimidină la membranele striate de șobolan (100 μg de proteină/test) poate fi
35 efectuată conform metodelor descrise în Zocchi și colab., *J. Pharm. and Exper. Ther.* **276**:
398-404 (1996). În studiile de competiție trebuie utilizate cel puțin 6...8 concentrații diferite
37 din compușii examinați. Legarea nespecifică poate fi determinată în prezența a 50 (μM
NECA (5'-(N-etilcarboxamido)adenozină). Timpul de incubare este în mod caracteristic 60
39 min, la 25°C.

Radioactivitatea legată și cea liberă pot fi separate prin filtrarea amestecului de testat
41 pe filtre din fibră de sticlă Whatman GF/B, utilizând un recoltator de celule, Brandel
(Gaithersburg, MD, USA). Amestecul de incubare poate fi diluat cu 3 ml tampon de incubare
43 răcit pe gheață, filtrat rapid sub vid, iar filtrul poate fi spălat de 3 ori cu 3 ml din tamponul de
incubare. Radioactivitatea legată pe filtru poate fi măsurată, spre exemplu, prin spectrometrie
45 de scintilație lichidă. Concentrația proteică poate fi determinată, spre exemplu, conform
metodei Bio-Rad (Bradford, *Anal. Biochem.* **72**:248 (1976)) cu albumină bovină ca standard
47 de referință.

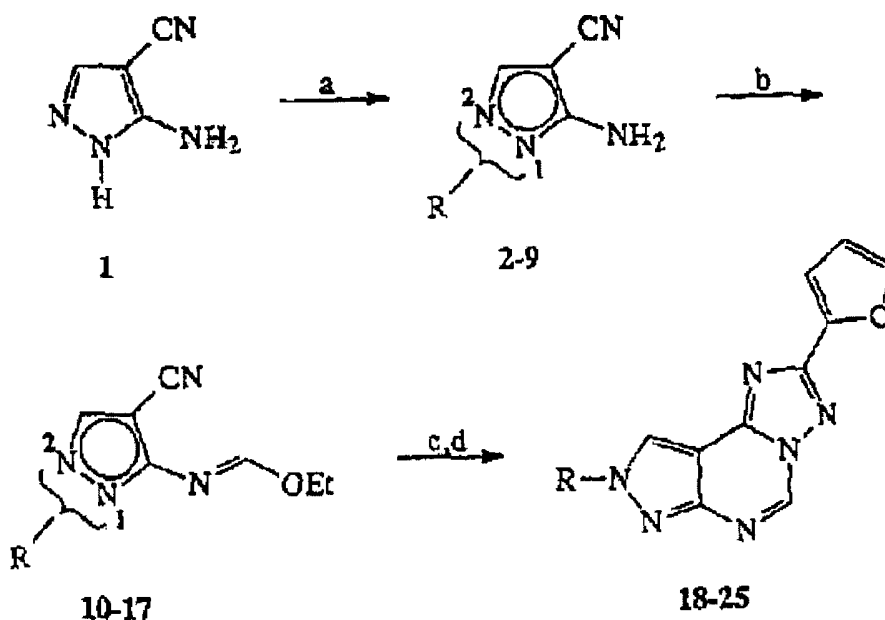
RO 121030 B1

<i>Testul de legare la receptorul adenozinic A₃ (extras) din clone umane</i>	1
<i>Testele de legare la receptor</i>	
Testele de legare pot fi efectuate conform metodelor descrise de Salvatore și colab., în <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 90: 10365-10369, (1993). În studiile de saturare, o parte alicotă de membrane (8 mg proteină/ml) de celulele HEK-293 transfectate cu receptorul adenozinic A ₃ recombinant uman (Research Biochemical International, Natick, MA, USA) poate fi incubat cu 10...12 concentrații diferite de [¹²⁵ I]AB-MECA din domeniul 0,1...5 nM. Experimentele de competiție pot fi realizate în duplicat, într-un volum final de 100 μl, în tuburi de testare conținând 0,3 nM de [¹²⁵ I]AB-MECA, 50 mM tampon Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , pH=7,4 și 20 μl membrane diluate (12,4 mg proteină/ml) și cel puțin 6...8 concentrații diferite din liganzii examinați.	3
Timpul de incubare a fost de 60 min, la 37°C, în conformitate cu rezultatele experimentelor anterioare în funcție de timp. Radioactivitatea legată și cea liberă au fost separate prin filtrarea amestecului test pe filtre din fibră de sticlă Whatman GF/B, utilizând o mașină Brandel de recoltat celule (Gaithersburg, MD, USA). Legarea nespecifică a fost definită ca legarea în prezența a 50 μM de R-PIA și a fost aproximativ 30% din legarea totală. Amestecul de incubare poate fi diluat cu 3 ml tampon de incubare răcit pe gheață, filtrat rapid sub vid, iar filtrul a fost spălat de 3 ori cu 3 ml din tamponul de incubare. Radioactivitatea legată pe filtru a fost numărată într-un contor Beckman gamma 5500B γ. Concentrația proteică poate fi determinată conform metodei Bio-Rad (3), cu albumină bovină ca standard de referință.	5
<i>Analiza datelor</i>	7
Valorile constantei de inhibare a legării, K _i , pot fi calculate din valorile IC ₅₀ , în conformitate cu ecuația lui Cheng și Prusoff (Cheng and Prusoff, <i>Biochem. Pharmacol.</i> 22: 3099-3108 (1973)), $K_i = IC_{50}/(1+[C^*]/K_d^*)$, unde [C*] este concentrația radioligandului, iar K _d * constanta sa de disociere.	9
Pentru analiza pe calculator a experimentelor de saturare și de inhibare, se poate utiliza un program adecvat (soft încărcat pe hard disk-ul calculatorului), LIGAND, care calculează curba prin metoda neliniară a celor mai mici pătrate (Munson și Rodbard, <i>Anal. Biochem.</i> 107: 220-239 (1990)). Datele sunt exprimate în mod caracteristic ca medie geometrică, cu limitele de încredere de 95 sau 99%, în paranteze.	11
Exemple	13
Următoarele exemple ilustrează aspecte ale acestei invenții, dar nu trebuie luate drept limitări. Simbolurile și convențiile utilizate în aceste exemple tind să fie în concordanță cu cele utilizate în literatura chimică internațională contemporană, spre exemplu: <i>Journal of the American Chemical Society</i> (J. Am. Chem. Soc.) și <i>Tetrahedron</i> .	15
Exemplul 1. Prepararea 8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinelor (compușii 18...25)	17
8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinele au fost preparate conform strategiei de sinteză prezentată în următoarea schemă VI.	19
În prepararea compușilor 18...25, o soluție de 1 (10 mmoli) în 40 ml de DMF, răcită la 0°C, a fost tratată cu NaH (60% în ulei, 12 mmoli), în câteva porțiuni, peste 10 min. După 45 min, a fost adăugată halogenura de (ar)alchil (12 mmoli), iar amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească la 25°C și a fost agitat timp de 3...5 h (CSS:EtOAc 1:1). Reacția a fost stinsă prin adăugare de H ₂ O (80 ml), iar stratul apos a fost extras cu EtOAc (5 x 25 ml). Straturile organice au fost recombinate, uscate (pe Na ₂ SO ₄), filtrate și concentrate la presiune redusă, pentru producerea pirazolului alchilat (2-9) ca amestec inseparabil de izomeri N ¹ și N ² (în raport de aproximativ 1:4).	21

RO 121030 B1

Schema VI. Procedee generale pentru prepararea 8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinelor (compușii 18...25)

Reactivi a) NaH, DMF, RX; b) HC(OEt)₃ la reflux; c) Hidrazida 2-furoică, MeO(CH₂)₂OH; d) Ph₂O, 260°C, cromatografie frontală



Apoi, acest amestec de N¹ și N²-substituit-4-ciano-5-amino pirazoli (2-9) a fost dizolvat în trietil ortoformiat (60 ml), iar soluția a fost refluxată sub atmosferă de azot, timp de 8 h. Solventul a fost apoi îndepărtat sub vid, iar reziduul uleios, alcătuit din amestecul de imidați (10-17), a fost dizolvat în 2-metoxietanol (50 ml) și s-a adăugat hidrazida acidului 2-furoic (13 mmoli). Amestecul a fost refluxat timp de 5...10 h, apoi, după răcire, solventul a fost îndepărtat sub presiune redusă, iar reziduul uleios brun a fost ciclizat ulterior, prin oricare altă purificare în difenil eter (50 ml) la 260°C, cu ajutorul unei trape Dean Stark, pentru eliminarea azeotropă a apei produse în reacție. După 1,5 h, amestecul a fost turnat în hexan (300 ml) și răcit. Precipitatul a fost filtrat și purificat prin cromatografie (EtOAc/hexan 1:1). În acest fel, produsul principal (N⁸ alchilat) (18-25) a fost obținut cu un randament bun.

Urmând acest procedeu general, au fost preparați următorii compuși:

8-Metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (18), randament 45%; solid galben, punct de topire 155...156°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 1615, 1510 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 4,1 (s, 1H); 6,32 (m, 1H); 7,25 (m, 1H); 8,06 (m, 1H); 8,86 (s, 1H); 9,38 (s, 1H).

8-Etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (19), randament 50%; solid galben pal, punct de topire 188...189°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 1620, 1500 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 1,67 (t, 2H, J = 7); 4,53 (q, 2H, J = 7); 6,59 (m, 1H); 7,23 (m, 1H); 7,64 (s, 1H); 8,34 (s, 1H); 9,10 (s, 1H).

8-Propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (20), randament 60%; solid galben, p.t. 189-190°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 1600, 1505 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 0,98 (t, 2H, J = 7); 2,03-2,10 (m, 2H); 4,41 (q, 2H, J = 7); 6,60 (m, 1H); 7,24 (m, 1H); 7,64 (s, 1H); 8,32 (s, 1H); 9,10 (s, 1H).

RO 121030 B1

8-Butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (21), randament 50%; solid galben pal, punct de topire 245...247°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 1610, 1500 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 0,9 (m, 3H); 1,3 (m, 2H); 1,9 (m, 2H); 4,5 (t, 2H, J = 7,2); 6,2 (m, 1H); 7,3 (m, 1H); 8,0 (m, 1H); 8,9 (s, 1H); 9,4 (s, 1H).

8-Izopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (22), randament 54%; solid galben pal, punct de topire 235...237°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 1635, 1510, 1450 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 1,0 (d, 6H, J = 6,2); 1,5-1,9 (m, 3H); 4,6 (t, 2H, J = 7,4); 6,6 (m, 1H); 7,3 (m, 1H); 7,7 (m, 1H); 8,8 (s, 1H); 9,1 (s, 1H).

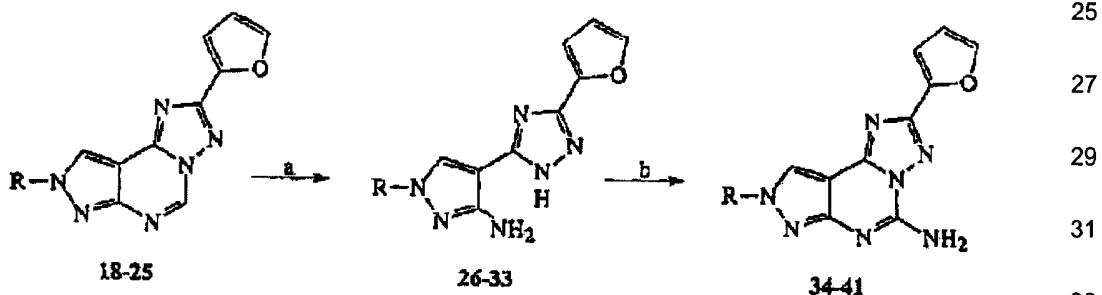
8-(2-Izopentenil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (23), randament 48%; solid galben, punct de topire 210...212°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 1625, 1500, 1430 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 1,79 (s, 3H); 1,87 (s, 3H); 5,05 (d, 2H, J = 6); 5,55-5,63 (m, 1H); 6,60 (m, 1H); 7,24 (m, 1H); 7,64 (s, 1H); 8,34 (s, 1H); 9,10 (s, 1H).

8-(2-Feniletil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (24), randament 56%; punct de topire 268...270°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 1660, 1510, 1450 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 3,32 (t, 2H, J = 6,7); 4,72 (t, 2H, J = 6,7); 6,73 (s, 1H); 7,23 (m, 5H); 7,95 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 9,41 (s, 1H). Anal. (C₁₈H₁₄N₆O) C, H, N.

8-Izopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (25), randament 63%; solid galben, punct de topire 165...166°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 1630, 1500, 1440 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 2,34-2,48 (m, 2H); 2,67 (t, 3H, J = 7,5); 4,43 (t, 2H, J = 7,5); 6,61 (m, 1H); 7,16-7,32 (m, 6H); 7,64 (d, 1H, J = 2); 8,29 (s, 1H); 9,02 (s, 1H).

Exemplul 2. Prepararea 5-amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinelor (compușii 33...40)

5-amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinele pot fi preparate conform strategiei de sinteză, prezentate în următoarea schemă VII.



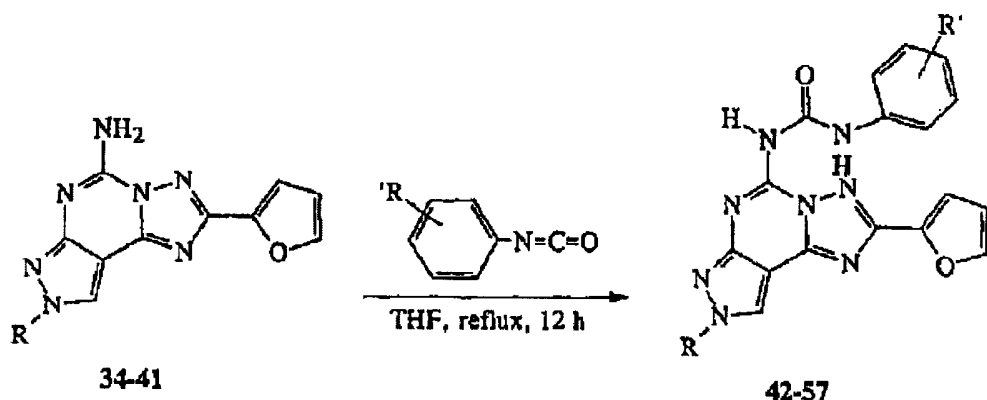
Schema VII. Procedee generale pentru prepararea 5-amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinelor (33...40)

Reactivi: a) HCl, la reflux; b) NH₂CN, 1-metil-2-pirolidonă, pTsOH, 140°C.

Pentru prepararea compușilor 33...40, a fost refluxată, timp de 3 h, o soluție de amestec de triazolo-pirimidină (18-25) (10 mmoli) în HCl 10% (50 ml). Apoi, soluția a fost răcită și neutralizată cu o soluție saturată de NaHCO₃ la 0°C. Compușii (26...33) au fost extrași cu EtOAc (3 x 20 ml), straturile organice au fost uscate cu Na₂SO₄ și evaporate sub vid. Amina brută obținută (26...33) a fost dizolvată în N-metil pirolidonă (40 ml), apoi s-a adăugat cianamidă (60 mmoli) și acid *p*-toluensulfonic (15 mmoli), iar amestecul a fost încălzit la 160°C, timp de 4 h. S-a adăugat din nou cianamidă (60 mmoli), iar soluția a fost încălzită peste noapte. Apoi, soluția a fost diluată cu EtOAc (80 ml), iar precipitatul (excesul de cianamidă) a fost filtrat; filtratul a fost concentrat sub vid și spălat cu apă (3 x 30 ml). Stratul organic a fost uscat (pe Na₂SO₄) și evaporat sub vid. Reziduul a fost purificat prin cromatografie (în EtOAc/eter de petrol 2:1), pentru obținerea produsului dorit (34...41) sub formă solidă.

RO 121030 B1

- Urmând acest procedeu general, au fost preparați următorii compuși:
- 5-mino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (34), randament 53%; solid galben, punct de topire 167...168°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 3500, 2950, 1680, 1645, 1610, 1560, 1455 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ: 4,12 (s, 3H); 6,70 (m, 1H); 6,99 (bs, 2H); 7,18 (m, 1H); 7,81 (s, 1H); 8,42 (s, 1H).
- 5-amino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (35), randament 65%; solid galben, punct de topire 249...250°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 3430-2950, 1680, 1655, 1620, 1550, 1450 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 1,46(t, 2H, J = 7); 4,30(d, 2H, J = 7); 6,72 (m, 1H); 7,18(m, 1H); 7,93 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,62 (s, 1H).
- 5-amino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (36), randament 57%; solid galben pal, punct de topire 209...210°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 3400-2900, 1660, 1645, 1610, 1545, 1430 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 0,83 (t, 2H, J = 7); 1,81-1,91 (m, 2H); 4,22 (d, 2H, J = 7); 6,71 (m, 1H); 7,19 (m, 1H); 7,63 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,61 (s, 1H).
- 5-amino-8-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (37), randament 47%; solid alb, punct de topire 200...203°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 3500-2900, 1685, 1640, 1620, 1550, 1450 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 0,9 (t, 3H); 1,2 (m, 2H); 1,8 (m, 2H); 4,2 (t, 2H); 6,7 (m, 2H); 7,2 (m, 2H); 7,6 (s, 1H); 8,0(s, 1H); 8,6 (s, 1H).
- 5-amino-8-izopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (38), randament 60%; solid albicios, punct de topire 212...213°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 3500-2850, 1670, 1650, 1615, 1560, 1455 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃): δ 0,96 (d, 6H, J = 6,4); 1,59 (m, 1H); 1,86 (m, 2H); 4,32 (t, 2H, J = 6,4); 6,58 (m, 1H); 6,72 (bs, 2H); 7,21 (d, 1H, J = 4,2); 7,63 (d, 1H, J = 1,2); 8,10 (s, 1H).
- 5-amino-8-(2-izopentenil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidină (39), randament 58%; solid galben pal, punct de topire 178...179°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 3520-2950, 1665, 1640, 1610, 1555, 1450 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃): δ: 1,74 (s, 3H); 1,77 (s, 3H); 4,87 (d, 2H, J = 7); 5,43-5,46 (m, 1H); 6,72 (m, 1H); 7,18 (m, 1H); 7,62 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,55 (s, 1H).
- 5-amino-8-(2-feniletil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidină (40), randament 45%; solid alb, punct de topire 183...185°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 3500-2900, 1670, 1645, 1620, 1530, 1455 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ 3,21 (t, 2H, J = 6,4); 4,53 (t, 2H, J = 6,4); 6,7 (s, 1H); 7,1-7,4 (m, 6H); 7,65 (bs, 2H); 7,93(s, 1H); 8,45(s, 1H).
- 5-amino-8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidină (41), randament 57%; solid galben, punct de topire 168...170°C (EtOAc-eter de petrol); IR (KBr): 3510-2950, 1665, 1640, 1615, 1520, 1455 cm⁻¹; ¹H RMN (DMSO d₆): δ: 2,14-2,21 (m, 2H); 2,54 (t, 2H, J = 7); 4,29 (t, 2H, J = 6,4); 6,71 (s, 1H); 7,14-7,32 (m, 6H); 7,64 (bs, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,64 (s, 1H).
- Exemplul 3. Prepararea 5-[[fenil substituit]amino]carbonil]amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinelor (compuși 42...57)**
- 5-[[fenil substituit]amino]carbonil]amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo [4,3-e] 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinele pot fi preparate conform strategiei de sinteză, prezentate în următoarea schemă VIII.
- Pentru prepararea compușilor 42...57, compusul amino adecvat (34...41) (10 mmoli) a fost dizolvat în THF proaspăt distilat (15 ml) și s-a adăugat izocianatul corespunzător (13 mmoli). Amestecul a fost refluxat sub atmosferă de argon, timp de 18 h. Apoi s-a îndepărtat solventul sub vid, iar reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (cu EtOAc-eter de petrol 4-6), pentru obținerea compușilor doriți, 42...57.



Schema VIII. Procedee generale pentru prepararea 5-[(fenil substi-tuit) amino] carbonil]amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinelor (compușii 42...57)

Respectând acest procedeu general, au fost preparați următorii compuși:

5-[[[(3-clorfenil)amino]carbonil]amino-8-metil-2-(2-fuhl)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (42), randament 98%; solid galben pal, punct de topire 142...145°C (Et₂-eter de petrol); IR (KBr):3210-2930, 1660, 1630, 1610, 1500 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 4,21 (s, 3H); 6,60(m, 1H); 7,11 (d, 1H, J = 8); 7,13-7,28 (m, 2H); 7,55 (d, 1H, J = 8); 7,65 (s, 1H); 7,78 (d, 1H, J = 2); 8,22 (s, 1H); 8,61 (bs, 1H); 11,24 (bs, 1H).

5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (43), randament 99%; solid galben, punct de topire 193...195°C (Et₂ O-eter de petrol); IR (KBr):3200-2900, 1664, 1625, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 3,81 (s, 3H); 4,20(s, 3H); 6,61 (m, 1H); 6,85 (d, 2H, J = 9); 7,26 (m, 1H); 7,55 (d, 2H, J = 9); 7,65 (s, 1H); 8,21 (s, 1H); 8,59 (bs, 1H); 10,96 (bs, 1H).

5-[[[(3-clorfenil)amino]carbonil]amino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (44), randament 98%; solid galben pal, punct de topire 204...205°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3220-2930, 1660, 1620, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 1,71 (t, 3H, J = 7); 4,50 (q, 2H, J = 7); 6,67 (m, 1H); 7,20 (d, 1H, J = 8); 7,31 (m, 1H); 7,61 (d, 1H, J = 8);-7,70 (s, 1H); 7,84 (s, 1H); 8,30 (s, 1H); 8,67 (bs, 1H); 11,30 (bs, 1H).

5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-etil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (45), randament 99%; solid galben pal, punct de topire 200...201°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3250-2950, 1665, 1620, 1610, 1520 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 1,71 (t, 3H, J = 7); 3,85 (s, 3H); 4,49 (s, 3H); 6,65 (m, 1H); 6,88 (d, 2H, J = 9);7,26(m, 1H); 7,58 (d, 2H, J = 9); 7,69 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,63 (bs, 1H);10,99 (bs, 1H).

5-[[[(3-clorfenil)amino]carbonil]amino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (46), randament 95%; solid alb, punct de topire 138...139°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3210-2920, 1655, 1615, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 1,71 (t, 3H, J = 7); 2,04 (m, 2H); 4,36 (q, 2H, J = 7); 6,62 (m, 1H); 7,12 (d, 1H, J = 8);7,27(m, 1H); 7,56 (d, 1H, J = 8); 7,66 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,24 (s, 1H);8,62 (bs, 1H); 11,08 (bs, 1H).

5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-propil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (47), randament 98%; solid galben pal, punct de topire 146...148°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3230-2950, 1660, 1620, 1600, 1530 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 0,98 (t, 3H, J = 7); 2,04-2,08 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,35 (t, 2H, J = 7); 6,61 (m, 1H); 6,89 (d, 2H, J = 9); 7,25 (m, 1H); 7,56 (d, 2H, J = 9); 7,65 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,59 (bs, 1H); 10,95 (bs, 1H).

RO 121030 B1

- 1 5-[[[(3-clorfenil)amino]carbonil]amino-8-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-
3 triazolo[1,5-c]pirimidină (48), randament 97%; solid alb, punct de topire 210...212°C (Et₂O-
eter de petrol); IR (KBr):3240-2970, 1650, 1610, 1510 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 1,00 (t, 3H, J
5 = 7); 1,39-1,41 (m, 2H); 1,99-2,03 (m, 2H); 4,41 (q, 2H, J = 7); 6,63 (m, 1H); 7,14 (d, 1H, J
7 = 8); 7,29 (m, 1H); 7,56 (d, 1H, J = 8); 7,67 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,63 (bs, 1H);
11,26 (bs, 1H).
- 7 5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-
9 triazolo[1,5-c]pirimidină (49), randament 96%; solid alb, punct de topire 197...198°C (Et₂O-
eter de petrol); IR (KBr):3250-2960, 1665, 1610, 1600, 1520 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 0,98
11 (t, 3H, J = 7); 1,38-1,42 (m, 2H); 2,02-2,05 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,39 (t, 2H, J = 7); 6,63 (m,
1H); 6,92 (d, 2H, J = 9); 7,25 (m, 1H); 7,57 (d, 2H, J = 9); 7,67 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,60 (bs,
1H); 10,95 (bs, 1H).
- 13 5-[[[(3-clorfenil)amino]carbonil]amino-8-izopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-
15 triazolo[1,5-c]pirimidină (50), randament 97%; solid galben pal, punct de topire 199...200°C
(Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3230-2950, 1655, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 1,01
17 (d, 6H, J = 7,5); 1,49-1,51 (m, 1H); 1,88-2,03 (m, 2H); 4,42 (t, 2H, J = 7); 6,62 (m, 1H); 7,13
(d, 1H, J = 8); 7,34 (m, 1H); 7,57 (d, 1H, J = 8); 7,67 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,24 (s, 1H); 8,63
(bs, 1H); 11,25 (bs, 1H).
- 19 5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-isopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-
21 triazolo[1,5-c]pirimidină (51), randament 98%; solid alb, punct de topire 192...193°C (Et₂O-
eter de petrol); IR (KBr): 3230-2970, 1660, 1615, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 0,99
23 (d, 6H, J = 7,5); 1,58-1,22 (m, 1H); 1,87-1,97 (m, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,40 (t, 2H, J = 7); 6,62
(m, 1H); 6,91 (d, 2H, J = 9); 7,23 (m, 1H); 7,58 (d, 2H, J = 9); 7,66 (s, 1H); 8,23 (s, 1H); 8,59
(bs, 1H); 10,94 (bs, 1H).
- 25 5-[[[(3-clorfenil)amino]carbonil]amino-8-(2-izopentenil)-2-(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-
27 triazolo[1,5-c]pirimidină (52), randament 99%; solid alb, punct de topire 204...205°C (Et₂O-
eter de petrol); IR (KBr):3245-2960, 1650, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 1,84 (s, 3H);
29 1,88(s, 3H); 5,01 (d, 2H, J = 8); 5,57 (m, 1H); 6,62 (m, 1H); 7,12 (d, 1H, J = 8); 7,29(m, 1H);
7,56 (d, 1H, J = 8); 7,66 (s, 1H); 7,80 (s, 1H); 8,26 (s, 1H); 8,60 (bs, 1H); 11,26 (bs, 1H).
- 31 5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-(2-izopentenil)-2-(2-furil)-pirazolo-[4,3-
e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (53), randament 96%; solid galben pal, punct de topire
198...199°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3235-2950, 1665, 1620, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H
33 RMN (CDCl₃); δ: 1,83 (s, 3H); 1,87 (s, 3H); 3,81 (s, 3H); 4,97 (d, 2H, J = 7); 5,57 (m, 1H);
6,61 (m, 1H); 6,93 (d, 2H, J = 9); 7,24 (m, 1H); 7,54 (d, 2H, J = 9); 7,66 (s, 1H); 8,25 (s, 1H);
35 8,58 (bs, 1H); 10,96 (bs, 1H).
- 37 5-[[[(3-clorfenil)amino]carbonil]amino-8-(2-feniletıl)-2-(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-
triazolo[1,5-c]pirimidină (54), randament 98%; solid alb, punct de topire 186...187°C (Et₂O-
eter de petrol); IR (KBr): 3250-2970, 1660, 1610, 1515 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 3,33 (t, 2H,
39 J = 7); 4,62 (t, 2H, J = 7); 6,60 (m, 1H); 7,19-7,35 (m, 7H); 7,57 (d, 1H, J = 8); 7,61 (s, 1H);
7,81 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 8,63 (bs, 1H); 11,27 (bs, 1H).
- 41 5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-(2-feniletıl)-2-(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-
triazolo[1,5-c]pirimidină (55), randament 99%; solid alb, punct de topire 180...181 °C (Et₂O-
eter de petrol); IR (KBr): 3245-2960, 1660, 1615, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 3,42
43 (t, 2H, J = 7); 3,82 (s, 3H); 4,60 (t, 2H, J = 7); 6,60 (m, 1H); 6,93 (d, 2H, J = 9); 7,09 (m, 2H);
45 7,20-7,28 (m, 4H); 7,56 (d, 2H, J = 8); 7,60 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 8,59 (bs, 1H); 10,96 (bs,
1H).

RO 121030 B1

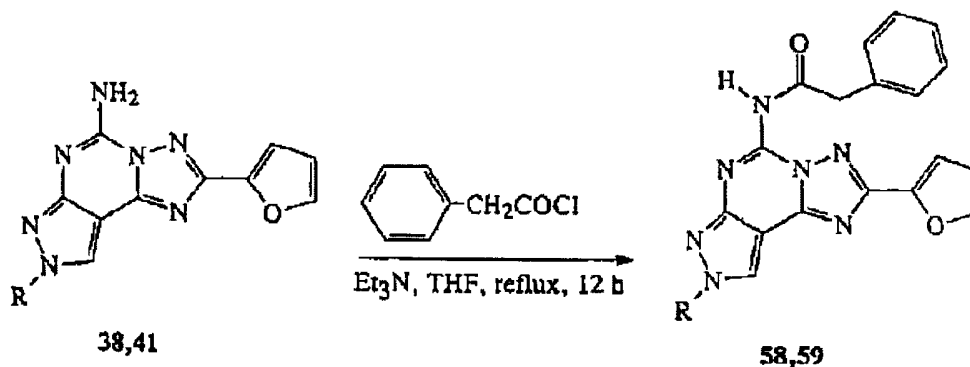
5-[[[(3-clorfenil)amino]carbonil]amino-8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (56), randament 99%; solid galben pal, punct de topire 183...184°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3245-2960, 1665, 1610, 1515 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 2,46 (m, 2H); 2,73 (t, 2H, J = 7); 4,43 (t, 2H, J = 7); 6,66 (m, 1H); 7,19-7,40 (m, 8H); 7,59 (d, 1H, J = 8); 7,64 (s, 1H); 7,85 (m, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,67 (bs, 1H); 11,30(bs, 1H).

5-[[[(4-metoxifenil)amino]carbonil]amino-8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (57), randament 98%; solid alb, punct de topire 174...175°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3240-2950, 1665, 1615, 1600, 1510 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 2,46 (m, 2H); 2,73 (t, 2H, J = 7); 4,42 (t, 2H, J = 7); 6,67 (m, 1H); 6,96 (d, 2H, J = 9); 7,22-7,41 (m, 6H); 7,60 (d, 2H, J = 8); 7,64 (s, 1H); 8,25 (s, 1H); 8,65 (bs, 1H); 11,16 (bs, 1H).

Exemplul 4. Prepararea 5-[(benzil)carbonil]amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinei (compușii 58...59)

5-[[benzil)carbonil]amino-8-(Ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinele pot fi preparate în conformitate cu strategia de sinteză, prezentată în următoarea schemă IX.

Pentru prepararea compușilor 58...59, compusul amino corespunzător (38 sau 41) (10 mmoli) a fost dizolvat în THF proaspăt distilat (15 ml) și s-au adăugat hidracidul corespunzător (13 mmoli) și trietilamină (13 mmoli). Amestecul a fost refluxat în atmosferă de argon, timp de 18 h. Apoi, solventul a fost îndepărtat sub vid, iar reziduul a fost dizolvat în EtOAc (30 ml) și spălat de 2 ori cu apă (15 ml). Faza organică a fost uscată pe Na₂SO₄ și concentrată sub vid. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (în EtOAc-eter de petrol 4:6), pentru obținerea compușilor doriți, 48, 58.



Schema IX. Procedee generale pentru prepararea 5-[(benzil)carbonil]amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinei (58-59)

Urmând acest procedeu general, au fost preparați următorii compuși:

5-[(benzil)carbonil]amino-8-isopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (58), randament 85%; solid galben pal, punct de topire 144...145°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3255-2930, 1673, 1620, 1610, 1520 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 0,98 (d, 6H, J = 7,5); 1,60 (m, 1H); 1,91 (m, 1H); 4,40 (t, 2H, J = 7); 4,53 (s, 2H); 6,60 (m, 1H); 7,18 (m, 1H); 7,26-7,39 (m, 5H); 7,64 (s, 1H); 8,22 (s, 1H); 9,11 (bs, 1H).

5-[(benzil)carbonil]amino-8-(3-fenilpropil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină (59), randament 95%; solid galben pal, punct de topire 116...117°C (Et₂O-eter de petrol); IR (KBr): 3250-2900, 1675, 1625, 1600, 1500 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃); δ: 2,39 (m, 2H); 2,67 (t, 2H, J = 7); 4,37 (t, 2H, J = 7); 4,53 (s, 2H); 6,61 (m, 1H); 7,16-7,43 (m, 11H); 7,65 (s, 1H); 7,64 (s, 1H); 8,19 (s, 1H); 9,12 (bs, 1H).

Exemplul 5. Prepararea 1-substituit-4-ciano-5-aminopirazolilor

Conform procedeele descrise în *J. Org. Chem.* 1956, 21, 1240; *J. Am. Chem. Soc.* 1956, 78, 784 și a referințelor citate aici, următorii compuși sunt preparați plecând de la etoximetilen malonodinitrilul disponibil comercial și de la N¹-substituit-hidrazine, care sunt, de asemenea, disponibile comercial:

- 1-metil-4-ciano-5-aminopirazol;
- 1-*n*-butil-4-ciano-5-aminopirazol;
- 1-izopentil-4-ciano-5-aminopirazol;
- 1-(2-ciclopentil)etil-4-ciano-5-aminopirazol;
- 1-hidroxietil-4-ciano-5-aminopirazol;
- 1-fenil-4-ciano-5-aminopirazol;
- 1-terț-butil-4-ciano-5-aminopirazol;
- 1-feniletil-4-ciano-5-aminopirazol;
- 1-(2-clorfenil)-4-ciano-5-aminopirazol.

Acești compuși pot fi utilizați ca intermediari pentru prepararea compușilor pirazolo-triazolo-pirimidinici, așa cum s-a descris aici.

Exemplul 6. Prepararea 1-substituit-4-ciano-3-aminopirazolilor

Plecând de la 4-ciano-5-aminopirazol, preparat conform procedurii raportat în *Chem. Pharm. Bull.* 1970, 18, 2353 sau în *J. Heterocyclic Chem.* 1979, 16, 1113, 1-substituit-4-ciano-3-aminopirazolii pot fi preparați prin alchilarea directă cu alchil halogenura corespunzătoare în dimetil formamidă la 80°C, timp de 1...2 h, în prezență de carbonat de potasiu anhidru. Din amestecul de reacție conținând cei doi izomeri alchilați în pozițiile N1 și N2, în raport de aproximativ 1:2, izomerul N2 poate fi izolat printr-o singură cristalizare sau cromatografie pe coloană cu silicagel și eluție cu amestecuri de acetat de etil și eter de petrol. Utilizând aceste procedee, au fost preparați următorii compuși:

- 1-metil-4-ciano-3-aminopirazol;
- 1-butil-4-ciano-3-aminopirazol;
- 1-benzil-4-ciano-3-aminopirazol;
- 1-izopentil-4-ciano-3-aminopirazol;
- 1-feniletil-4-ciano-3-aminopirazol.

Acești compuși pot fi utilizați ca intermediari pentru prepararea compușilor pirazolo-triazolo-pirimidinici, așa cum s-a descris aici.

Exemplul 7. Prepararea feniletil-4-ciano-3-aminopirazolilor

a) Se adaugă o suspensie de carbonat de potasiu anhidru (30 mmoli) în DMF (50 ml) la 3-amino-4-ciano-pirazol (20 mmoli), încălzind până la o temperatură de 80°C, timp de 30 min. Suspensia este adăugată la bromură de fenetil (25 mmoli) și este încălzită la 80°C, timp de 2 h. După răcire la temperatura camerei, amestecul este evaporat la sec, sub vid, iar reziduul rezultat este reluat cu apă distilată (100 ml) și extras cu acetat de etil (3 x 50 ml). Extractele organice, reunite, sunt uscate pe sulfat de sodiu anhidru și evaporate la sec, sub vid. Reziduul rezultat constă dintr-un amestec 1:3 de 1-feniletil-4-ciano-5-aminopirazol (20%) și 1-feniletil-4-ciano-3-aminopirazol (60%), care poate fi utilizat ca în exemplul 9 sau cromatografiat pe coloană de silicagel și eluat cu un amestec de acetat de etil/hexan, pentru a da 1-feniletil-4-ciano-5-aminopirazol cu punct de topire 172...173°C; (20%); ¹H-RMN (DMSO-d₆): δ :3,04 (t, 2H); 4,12 (t, 2H); 5,85 (sb, 2H); 7,21-7,30 (m, 5H); 7,41 (s, 1H); 1-*p*-feniletil-4-ciano-3-aminopirazol cu punct de topire 98...100°C (60%); ¹H-RMN (CDCl₃): 3,07 (t, 2H); 4,10 (t, 2H); 4,23 (sb, 2H); 7,17 (s, 1H); 7,00-7,28 (m, 5H).

RO 121030 B1

b) O soluție de 1-*p*-feniletil-4-ciano-5-aminopirazol (20 mmoli) în trietilortoformiat (40 ml) a fost refluxată sub atmosferă de azot, timp de 8 h. Excesul de ortoformiat a fost evaporat la sec, sub vid, iar reziduul uleios galben a fost dizolvat în eter etilic și percolat pe silicagel, pentru a da iminoeterul corespunzător (cu randament 87%). Reziduul obținut după evaporarea ortoformiatului este practic pur și este utilizat direct în următoarea etapă. O soluție de iminoeter (20 mmoli) și de hidrazidă a acidului 2-furoic (2,5 g, 22 mmoli) în 2-metoxietanol (50 ml) a fost refluxată, timp de 5...10 h. După răcire, soluția este evaporată la sec, pentru a da un reziduu uleios, care este supus ciclizării termice în difenileter (50 ml), utilizând un aparat Dean-Stark, așa încât apa formată în timpul reacției să fie îndepărtată azeotropic. După 1,5 h, reacția este verificată prin CSS (cromatografie în strat subțire în acetat de etil: eter de petrol 2:1), iar apoi, compusul inițial este complet absent, amestecul este răcit și i se adaugă hexan. Precipitatul rezultat este filtrat și cristalizat, pentru a se obține 7-(β-feniletil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina cu punct de topire 174...175°C (20%); ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): 3,23 (t, 2H); 4,74 (t, 2H); 6,75 (s, 1H); 7,14-7,17 (m, 5H); 7,28 (s, 1H); 7,98 (s, 1H); 8,53 (s, 1H); 9,56 (s, 1H).

În mod similar, plecând de la 1-β-feniletil-4-ciano-3-aminopirazol, s-a preparat 8-(β-feniletil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina, cu punct de topire 268...270°C (60%); ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): 3,32 (t, 2H); 4,72 (t, 2H); 6,73 (s, 1H); 7,23 (m, 5H); 7,95 (s, 1H); 8,8 (s, 1H), 9,41 (s, 1H).

c) O suspensie de produs din etapa b) (10 mmoli) în HCl 10% (5,0 ml) este refluxată sub agitare, timp de 3 h. După răcire, soluția este alcalinizată cu hidroxid de amoniu concentrat la 0°C, iar precipitatul rezultat este filtrat sau extras cu acetat de etil (3 x 100 ml), uscat și evaporat la sec, sub vid, pentru a se obține 1-(β-feniletil)-4-[3(2-furil)-1,2,4-triazol-5-il]-5-aminopirazolul corespunzător, cu punct de topire 175...176°C; ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): 3,15 (t, 2H); 4,48 (t, 2H); 5,78 (s, 1H); 6,37 (s, 1H); 6,68 (s, 1H); 7,1 (s, 1H), 7,27-7,28 (m, 5H); 7,82 (s, 1H); 14,51 (sb, 2H); într-un mod similar, s-a obținut 1-(β-feniletil)-4-[3(2-furil)-1,2,4-triazol-5-il]-3-aminopirazolul, cu p.t. 205-206°C; ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): 3,12 (t, 2H); 4,46 (t, 2H); 5,75 (s, 1H); 14,41 (sb, 2H).

d) Se adaugă cianamidă (60 mmoli) la o suspensie de amină din etapa c) (10 mmoli) în N-metilpirolidonă (40 ml), urmată de acid *p*-toluensulfonic (15 mmoli). Amestecul este încălzit la 160°C, sub agitare. După 4 h, s-a adăugat o a doua porțiune de cianamidă (60 mmoli), iar încălzirea s-a continuat peste noapte. Apoi, amestecul este tratat cu apă fiartă (200 ml), iar precipitatul este filtrat, spălat cu apă și cristalizat din etanol, pentru a da 5-amino-7-(β-feniletil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina corespunzătoare, cu punct de topire 225...226°C. ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): 3,21 (t, 2H); 4,51 (t, 2H); 6,65 (s, 1H); 7,1-7,44 (m, 5H, atom și 1H); 7,78 (s, 1H); 7,89 (sb, 2H), 8,07 (s, 1H).

În mod similar, s-a obținut 5-amino-8-(β-feniletil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina, cu punct de topire 212...213°C. ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): 3,21 (t, 2H); 4,53 (t, 2H); 6,7 (s, 1H); 7,1-7,4 (m, 5H, atom și 1H); 7,65 (sb, 2H); 7,93 (s, 1H); 8,45 (s, 1H).

Exemplul 8. Prepararea 4-ciano-5-amino-1,2,3-triazolilor

O suspensie de carbonat de potasiu (0,23 moli) în DMSO (70 ml) s-a adăugat ulterior, împreună cu cianacetamidă (70 mmoli) și cu *p*-fluorbenzilazidă (54,5 mmoli). Soluția rezultată este agitată la temperatura camerei, timp de o oră, iar apoi turnată într-un volum mare de apă (1,5 l). Solidul separat este filtrat, spălat cu apă și uscat în cuptor la 70°C, pentru a da 1-(*p*-fluorbenzil)-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol (randament 961%). Punct de topire 198...199°C; ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): 7,5-7,1 (m, 6H); 6,4 (s, 2H); 5,4 (s, 2H). Se adaugă o suspensie amidică (0,005 moli), agitată și răcită la 0°C, în DMF (5 ml), împreună cu oxiclurură de fosfor (0,01 moli). Soluția rezultată este agitată, timp de 5 min, la 0°C, 10 min, la 25°C și

15 min, la 80°C. După răcire la temperatura camerei, se adaugă 5 ml de NHCl, iar amestecul este refluxat, timp de 5 min. Din soluția răcită, se separă 1-(*p*-fluorbenzil)-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazolul (cu un randament de 90%). Punct de topire 185...186°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 7,3-7,0 (m, 6H); 5,5 (s, 2H); IR (KBr): 3400, 3220, 2220, 1655 cm⁻¹.

În mod analog, au fost preparați următorii compuși:

1-sau 2-benzil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol;

1-sau 2-(*o*-fluorbenzil)-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol;

1-sau 2-(*p*-fluorbenzil)-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol;

1-sau 2-butil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol;

1-sau 2-izopentil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol;

1-sau 2-(2-metoxietil)-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol;

1-sau 2-heptil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol;

1-sau 2-octil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol.

Acești compuși pot fi utilizați drept intermediari pentru prepararea compușilor triazolo-triazolo-pirimidinici, așa cum s-a descris aici.

Exemplul 9. Prepararea heterociclorilor etoximetilenamino

Prepararea heterociclorilor etoximetilenamino cu formula IV este realizată prin refluxarea respectivului *orto*-aminonitril cu etil ortoformiat. Ca exemplu, este raportată prepararea 4-ciano-5-(etoximetilenamino)-1-butilpirazol. O soluție de 4-ciano-5-amino-1-butilpirazol (20 mmoli) în trietil ortoformiat (40 ml) este încălzită până la temperatura de reflux, sub atmosferă de azot, timp de 8 h. Excesul de ortoformiat este evaporat la sec, sub vid, iar uleiul rezidual galben este dizolvat în eter etilic și eluat pe silicagel, pentru obținerea compusului pur (cu randament de 87%). În multe cazuri, reziduul obținut după evaporarea ortoformiatului este substanțial pur și este utilizat ca în etapa ulterioară. IR (nujol): 3140, 2240, 1640 cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃): 8,4 (s, 1H); 7,9 (s, 1H); 4,5 (t, 2H); 4,3 (q, 2H); 1,8 (m, 2H); 1,5 (m, 2H); 1,4 (t, 3H); 0,9 (t, M).

Exemplul 10. Ciclizarea heterociclorilor etoximetilenamino

O soluție formată din heterociclorul etoximetilenamino (20 mmoli) și hidrazida acidului 2-furoic (2,5 g, 22 mmoli) în 2-metoxietanol (50 ml) este refluxată, timp de 5...10 h. După răcire, soluția este evaporată la sec, pentru obținerea unui ulei rezidual care este supus ciclizării termice în difenil eter (50 ml), utilizând un flacon cu fund rotund, montat la un aparat Dean-Stark, pentru îndepărtarea azeotropă a apei formate în timpul reacției. După ce se variază timpul de reacție (3 la 5 h), reacția este verificată prin CSS (în acetat de etil:eter de petrol 2:1), iar după dispariția completă a produsului inițial, amestecul este răcit și i se adaugă hexan. Precipitatul rezultat este filtrat și cristalizat din solventul corespunzător. În unele cazuri, din soluție se separă un ulei vâscos, care este apoi decantat și extras ulterior. Reziduul uleios este, apoi, cromatografiat pe silicagel, eluat cu amestecuri de acetat de etil/eter de petrol, pentru a da compusul traciciclic VI.

Cu titlu de exemple, sunt raportate caracteristicile analitice și spectroscopice ale câtorva compuși preparați prin aceste procedee:

7-butil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina. ¹H-RMN (DMSO-d₆): 9,6 (s, 1H); 8,6 (s, 1H); 8,0 (m, 1H); 7,4 (m, 1H); 6,7 (m, 1H); 4,5 (t, 2H); 1,9 (m, 2H); 1,3 (m, 2H); 0,9 (t, 3H).

8-butil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-*e*]1,2,4-triazolo[1,5-*c*]pirimidina.

¹H-RMN (DMSO-d₆): 9,4 (s, 1H); 8,9 (s, 1H); 8,0 (m, 1H); 7,3 (m, 1H); 6,2 (m, 1H); 4,5 (t, 2H); 1,9 (m, 2H); 1,0 (m, 2H); 0,9 (m, 3H). În spectrul 2D-RMN (NOESY), semnalul pentru N-CH₂, având rezonanță la 4,5, arată maxime care se întretaie cu semnalul pentru C9-H cu rezonanță la 8,9.

RO 121030 B1

7-izopentil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina.	1
¹ H-RMN (CDCl ₃): 9,1 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 7,7 (m, 1H); 7,3 (m, 1H); 6,6 (m, 1H); 4,6 (t, 2H); 1,18-1,7 (m, 3H); 1,0 (d, 6H).	3
8-izopentil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina.	5
¹ H-RMN (CDCl ₃): 9,1 (s, 1H); 8,8 (s, 1H); 7,7 (m, 1H); 7,3 (m, 1H); 6,6 (m, 1H); 4,6 (t, 2H); 1,9-1,5 (m, 3H); 1,0 (d, 6H).	5
Urmând acest procedeu, au fost preparați următorii compuși:	7
7-metil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
8-metil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	9
7-(2-clorfenil)-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
7-feniletil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	11
7-terț-butil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
7-(2-ciclopentil)etil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	13
8-benzil-2(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
7-benzil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	15
7-(2-fluorbenzil)-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
7-(4-fluorbenzil)-2(2-furil)-1,2,3-thazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	17
7-butil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina	
7-isopentil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	19
7-(2-metoxi)etil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
7-heptil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	21
7-octil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
8-benzil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	23
8-(2-fluorbenzil)-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
8-(4-fluorbenzil)-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	25
8-butil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
8-izopentil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	27
8-hexil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,6-o]pirimidina;	
8-heptil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	29
8-octil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
9-benzil-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	31
9-(2-fluorbenzil)-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina;	
9-(4-fluorbenzil)-2(2-furil)-1,2,3-triazolo-[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina.	33
Acești compuși pot fi utilizați ca intermediari pentru prepararea triazolo-triazolo-pirimidinelor și a pirazolo-triazolo-pirimidinelor, așa cum a fost descris aici.	35
Exemplul 11. Prepararea 5-amino-7-[aralchil]-2-(2-furil)-pirazol[4,3-e]-1,2,4-triazol[1,5-c]pirimidinelor	37
Unei suspensii de amină cu formula VII (10 mmoli) în N-metil-pirolidonă (40 ml), i se adaugă cianamidă (60 mmoli), urmată de acid <i>p</i> -toluensulfonic (15 mmoli). Amestecul este încălzit la 160°C, cu agitare magnetică. După 4 h, se adaugă o a doua porțiune de cianamidă (60 mmoli), iar încălzirea este continuată peste noapte. Amestecul este tratat apoi cu apă fierbinte (100 ml), iar precipitatul solid este filtrat, spălat cu apă și cristalizat din etanol. Dacă nu are loc precipitarea, soluția este extrasă cu acetat de etil (4 x 100 ml), extractele sunt spălate cu saramură (2 x 50 ml), uscate și evaporate la sec, sub vid. Apoi, reziduul este cromatografiat pe o coloană de silicagel, eluată cu acetat de etil.	39
În continuare, sunt raportate datele analitice și spectroscopice ale câtorva compuși preparați prin acest procedeu:	41
5-amino-7-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină.	43
	45
	47

RO 121030 B1

- 1 Punct de topire 157...158°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,1 (s, 1H); 8,0 (s, 2H); 7,9 (m, 1H); 7,2 (m, 1H); 6,7 (m, 1H); 4,2 (t, 2H); 1,9 (m, 2H); 1,5 (m, 2H); 0,9 (t, 3H).
- 3 5-amino-8-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină.
Punct de topire 183...185°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,6 (s, 1H); 8,0 (s, 1H); 7,6 (s, 2H); 7,2 (m, 1H); 6,7 (m, 1H); 4,2 (t, 2H); 1,8 (m, 2H); 1,2 (m, 2H); 0,9 (t, 3H).
- 5 5-amino-7-benzil-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină.
Punct de topire 295...297°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,5 (s, 2H); 8,0 (s, 1H); 7,3 (m, 6H); 6,7 (m, 1H); 5,7 (s, 2H).
- 9 5-amino-7-o-fluor-benzil-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină.
Punct de topire 310...312°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,5 (s, 2H); 8,0 (s, 1H); 7,3 (m, 5H); 6,8 (s, 1H); 5,75 (s, 2H).
- 11 5-amino-7-metil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină.
Punct de topire 210...213°C.
- 13 5-amino-7-terț-butil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină. Punct de
15 topire 238...240°C.
- 17 5-amino-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină. Punct de topire
248...250°C.
- 19 5-amino-7-(2-hidroxietyl)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină. Punct
de topire 258...260°C.
- 21 5-amino-7-fenil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină. Punct de
topire 295...297°C.
- 23 5-amino-7-izopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină. Punct de
topire 208...210°C.
- 25 5-amino-8-izopentil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină. Punct de
topire 200...203°C.
- 27 5-amino-7-fenetil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină. Punct de
topire 225°C.
- 29 5-amino-7-benziloxietil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidină.
5-amino-7-[p-(4-izobutilfenetil)]-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-
c]pirimidină. Punct de topire 207...210°C.
- 31 Acești compuși pot să reacționeze cu un acid corespunzător sau cu un derivat al
acidului sulfonic, pentru a se ajunge la compușii cu formula I din această invenție.
- 33 **Exemplul 12. Prepararea 4-substituit-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazolilor**
p-fluorbenzilazida (15,1 g, 0,1 moli) și cianacetamida (10,8 g, 0,13 moli) sunt adău-
35 gate, în această ordine, la o suspensie sub formă de pulbere, de carbonat de potasiu (57,5 g,
0,42 moli) în dimetilsulfoxid (150 ml). Amestecul este agitat la temperatura camerei, timp de
37 o oră. Amestecul este turnat în 3 l de apă, iar solidul care se separă este filtrat și spălat
riguros cu apă, pentru a da 22,47 g (96%) de 1-p-fluorbenzil-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-
39 triazol. Punct de topire 198...199°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 7,5-7,1 (m, 6H); 6,4 (s, 2H); 5,4 (s, 2H).
- 41 În mod analog, se obțin și următorii compuși:
- 43 2-fluor-6-clorbenzil-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol. Punct de topire
230...231°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 5,40 (s, 2H); 6,52 (sb, 2H); 7,12-7,45 (m, 5H).
- 45 3-fluorbenzil-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol. Punct de topire 211...211°C; ¹H-
RMN (DMSO-d₆): 5,46 (s, 2H); 6,47 (sb, 2H); 7,00-7,52 (m, 6H).
- 47 2-fluorbenzil-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol. Punct de topire 195...197°C.
1-(β-feniletil)-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol. Punct de topire 181...183°C; ¹H-
RMN (DMSO-d₆): 3,04 (t, 2H); 4,35 (t, 2H); 6,30 (sb, 2H); 7,20-7,47 (m, 7H).

RO 121030 B1

Exemplul 13. Prepararea 4-substituit-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazolilor	1
O suspensie de 1- <i>p</i> -fluorbenzil-4-carboxamido-5-amino-1,2,3-triazol (23,4 g, 0,1 moli) în DMF (100 ml), agitată magnetic la 0°C, este amestecată cu 20,8 ml (0,2 moli) de POCl ₃ . Soluția este agitată, timp de 5 h, la 0°C, 10 h, la temperatura camerei și, în final, 15 h, la 80°C. După răcire, la aceasta se adaugă HCl 1N (100 ml), iar soluția rezultată este refluxată, timp de 5 h; după răcire, precipită 1,5 <i>p</i> -fluorbenzil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol (18,54 g, 90%). Punct de topire 185...186°C; ¹ H-RMN (DMSO-d ₆): 7,3-7,0 (m, 6H); 5,5 (s, 2H); IR (KBr): 3400, 3220, 2220, 1655 cm ⁻¹ .	3
În mod analog, s-au obținut următorii compuși:	5
2-fluor-6-clorbenzil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol; punct de topire 181...185°C; ¹ H-RMN (DMSO-d ₆): 5,40 (s, 2H); 7,26-7,50 (m, 5H).	7
3-fluorbenzil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol; punct de topire 195...197°C; ¹ H-RMN (DMSO-d ₆): 5,44 (s, 2H); 7,00-7,43 (m, 6H).	9
2-fluorbenzil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol; punct de topire 195...197°C.	11
1-(<i>p</i> -feniletil)-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol; punct de topire 149...150°C; ¹ H-RMN (DMSO-d ₆): 3,04 (t, 2H); 4,36 (t, 2H); 7,03 (sb, 2H); 7,23-7,28 (m, 5H).	13
Exemplul 14. Prepararea 4-substituit [3(2-furil)-1,2,4-triazol-5-il]-5-amino-1,2,3-triazolilor	15
O suspensie de 1- <i>p</i> -fluorbenzil-4-ciano-5-amino-1,2,3-triazol (20 mmoli) și hidrazida acidului 2-furoic (22 mmoli) în difenileter (30 ml) este agitată și încălzită la reflux (260°C), cu un aparat Dean-Stark, până la dispariția compusului inițial (CSS, 1...2 h). După răcire, amestecul este diluat cu eter de petrol, iar precipitatul rezultat este, fie filtrat, fie separat prin decantare și cromatografiat pe o coloană de silicagel, eluată cu acetat : eter de petrol 2:1.	17
1- <i>p</i> -fluorbenzil-4[3(2-furil)-1,2,4-triazol-5-il]-5-amino-1,2,3-triazol; punct de topire 266...268°C; ¹ H-RMN (DMSO-d ₆): 14,5 (s, 1H); 7,8 (s, 1H); 7,4-7,1 (m, 5H); 6,6 (s, 1H); 6,5(s,2H); 5,5(s,2H).	19
În mod analog, au fost obținuți următorii compuși: 1-(β-feniletil)-4[3(2-furil)-1,2,4-triazol-5-il]-5-amino-1,2,3-triazol (50%); P.t. 200-202°C; ¹ H-RMN (DMSO-d ₆): 3,07 (t, 2H); 4,16 (t, 2H); 5,50 (sb, 2H); 6,61 (s, 1H); 6,95 (s, 1H); 7,2-7,4 (m, 5H); 7,78 (s, 1H); 13,8 (sb, 1H).	21
Exemplul 15: Prepararea 5-amino-7-substituit-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-<i>e</i>]1,2,4-triazolo[1,5-<i>c</i>]pirimidinelor	23
O suspensie de 1- <i>p</i> -fluorbenzil-4[3(2-furil)-1,2,4-triazol-5-il]-5-amino-1,2,3-triazol (0,325 g, 1 mmol) în N-metil-pirolidonă (4 ml) este amestecată împreună cu cianamidă (6 mmoli), urmată de acid <i>p</i> -toluensulfonic (1,5 mmoli). Amestecul este încălzit la 160°C, cu agitare magnetică. După 4 h, se adaugă o a doua porțiune de cianamidă (6 mmoli), iar încălzirea este continuată peste noapte. Amestecul este tratat apoi cu apă fierbinte (20 ml), iar precipitatul solid este filtrat, spălat cu apă și cristalizat din etanol. Dacă precipitarea nu are loc, soluția este extrasă cu acetat de etil (4x10 ml), extractele sunt spălate cu saramură (2x5 ml), uscate și evaporate la sec, sub vid. Apoi, reziduul este cromatografiat pe o coloană de silicagel, eluat cu acetat de etil, pentru a da 105 mg (randament 30%) de 5-amino-7- <i>p</i> -fluor-benzil-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4- <i>e</i>]1,2,4-triazolo[1,5- <i>c</i>]pirimidina cu punct de topire 266...268°C; ¹ H-RMN (DMSO-d ₆): 8,5 (sb, 2H); 7,95 (s, 1H); 7,4-7,1 (m, 6H); 6,7 (s, 1H); 5,7 (s, 2H).	25
În mod analog, au fost obținuți:	27
5-amino-7- <i>o</i> -fluorbenzil-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4- <i>e</i>]1,2,4-triazolo[1,5- <i>c</i>]pirimidina; punct de topire 310°C.	29
5-amino-7-benzil-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4- <i>e</i>]1,2,4-triazolo[1,5- <i>c</i>]pirimidina; punct de topire 295...297°C.	31

RO 121030 B1

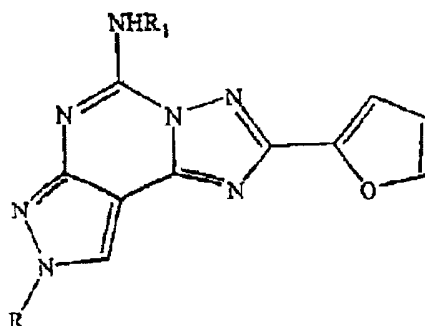
5-amino-7-(2-fluor-6-clorbenzil)-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina cu punct de topire 218...220°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,51 (sb¹, 2H); 7,98 (s, 1H); 7,55-7,28 (m, 4H); 6,77 (m, 1H); 5,73 (s, 2H).

5-amino-7-(*m*-fluorbenzil)-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina cu punct de topire 280...283°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,45 (bs, 2H); 7,98 (s, 1H); 7,4-7,1 (m, 5H); 6,76 (s, 1H); 5,75 (s, 2H).

5-amino-7-(β-feniletil)-2-(2-furil)-1,2,3-triazolo[5,4-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina cu punct de topire 269...271 °C; ¹H-RMN (DMSO-d₆): 8,4 (sb, 2H); 7,98 (s, 1H); 7,3-7,15 (m, 6H); 6,8 (s, 1H); 4,71 (t, 2H); 3,31 (t, 2H).

Exemplul 16. Alți compuși

Utilizând chimismul descris mai sus, au fost preparați următorii compuși suplimentari:



Compus nr.	R	R ¹
60	H	H
61	H	4-MeO-Ph-NHCO
62	H	3-Cl-Ph-NHCO
63	<i>t</i> -C ₄ H ₉	H
64	<i>t</i> -C ₄ H ₉	4-MeO-Ph-NHCO
65	<i>t</i> -C ₄ H ₉	3-Cl-Ph-NHCO
66	CH ₃	Ph-NHCO
67	CH ₃	4-SO ₃ H-Ph-NHCO
68	CH ₃	3,4-C ₂ -Ph-NHCO
69	CH ₃	3,4-(OCH ₂ -O)-Ph-NHCO
70	CH ₃	4-(NO ₂)-Ph-NHCO
71	CH ₃	4-(CH ₃)-Ph-NHCO
72	CH ₃	Ph-(CH ₂)-CO
73	C ₂ H ₅	Ph-NHCO
74	C ₂ H ₅	4-SO ₃ H-Ph-NHCO
75	C ₂ H ₅	3,4-Cl ₂ -Ph-NHCO

RO 121030 B1

Tabel (continuare)

Compus nr.	R	R ¹	
76	C ₂ H ₅	3,4-(OCH ₂ -O)-Ph-NHCO	3
77	C ₂ H ₅	4-(NO ₂)-Ph-NHCO	
78	C ₂ H ₅	4-(CH ₃)-Ph-NHCO	5
79	C ₂ H ₅	Ph-(CH ₂)-CO	
80	n-C ₃ H ₇	Ph-NHCO	7
81	n-C ₃ H ₇	4-SO ₃ H-Ph-NHCO	
82	n-C ₃ H ₇	3,4-Cl ₂ -Ph-NHCO	9
83	n-C ₃ H ₇	3,4-(OCH ₂ -O)-Ph-NHCO	
84	n-C ₃ H ₇	4-(NO ₂)-Ph-NHCO	11
85	n-C ₃ H ₇	4-(CH ₃)-Ph-NHCO	
86	n-C ₃ H ₇	Ph-(CH ₂)-CO	13
87	n-C ₄ H ₉	Ph-NHCO	
88	n-C ₄ H ₉	4-SO ₃ H-Ph-NHCO	15
89	n-C ₄ H ₉	3,4-Cl ₂ -Ph-NHCO	
90	n-C ₄ H ₉	3,4-(OCH ₂ -O)-Ph-NHCO	17
91	n-C ₄ H ₉	4-(NO ₂)-Ph-NHCO	
92	n-C ₄ H ₉	4-(CH ₃)-Ph-NHCO	19
93	2-(α-naftil)etil	Ph-(CH ₂)-CO	
94	2-(α-naftil)etil	H	21
95	2-(α-naftil)etil	4-MeO-Ph-NHCO	
96	2-(α-naftil)etil	3-Cl-Ph-NHCO	23
97	2-(2,4,5-tribrom-fenil)etil	H	
98	2-(2,4,5-tribrom-fenil)etil	4-MeO-Ph-NHCO	25
99	2-(2,4,5-tribrom-fenil)etil	3-Cl-Ph-NHCO	
100	2-propen-1-il	4-MeO-Ph-NHCO	27

Exemplul 17. Evaluarea activității biologice a compușilor

Câțiva dintre compușii descriși mai sus au fost testați din punct de vedere al afinității lor pentru receptorii A₁ și A_{2A} de șobolan și A₃ umani, utilizând următoarele teste.

Testul de legare la receptorii adenosinici A₁ și A_{2A} de la șobolan

Șobolani Wistar masculi (200...250 g) au fost decapitați, iar creierul întreg și striatul au fost disecați pe gheață. Țesuturile au fost dezintegrate într-un omogenizator Polytron, la poziția 5, timp de 30 s, în 25 de volume de tampon Tris-HCl 50 mM, pH=7,4, conținând

RO 121030 B1

10 mM de $MgCl_2$. Omogenizatul a fost centrifugat la 48.000 g, timp de 10 min, iar depozitul a fost resuspendat în același tampon, conținând 2 UI/ml adenzin deaminază. După 30 min de incubare la 37°C, membranele au fost centrifugate, iar depozitele păstrate la -80°C. Anterior înghețării, a fost prelevată o parte alicotă din omogenizat, pentru determinarea proteinei, utilizând albumină bovină drept standard de referință. Testele de legare au fost efectuate pe membrane de creier și, respectiv, de mușchi striat de șobolan, în prezență de 10 mM de $MgCl_2$, la 25°C. Toate soluțiile tampon au fost ajustate pentru menținerea unui pH constant de 7,4.

Experimentele de dezlocuire au fost efectuate în 500 μ L de tampon Tris-HCl, conținând 1 nM din ligandul selectiv al receptorului A_1 adenzinic- $[^3H]$ -CHA (N^6 -ciclohexiladenozină) și membrane ale creierului de șobolan (150...200 μ g de proteină/test).

Experimentele de dezlocuire au fost efectuate în 500 μ L de tampon Tris-HCl, conținând 10 mM de $MgCl_2$, 0,2 nM din ligandul selectiv al receptorului A_2 adenzinic- $[^3H]$ SCH58261 (5-amino-7-(2-feniletil)-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]-1,2,4-tiazolo[1,5-c]pirimidină) și membrane de mușchi striat de șobolan (80...100 ng de proteină/test). Pentru determinarea valorilor IC_{50} (unde IC_{50} este concentrația de inhibitor care dezlocuiește 50% din ligandul marcat), compusul de testat a fost adăugat în triplicat la probele testului de legare, într-un număr de minimum 6 concentrații diferite. Separarea radioligandului legat de cel liber poate fi realizată prin filtrarea rapidă pe filtre Whatman GF/B, care au fost spălate de 3 ori cu tamponul răcit pe gheață. Radioactivitatea legată pe filtru a fost măsurată prin spectrometrie de scintilație, după adăugarea de 5 ml de Aquasure. Legarea nespecifică a fost definită ca legarea în prezența a 10 μ M R-PIA (N^6 -fenilisopropiladenozină) și, respectiv, a 10 μ M NECA (5'-(N-etilcarboxamido)adenozină) și a fost întotdeauna 10% din legarea totală. Timpul de incubare a fost cuprins în domeniul 150 min, la 0°C, până la 75 min, la 30°C, în conformitate cu rezultatele experimentelor anterioare în funcție de timp. Valorile K_i au fost calculate din ecuația lui Cheng & Prusoff. Toate datele de legare au fost analizate cu ajutorul programului LIGAND pe calculator, utilizând curbele de regresie neliniară.

Testele de legare la receptorul adenzinic A_3 (extras) din clone umane

O probă alicot din preparatul membranar (8 mg proteină/ml) al celulelor HEK-293 transfectate cu receptorul adenzinic A_3 uman recombinant a fost utilizat pentru testele de legare. Fig. 1 arată o saturare tipică a celulelor HEK-293 în $[^{125}I]$ AB-MECA (N^6 -(4-amino-3-iodbenzil)-5'-(N-metilcarbamoil)adenozină). Experimentele de inhibiție au fost realizate în duplicat, într-un volum final de 100 μ L, în tuburi de testare conținând 0,3 nM de $[^{125}I]$ AB-MECA, 50 nM tampon Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH=7,4, 20 μ L membrane diluate (12,4 mg proteină/ml) și cel puțin 6...8 concentrații diferite din antagoniștii tipici ai receptorului pentru adenzină. Legarea nespecifică a fost definită în prezența a 50 nM de R-PIA și a fost de aproximativ 30% din legarea totală. Timpul de incubare a fost de 60 min, la 37°C, în conformitate cu rezultatele experimentelor anterioare în funcție de timp. Radioactivitatea legată și cea liberă au fost separate prin filtrarea amestecului test pe filtre din fibră de sticlă Whatman GF/B, utilizând un recoltator de celule Brandel.

Rezultate și discuții

Compușii 34...59 au fost testați cu ajutorul testelor de legare a ligandului, în legătură cu afinitatea lor pentru receptorii A_1 și A_{2A} din creier de șobolan și pentru receptorul A_3 uman, iar rezultatele sunt redată în tabelul 1.

RO 121030 B1

Datele demonstrează că compușii lipsiți de grupări voluminoase (compușii 38, 40 și 41) în poziția N⁵ prezintă afinitate mare pentru receptorii adenzinici A_{2A}, cu selectivitate redusă față de A₁ și cu afinitate scăzută la subtipul A₃ al receptorului adenzinic uman și că compușii cu o catenă fenil carbamoil substituită în poziția N⁵ posedă afinitate pentru subtipul A₃ al receptorului adenzinic uman de ordinul nanomolar, cu diferite grade de selectivitate față de subtipurile A₁ și A_{2A} ale receptorului adenzinic. În particular, partea 4-metoxifenil-carbamoil (compușii 51, 55 și 57) conferă afinitate mai mare, cu aproximativ 3 ordine de magnitudine față de partea 3-clorfenilcarbamoil (compușii 50, 54 și 56).

Introducerea în poziția N⁸, de catene cu caracteristici sterice diferite, permite proiectarea de derivați cu putere mare asupra receptorului adenzinic A₃ și cu o selectivitate mai bună față de subtipurile A₁ și A_{2A} ale receptorului.

Fig. 1 reprezintă o curbă de saturare în [¹²⁵I]AB-MECA a receptorului A₃ adenzinic, iar liniaritatea diagramei Scatchard din anexă este indicatorul, în condițiile noastre experimentale, al prezenței unei singure clase de situsuri de legare cu valoarea K_d de 0,9 ± 0,01 nM și cu valoarea B_{max} de 62 ± 1 fmol/mg proteină (n = 3).

RO 121030 B1

Tabelul 1

Afinitatea de legare la receptorii adenozinici rA_1 , rA_{2A} și hA_3 a compușilor 35, 36, 38, 40, 41, 44-47, 50, 51 și 54-57

Compus	R	R ¹	rA_1 (K_i , nM)	rA_{2A} (K_i , nM)	hA_3 (K_i , nM)	rA_1/hA_3	rA_{2A}/hA_3
	MRS 1220*		305 ± 51	52 ± 8,8	0,65 ± 0,25	470	80
34	CH ₃	H	313 (286-342)	30,65 (28,62-32,82)	557 (4S9-636)	0,56	0,05
43	CH ₃	4-MeO-Ph-NHCO	<10,000	>10,000	0,10 (0,09-0,11)	>100,000	>100,000
42	CH ₃	3-Cl-Ph-NHCO	5,045 (4,566-5,579)	>10,000	0,22 (0,20-0,25)	22,931	>45,454
35	CH ₃ CH ₂	H	95,09 (86,76-104,22)	11,15 (9,84-12,63)	3,579 (3,376-3,793)	0,03	0,003
45	CH ₃ CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	>10,000	>10,000	0,28 (0,25-0,32)	>35,714	>35,714
44	CH ₃ CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	2,699 (2,521-2,889)	2,799 (2,621-2,989)	2,09 (1,9-2,31)	1,291	1,339
36	CH ₃ CH ₂ CH ₂	H	139 (107-181)	20,23 (16,14-25,36)	613 (582-646)	0,22	0,03
47	CH ₃ CH ₂ -CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	>10,000	1,993 (1,658-2,397)	0,29 (0,27-0,32)	>34,482	6,872
46	CH ₃ CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	1,582 (1,447-1,730)	<10,000	0,49 (0,47-0,52)	3,228	>20,408
37	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -CH ₂	H	26,30 (23,66-29,24)	4,20 (3,84-4,58)	1,109 (981-1,254)	0,02	0,003
49	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	2,098 (1,923-2,290)	649 (563-747)	0,30 (0,26-0,34)	6,993	2,163
48	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	1,515 (1,382-1,661)	498 (414-599)	0,75 (0,65-0,86)	2,020	664
38	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -CH ₂ -	H	8,09 (7,46-8,78)	1,20 (1,03-1,40)	1,163 (1,024-1,320)	0,007	0,001
51	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -CH ₂ -	4-MeO-Ph-NHCO	476 (432-525)	376 (332-426)	29,57 (26,94-32,46)	16	13

RO 121030 B1

1

Tabelul 1 (continuare)

Compus	R	R'	rA ₁ (K _r , nM)	rA _{2A} (K _r , nM)	hA ₃ (K _r , nM)	rA ₁ /h A ₃	rA _{2A} /hA ₃
50	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -CH ₂ -	3-Cl-Ph-NHCO	1,650 (1,560-1,744)	1,197 (1,027-1,396)	81,10 (68,45-96,09)	20	15
58	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -CH ₂ -	Ph-CH ₂ CO	373 (330-422)	323 (280-372)	81,10 (68,45-96,09)	4,6	4
39	(CH ₃) ₂ C=CH-CH ₂ -	H	10,08 (8,63-11,76)	1,45 (1,36-1,54)	887 (761-1034)	0,01	0,001
53	(CH ₃) ₂ C=CH-CH ₂ -	4-MeO-Ph-NHCO	5,296 (4,826-5,811)	>10,000	29,57 (26,94-32,46)	179	>338
52	(CH ₃) ₂ C=CH-CH ₂ -	3-Cl-Ph-NHCO	3,744 (3,312-4,233)	1,453 (1,363-1,549)	147 (122-178)	25,4	9,8
40	Ph-CH ₂ -CH ₂	H	2,16 (1,9-2,47)	0,70 (0,53-0,91)	2,785 (2,463-3,149)	0,0007	0,0002
55	Ph-CH ₂ -CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	1,282 (1,148-1,432)	1,398 (1,225-1,594)	1,47 (1,22-1,78)	872	951
54	Ph-CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	1,049 (961-1,145)	1,698 (1,524-1,892)	13,28 (10,87-16,23)	79	128
41	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	H	11,13 (9,34-13,27)	0,59 (0,44-0,81)	2,666 (2,533-2,805)	0,004	0,0002
57	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	4-MeO-Ph-NHCO	1,514 (1,332-1,721)	>10,000	19,81 (17,61-22,27)	76,4	>504
56	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	3-Cl-Ph-NHCO	>10,000	3,200 (3,025-3,385)	42,65 (39,92-45,57)	>234	75
59	Ph-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	Ph-CH ₂ CO	345 (313-379)	400 (365-438)	121 (102-143)	2,8	3,3

* valorile luate din Kim et al., J. Med. Chem., 39: 4142-4148 (1996)

Datele demonstrează că substituenții cu catenă mică (C1-3) din poziția a 8-a a compușilor 5-[[[(fenil substituit)amino]carbonil]amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinici descriși în prezenta lucrare, în particular, grupările metil, etil și propil, sunt preferate catenelor mai mari, cum ar fi: grupările pentil și hexil. În particular, compușii 45 și 47, compușii substituiți 8-metil, 8-etil și 8-propil, 5-(4-metoxifenil) au prezentat cea mai mare afinitate și selectivitate și, într-adevăr, se presupune că au cea mai mare afinitate și selectivitate pentru subtipul (hA_3) al receptorului adenosinic A_3 uman, dintre toți compușii sintetizați vreodată.

Catenele metil, etil și propil pot fi substituite cu fenil sau cu grupări fenil substituite și tot manifestă afinitate și selectivitate destul de ridicate pentru subtipul A_3 al receptorului adenosinic, dar afinitatea este redusă cu un factor cuprins între 10 și 100. Cu toate acestea, compusul cu o catenă β -feniletil la poziția N^8 și cu o catenă 4-MeO-fenilcarbamoil în poziția N^5 (compusul 55) a prezentat o valoare relativ bună în ceea ce privește afinitatea și selectivitatea ($K_{ihA_3} = 1,47$ nM, $r A_1 / hA_3 = 872$, $r A_{2A} / hA_3 = 951$).

Chiar cu grupările pentil, relativ mari, prezente în compușii 50 și 51, compușii manifestă o afinitate relativ ridicată pentru subtipul A_3 al receptorului adenosinic (81,10 și, respectiv, 29,57 nm), deși selectivitatea scade cu un factor de aproximativ 10...100.

Studiile anterioare au demonstrat că afinitatea compușilor 5-amino-8-(ar)alchil-2-(2-furil)-pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinici pentru subtipul A_3 al receptorului adenosinic a avut tendința de a crește odată cu mărirea grupării din poziția 8. Se pare că tendința inversă este adevărată în cazul afinității compușilor descriși aici pentru subtipul A_3 al receptorului adenosinic. Substituenții C_{1-3} par să reprezinte caracteristicile sterice și lipofilice ideale pentru interacția cu subtipul A_3 al receptorului adenosinic.

Exemplul 18. Experimentele de legare cu un compus radiomarcant

Au fost efectuate o serie de experimente de legare pe diferite linii celulare tumorale, utilizând 0,5 nM [125 I]-AB-MECA, cu legare nespecifică, determinată în prezența a 50 μ M R-PIA sau 200 μ M NECA, pe membranele celulare ale liniilor celulare. Legarea specifică a fost determinată prin scăderea legării nespecifice din legarea totală. Liniile celulare au fost: HL 60, NB4, SKN-MC, SKN-Be2C, SKN-SH și liniile celulare JURKAT. Rezultatele experimentelor de legare sunt prezentate mai jos, în tabelul 2.

Tabelul 2

Linii celulare	Legare totală	Legare nespecifică	Legare specifică (cpm)	Legare specifică procentuală
HL60	3484	2791	693	20
NB4	3377	2740	637	19
SKN-MC	7528	6220	1308	17
SKN-Be2C	6000	4585	1415	24
SKN-SH	2671	2580	91	3
JURKAT	7599	4753	2846	38

Rezultatele sunt prezentate sub formă grafică în fig. 2.

Se pare că liniile celulare JURKAT dau cele mai bune rezultate dintre toate liniile celulare testate. A fost efectuat un experiment de saturare, utilizând liniile celulare JURKAT la 37°C, cu o perioadă de incubare de o oră, utilizând [125 I]-AB-MECA (0,125-1,5 nM), cu legarea nespecifică măsurată cu ajutorul R-PIA (50 μ M). K_d (nM) a fost 4, iar B_{max} (fmol/mg proteină) a fost 290. Rezultatele sunt prezentate, de asemenea, în fig. 2.

RO 121030 B1

A fost efectuat un alt test, pentru a determina dacă receptorul A_1 a fost prezent. Un test de dizlocare a fost efectuat la 0°C, timp de 150 min, pe celule Jurkat, utilizând [3H] DPCPX, un antagonist specific al lui A_1 (0,5 nM), cu legarea nespecifică determinată cu ajutorul R-PIA (50 μ M). Legarea totală a fost 13208, legarea nespecifică a fost 2997, iar legarea specifică a fost 10211 (77%). În consecință, s-a observat un grad mare de legare la A_1 .

Următoarele experimente au descris pentru prima dată caracterizarea receptorilor A_3 din câteva linii celulare tumorale, cum ar fi HL 60 - o leucemie la om promielocitică și Jurkat - o leucemie la om cu celule T, utilizând noul antagonist selectiv (compusul 102), descris aici. În aceste studii au fost incubate membrane (0,5 mg proteină/ml) ale celulelor Jurkat și HL 60, împreună cu 10...12 concentrații diferite din compusul 102, cuprinse între 0,2 și 15 nM pentru celulele Jurkat și, respectiv, 0,1...10 nM pentru celulele HL 60. Fig. 3 reprezintă o curbă de saturare a legării compusului 102 la receptorii adenzinici A_3 din membranele celulare Jurkat, iar liniaritatea dreptei Scatchard din anexă este indicatorul prezenței unei singure clase de situsuri de legare cu valoarea K_d de $1,9 \pm 0,2$ nM și o valoare B_{max} de $1,30 \pm 0,03$ pmoli/mg proteină ($n = 3$). Fig. 4 arată o curbă de saturare a legării compusului 102 la receptorii adenzinici A_3 din membranele celulare HL 60, iar liniaritatea dreptei Scatchard din anexă este indicatorul prezenței unei singure clase de situsuri de legare, cu o valoare K_d de $1,2 \pm 0,1$ nM și o valoare B_{max} de 626 ± 42 fmoli/mg proteină ($n = 3$).

Aceste rezultate arată că multe linii celulare conțin un număr relativ mare de receptori adenzinici. Deoarece este cunoscut faptul că compusul 102 se leagă de receptorii A_3 cu o mare afinitate și selectivitate, este de presupus că există o prezență relativ mare a receptorilor A_3 în celulele tumorale.

Exemplul 19. Formulări farmaceutice

(A) Sistemul transdermic pentru 1.000 de plasturi

Ingrediente	Cantitate
Compus activ	100 g
Fluid silionic	450 g
Dioxid de siliciu coloidal	2 g

(B) Tableta orală pentru 1.000 de tablete

Ingrediente	Cantitate
Compus activ	50 g
Amidon	50 g
Stearat de magneziu	5 g

Compusul activ, împreună cu amidonul sunt granulați cu apă și uscați. Granulelor uscate li se adaugă stearat de magneziu, iar amestecul este amestecat riguros. Amestecul combinat este comprimat în tablete.

RO 121030 B1

(C) *Injectie pentru 1.000 de fiole de 1 ml*

Ingrediente	Cantitate
Compus activ	10 g
Agenti de tamponare	q.s.(quantum satis)
Propilenglicol	400 g
Apă (pentru injectie)	până la 1.000 ml

Compusul activ și agenții de tamponare sunt dizolvați în propilenglicol, la aproximativ 50°C. Apoi, este adăugată cu agitare apa pentru injectie, iar soluția rezultată este filtrată, încărcată în sticlute care sunt închise ermetic și sterilizate prin autoclavare.

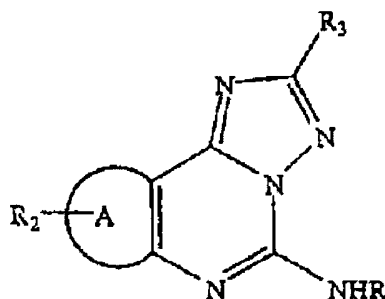
(D) *Injectie continuă (perfuzie) pentru 1.000 ml*

Ingrediente	Cantitate
Compus activ	10 g
Agenti de tamponare	q.s.
Apă pentru injectie	până la 1.000 ml

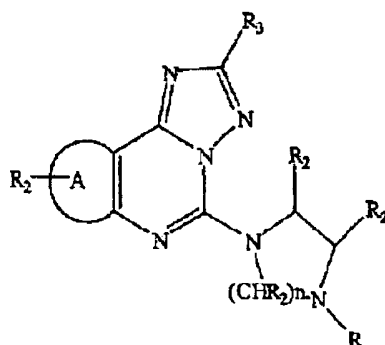
Specialiștii din domeniu vor recunoaște sau vor fi capabili să se convingă, utilizând nu mai mult decât experimentarea de rutină, mulți echivalenți ai aplicațiilor practice, specifice, ale invenției, descrise aici. Se intenționează ca asemenea echivalenți să fie cuprinși în următoarele revendicări.

Revendicări

1. Compus cu formula structurală generală:



sau



în care:

A este imidazol, pirazol sau triazol;

R este $-C(X)R_1$, $C(X)-N(R_1)_2$, $-C(X)OR_1$, $-C(X)SR_1$, $-SonOR$, $-SO_nSR_1$, sau $SO_n-N(R_1)_2$;

R_1 este hidrogen, alchil, alchil substituit, alchenil, alchenil substituit, alchinil, alchinil substituit, aril, heteroaril, heterociclu, alchenil inferior, alcanol inferior sau, dacă este legat de un atom de azot, atunci, luat împreună cu atomul de azot formează un inel azetidinic sau un inel heterociclic din 5...6 membri, conținând unul sau mai mulți heteroatomi, cum ar fi N, O, S:

R_2 este hidrogen, alchil, alchil substituit, aralchil, aralchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit sau aril;

R_3 este furan, pirol, tiofen, benzofuran, benzopirol, benzotiofen, substituit opțional cu unul sau mai mulți substituenți, selectați din grupul alcătuit din: hidroxi, acil, alchil, alcoxi, alchenil, alchinil, alchil substituit, alcoxi substituit, alchenil substituit, alchinil substituit, amino, amino substituit, aminoacil, aciloxi, acilamino, alcaril, aril, ariloxi, azido, carboxil, carboxil-alchil, ciano, halo, nitro, heteroaril, heteroariloxi, heterociclic, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilaminno, tioalcoxi, tioalcoxi substituit, tioariloxi, tioheteroariloxi, $-SO$ -alchil, $-SO$ -alchil substituit, $-SO$ -aril, $-SO$ -heteroaril, $-SO_2$ -alchil, $-SO_2$ -alchil substituit, $-SO_2$ -aril, $-SO_2$ -heteroaril, și trihalometil.

X este O, S sau NR^1 ; n este 1 sau 2;

și săruri ale acestora, acceptabile farmaceutic.

2. Compus conform revendicării 1, în care R este selectat din grupul alcătuit din derivați disubstituiți simetrici ai ureei, ai tioureei, amide, tioamide și sulfonamide.

3. Compus conform revendicării 1, în care R este selectat din grupul alcătuit din hidrogen, alchil, alchenil și aril.

4. Compus conform revendicării 1, în care R_2 este selectat din grupul alcătuit din hidrogen, alchil, alchenil și aril.

5. Compus conform revendicării 1, în care R_3 este furan.

6. Compus conform revendicării 1, în care X este O.

7. Compus conform revendicării 1, în care A este un inel triazolic.

8. Compus conform revendicării 1, în care A este un inel pirazolic.

9. Metodă de tratare a hipertensiunii, inflamațiilor, reacțiilor alergice, degranulării celulelor mastice, a tumorilor și hipoxiei cardiace și de protecție împotriva ischemiei cerebrale, care constă în administrarea, la un pacient care are nevoie de un asemenea tratament, a unei cantități eficiente dintr-un compus definit în revendicarea 1.

RO 121030 B1

- 1 10. Metodă conform revendicării 9, în care R este selectat din grupul alcătuit din
derivați disubstituiți simetrici ai ureei, ai tioureei, amide, tioamide și sulfonamide.
- 3 11. Metodă conform revendicării 9, în care R¹ este selectat din grupul alcătuit din
hidrogen, alchil, alchenil și aril.
- 5 12. Metodă conform revendicării 9, în care R² este selectat din grupul alcătuit din
hidrogen, alchil, alchenil și aril.
- 7 13. Metodă conform revendicării 9, în care X este O.
14. Metodă conform revendicării 9, în care A este un inel pirazolic.
- 9 15. Metodă conform revendicării 9, în care A este un inel triazolic.
16. Metodă conform revendicării 9, în care boala care trebuie tratată este selectată
11 din grupul constând din hipoxie cardiacă și ischemie cerebrală.
17. Metodă de determinare la un pacient, a prezenței celulelor tumorale care posedă
13 o concentrație mare de receptori A₃ adenzinici, care constă în:
a) administrarea la un pacient a unui compus definit în revendicarea 1, care
15 include un marker care poate fi detectat după legarea compusului de celulele tumorale,
b) legarea compusului la celulele tumorale;
17 c) detectarea markerului.
18. Metodă de determinare într-o probă celulară, a prezenței celulelor tumorale care
19 posedă o concentrație mare de receptori A₃ adenzinici, care constă în:
a) prepararea unei suspensii din celulele respective, într-un mediu de cultură celular;
21 b) administrarea la celulele respective, a unui compus definit în revendicarea 1, care
include un marker detectabil după legarea compusului de celulele tumorale;
23 c) legarea compusului la celulele tumorale;
d) detectarea markerului.
- 25 19. Metodă de determinare a prezenței celulelor tumorale rămase după îndepărtarea
chirurgicală a unei tumori, care constă în:
27 a) administrarea la pacient, înainte, după sau în timpul îndepărtării chirurgicale, a
unei tumori, a unui compus definit în revendicarea 1, care include un marker care poate fi
29 detectat după legarea compusului de celulele tumorale reziduale;
b) legarea compusului la celulele tumorale reziduale;
31 c) detectarea markerului.

(51) Int.Cl.

C07D 239/70 (2006.01);

C07D 487/12 (2006.01);

A61K 31/505 (2006.01)

CURBA DE SATURARE A LEGARII [125 I]AB-MECA DE
RECEPTORII UMANI A₃ EXPRIMATI IN CELULE HEK 293

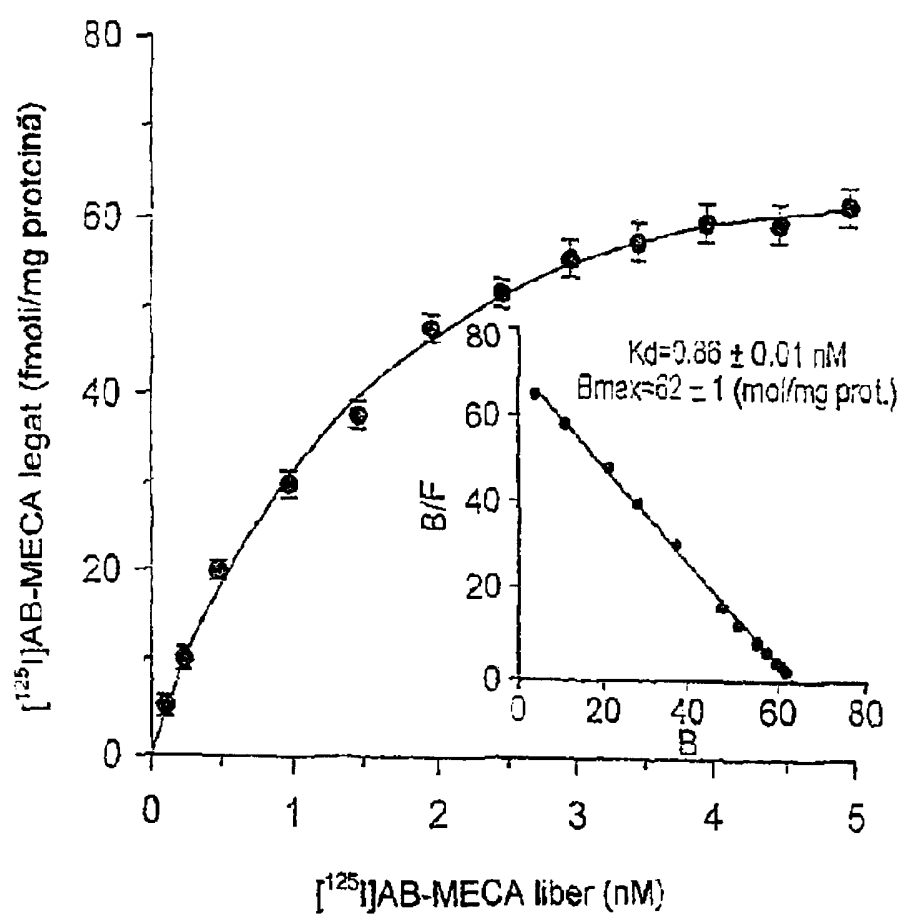


Fig. 1

RO 121030 B1

(51) Int.Cl.

C07D 239/70 (2006.01);

C07D 487/12 (2006.01);

A61K 31/505 (2006.01)

LEGAREA NESPECIFICA A

[¹²⁵I]AB-MECA DE R-PIA (10 μ M)

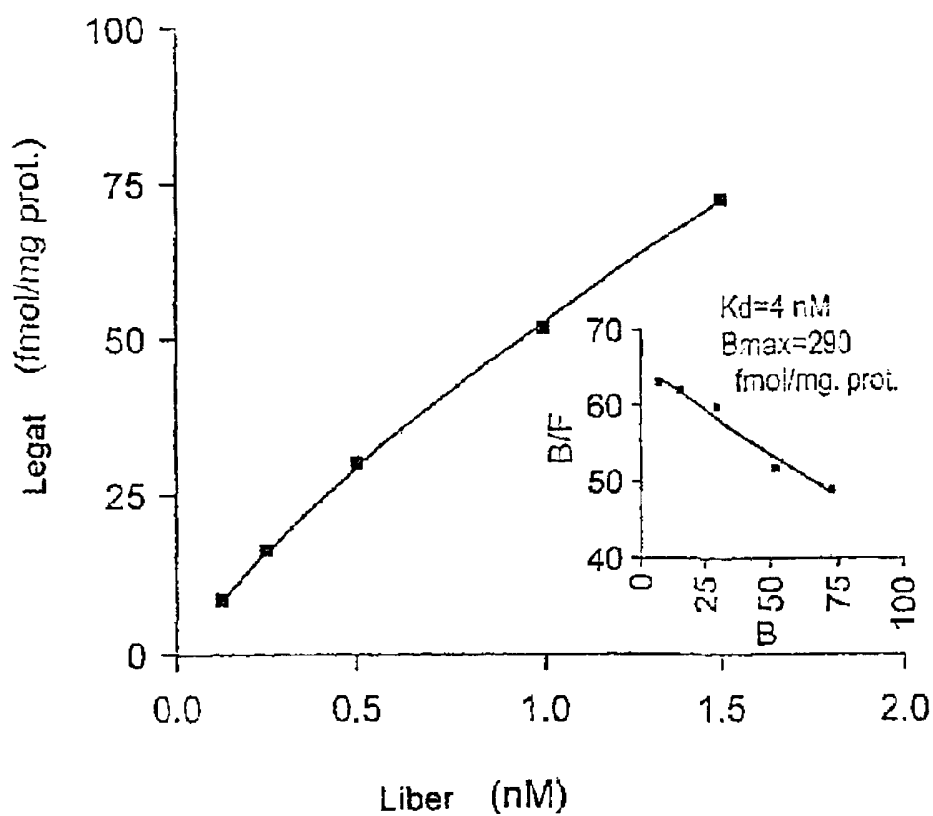


Fig. 2

RO 121030 B1

(51) Int.Cl.

C07D 239/70 (2006.01);

C07D 487/12 (2006.01);

A61K 31/505 (2006.01)

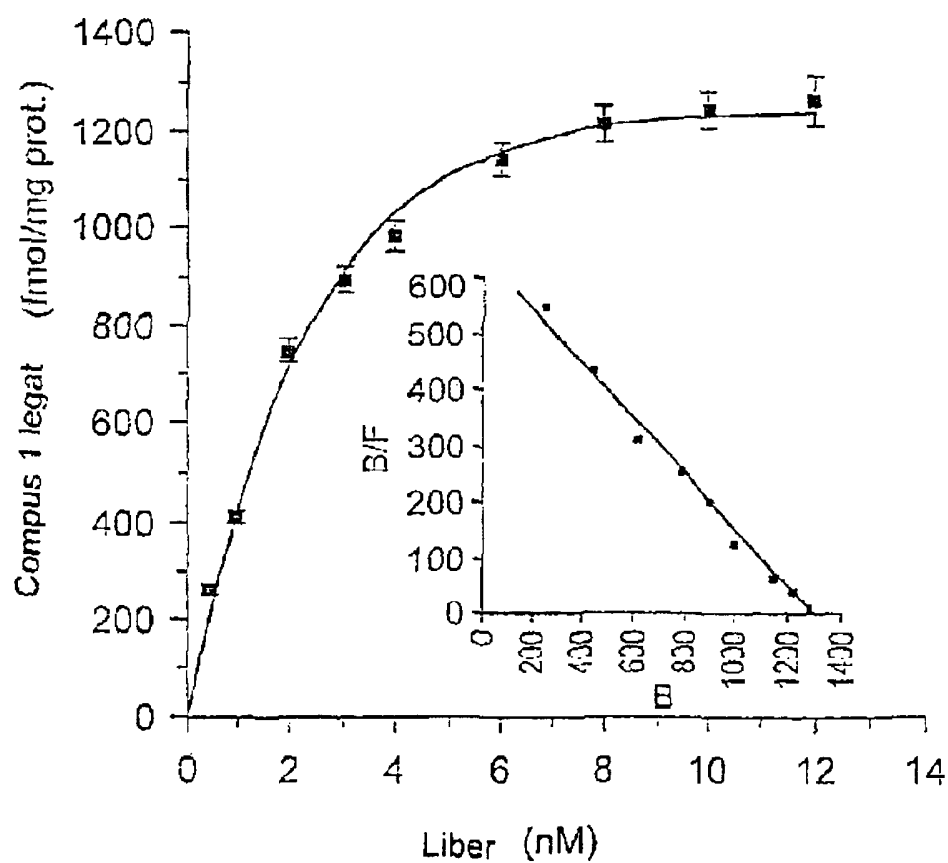


Fig. 3

(51) Int.Cl.

C07D 239/70 (2006.01);

C07D 487/12 (2006.01);

A61K 31/505 (2006.01)

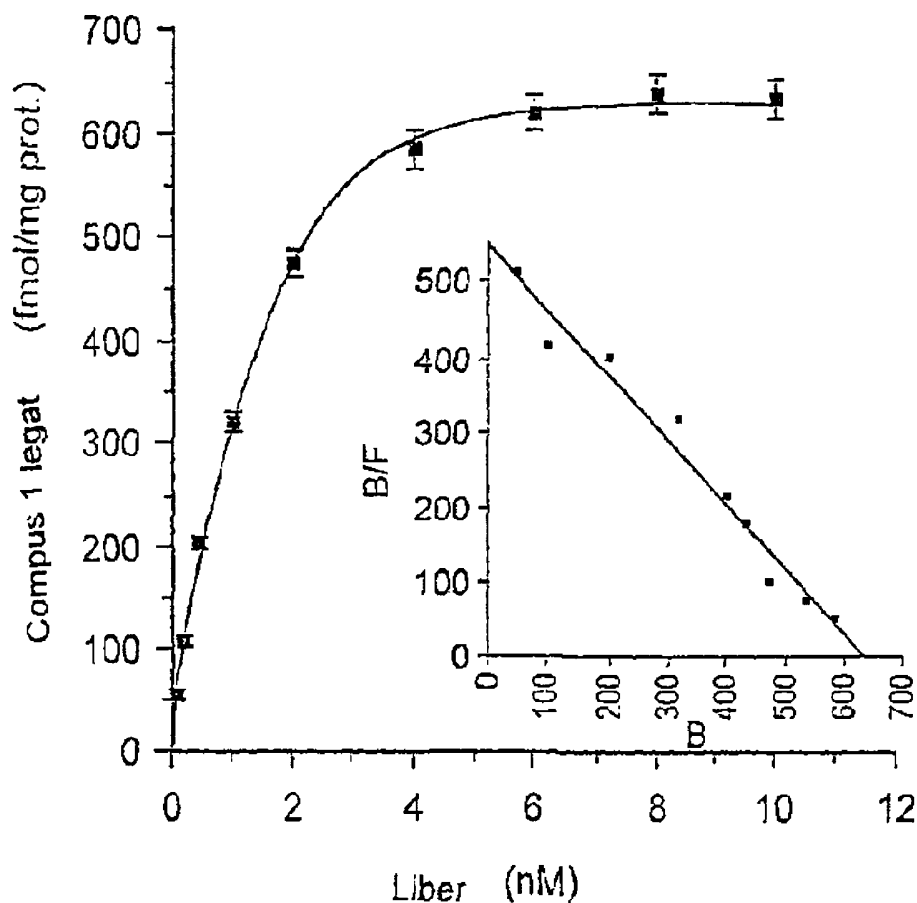


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci