

**Anita Bułakowska**

**SYNTEZA POTENCJALNYCH CYTOSTATYKÓW  
POCHODNYCH 1,3,5-TRIAZYNY**

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej  
Wydziału Farmaceutycznego  
Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor:  
Prof. dr hab. Franciszek Sączewski

**- GDAŃSK 2005 -**

*Składam serdeczne podziękowania:*

*mojemu promotorowi Panu prof. dr hab. Franciszkowi Sączewskiemu za opiekę, cenne rady  
oraz pomoc merytoryczną w trakcie realizacji pracy,  
całemu zespołowi Katedry i Zakładu Chemii Organicznej za życzliwość i miłą atmosferę.*

## SPIS TREŚCI

<b>1.</b>	<b>WSTĘP .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.</b>	<b>Stosowane leki przeciwnowotworowe.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.</b>	<b>Analogi strukturalne kwasu foliowego .....</b>	<b>6</b>
2.2.1.	Inhibitory reduktazy dihydrofolianowej (DHFR).....	6
2.2.2.	Syntaza tymidylanowa (TS) .....	12
2.2.3.	Inhibitory formylotransferazy fosforybozylglicynamidowej (GARTF).....	15
<b>2.3.</b>	<b>Pochodne 1,3,5-triazyny o działaniu przeciwnowotworowym .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.</b>	<b>Inhibitory kinazy tyrozynowej receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR) .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5.</b>	<b>Inhibitory reduktazy rybonukleotydowej (RR).....</b>	<b>23</b>
2.5.1.	Pochodne hydroksymocznika .....	24
2.5.2.	Pochodne hydroksyguanidyny .....	25
<b>2.6.</b>	<b>Analogi puryn .....</b>	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>CEL PRACY .....</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>BADANIA WŁASNE .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.</b>	<b>Otrzymywanie pochodnych 2-(2,4-diaminotriazyn-6-ylo)-2-iminoarylo- acetonitrylu.....</b>	<b>31</b>
4.1.1.	Synteza (2,4-diamino-1,3,5-triazyn-6-ylo)acetonitryli (11–19) .....	31
4.1.2.	Reakcje triazyn-2-ylo-acetonitryli (11–19) z <i>N,N</i> -dimetylo-4-nitrozoaniliną. Synteza 2-(4,6-diamino-1,3,5-triazyn-2-ylo)-2-[[4-(dimetyloamino)fenylo] imino]acetonitryli (20–28) .....	35
4.1.3.	Reakcje [2,6-diamino-(1,3,5-triazyn-2-ylo)]acetonitryli z nitrozobenzenem (29–33) .....	39
<b>4.2.</b>	<b>Synteza pochodnych 2-alkenylo-4,6-diamino-1,3,5-triazyny .....</b>	<b>46</b>
4.2.1.	Otrzymywanie pochodnych 2,4-diamino-6-bromometylo-1,3,5-triazyny (34–38) .....	48
4.2.2.	Synteza bromków [(4,6-diamino-triazyn-2-ylo)-metylo]trifenilo-fosfoniowych (soli fosfoniowych) (39–42).....	50
4.2.3.	Synteza pochodnych 2-alkenylo-4,6-diamino-1,3,5-triazyny (43–51) na drodze reakcji Wittiga .....	52
<b>4.3.</b>	<b>Synteza analogów <i>Metotreksatu</i> .....</b>	<b>62</b>

4.3.1. Otrzymywanie kwasów 4-[[2,4-diamino-1,3,5-triazyn-6-ylo)metylo]amino} benzoesowych (52–59) _____	63
4.3.2. Reakcje kondensacji związków 52 – 59 z aminokwasami _____	67
4.3.3. Hydroliza estrów 60 – 69 do pochodnych kwasowych 70 – 79 _____	73
<b>5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....</b>	<b>84</b>
<b>5.1. Syntezy substratów .....</b>	<b>84</b>
5.1.1. Chlorowodorek <i>N</i> -[imino-(4-fenylopiperazyn-1-ylo)-metylo]guanidyny (1) _____	84
5.1.2. <i>N</i> -[Imino-[4-(4-nitrofenylo)-piperazyn-1-ylo]-metylo]guanidyna (7) _____	86
5.1.3. Otrzymywanie 2-[4-amino-6- <i>R</i> -1,3,5-triazyn-2-ylo]acetonitryli (11-19) _____	87
<b>5.2. Syntezy własne .....</b>	<b>87</b>
5.2.1. Otrzymywanie 2-(4,6-diamino-1,3,5-triazyn-2-ylo)-2-[[4-(dimetyloamino)-fenylo]imino]acetonitryli (20-28) _____	87
5.2.2. 4-Amino- <i>N</i> -fenylo-6-(4-fenylopiperazyn-1-ylo)-1,3,5-triazyno-2- karboksamid (29) _____	88
5.2.3. 4-Amino- <i>N</i> -fenylo-6-pirolidyn-1-ylo-1,3,5-triazyno-2-karboksamid (30) _____	88
5.2.4. 4-Amino- <i>N</i> -fenylo-6-(3,5,5-trimetylo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pirazolin-1-ylo)-1,3,5- triazyno-2- karboksamid (31) _____	88
5.2.5. 4-Amino-6-(5-etylo-4-metylo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pirazolin-1-ylo)- <i>N</i> -fenylo-1,3,5-triazyno-2- karboksamid (32) _____	89
5.2.6. 4-Amino-6-morfolin-4-ylo- <i>N</i> -fenylo-1,3,5-triazyno-2-karboksamid (33) _____	89
5.2.7. Otrzymywanie 2,4-diamino-6-bromometylo-1,3,5-triazyn (34–36) _____	89
5.2.8. 2-Amino-4-morfolino-6-bromometylo-1,3,5-triazyna (37) _____	89
5.2.9. 2-Amino-4-( <i>N</i> -metyloanilino)-6-bromometylo-1,3,5-triazyna (38) _____	90
5.2.10. Synteza bromków [(4,6-diamino-triazyn-2-ylo)-metylo]trifenylo-fosfoniowych (39, 41 i 42) _____	90
5.2.11. Bromek[(4-amino-6-pirolidyno-triazyn-2-ylo)-metylo]trifenylofosfoniowy (40) _____	90
5.2.12. Synteza 2-alkenylo-4,6-diamino-1,3,5-triazyn (43–51) _____	91
5.2.13. Synteza kwasów 4-[[2,4-diamino-1,3,5-triazyn-6-ylo)metylo]amino} benzoesowych (52–59) _____	91
5.2.14. Reakcja kondensacji kwasów 52-59 z estrami aminokwasów. Synteza estrów (60–69) _____	92
5.2.15. Otrzymywanie kwasów (70–79) _____	92
<b>6. WYNIKI BADAŃ BIOLOGICZNYCH .....</b>	<b>93</b>
<b>7. STRESZCZENIE.....</b>	<b>97</b>
<b>8. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>99</b>

## **1. WSTĘP**

Choroby nowotworowe, obok schorzeń układu krążenia, stanowią główną przyczynę umieralności w społeczeństwach XXI wieku.

Dane statystyczne wskazują, iż w okresie ostatnich 4 lat w naszym kraju na nowotwory złośliwe zachorowało blisko 120 tysięcy osób rocznie, a 80 tysięcy chorych zmarło. Światowa Organizacja Zdrowia donosi, że na całym świecie każdego roku rak zabija około 6 milionów osób.

Za przyczyny zapadalności na te choroby uznaje się wydłużenie przeciętnej długości życia; skażenie środowiska substancjami rakotwórczymi (np. składnikami smoły pogazowej, aminami aromatycznymi, azbestem); nieprawidłowe odżywianie oraz palenie tytoniu.

Na świecie obecnie zarejestrowanych jest około 80 chemioterapeutyków, z czego w codziennej praktyce onkologicznej używanych jest zaledwie 30. W większości przypadków są to leki o wysokiej aktywności cytotoksycznej i o znacznej toksyczności przejawiającej się licznymi działaniami niepożądanymi.

Potrzeba opracowania selektywnego leku przeciwnowotworowego, który gwarantowałby zniszczenie komórek nowotworowych bez uszkodzenia komórek prawidłowych, spowodowana jest brakiem wystarczającej skuteczności stosowanych obecnie chemioterapeutyków i metod terapeutycznych.

National Cancer Institute (NCI) Bethesda, w USA, który współpracuje z wieloma ośrodkami naukowymi na całym świecie, w tym również z Wydziałem Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Gdańsku, prowadzi najbardziej kompleksowe prace nad odkryciem skutecznych środków cytotoksycznych. Współpraca polega na badaniu wyselekcjonowanych związków, z myślą o odkryciu kolejnych struktur wiodących, które stanowiłyby podstawę dla szczegółowych prac nad wdrożeniem nowych klas leków przeciwnowotworowych.

Otrzymanie pochodnych 2,4-diamino-1,3,5-triazyny o wysokiej aktywności biologicznej jest jednym z efektów dotychczasowej współpracy NCI z Katedrą i Zakładem Technologii Chemicznej Środków Leczniczych.

Wyniki badań opisane w niniejszej pracy stanowią kontynuację poszukiwań w tym kierunku.

## 2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

### 2.1. Stosowane leki przeciwnowotworowe

Chemioterapia jest metodą leczenia nowotworów za pomocą naturalnych i syntetycznych leków cytostatycznych.

Do leków przeciwnowotworowych, które są wykorzystywane w leczeniu klinicznym należą: związki alkilujące, antymetabolity kwasu foliowego, pirymidyn i puryn, inhibitory topoizomerazy, antybiotyki cytostatyczne, alkaloidy, taksoidy, lignany, hormony i enzymy [1, 2]. Należy również wspomnieć o terapii biologicznej, która od niedawna znalazła zastosowanie w onkologii.

Związki alkilujące posiadają wspólny mechanizm działania: alkilowanie i sieciowanie podwójnej nici DNA. Cytostatyki należące do tej grupy leków to pochodne iperytu azotowego (np. *Chlormetyna*), pochodne etylenoiminy (*Thiotepa*, *Ternimon*), estry kwasu sulfonowego (*Busulfan*), pochodne nitrozomocznika (*Fotemustyna*), triazeny (*Tamozolomid*) oraz kompleksy metali (np. *Cisplatyna*).

Inhibitory topoizomerazy powodują zahamowanie fizjologicznej funkcji DNA. Dzieje się tak, gdy topoizomerazy, które są enzymami odpowiedzialnymi za kontrolę struktury DNA w czasie replikacji i translacji materiału genetycznego, tworzą kompleks z DNA. Leki przeciwnowotworowe topoaktywne stymulują i stabilizują ten kompleks (*Irinotekan*, *Topotekan*).

Antybiotyki antracyklinowe są wytwarzane przez promieniowce lub otrzymywane na drodze syntezy chemicznej. Do tej grupy cytostatyków należą: *Bleomecyna*, *Peplomycyna*, *Mitomycyna* i *Aklarubicyna*. Związki te hamują podział i wzrost komórek, zwłaszcza młodych, szybko rozwijających się nowotworów.

Alkaloidy *Vinca rosea* (*Winblasyna*, *Winkrystyna*, *Windezyna*) hamują podział komórki w stadium metafazy. Wiążą się one z białkiem tubuliną, składnikiem mikrotubul tworzących wrzeciono podziałowe, które jest niezbędne dla rozmieszczenia chromosomów w płaszczyźnie równikowej.

Nowa grupa leków przeciwnowotworowych rokująca duże nadzieje w związku ze swoimi unikatowymi właściwościami farmakologicznymi to taksoidy. Posiadają one działanie antymiotyczne, o odmiennym mechanizmie niż alkaloidy: hamują depolimeryzację mikrotubuli, powodując ich stabilizację. Następstwem tego procesu jest zahamowanie reorganizacji sieci mikrotubuli niezbędnej do prawidłowych

czynności komórki w interfazie i fazie mitozy, uniemożliwiając tym samym rozdział wrzeciona podziałowego (*Taxol*, *Taxotere*).

Cytostatyczne działanie podofilotoksyny (*Podophyllum peltatum*) zostało wykorzystane do syntezy związków o działaniu przeciwnowotworowym: *Etopozydu* i *Tenipozydu*. Obydwa leki hamują nieodwracalnie wejście komórek w profazę, przy czym zmiany w mikrotubulach nie są obserwowane.

Pośród enzymów najszersze zastosowanie w chemioterapii znalazła asparaginaza. Jej efekt leczniczy polega na rozkładzie asparaginy niezbędnej do syntezy białek i rozrostu niektórych komórek nowotworowych, które nie posiadają i nie potrafią produkować syntetazy asparaginianowej.

Antymetabolity kwasu foliowego, puryn i pirymidyn, wskutek zbliżonej do metabolitów budowy chemicznej, wpływają hamująco na syntezę DNA, RNA i białek, co prowadzi w konsekwencji do śmierci komórki. Najpowszechniej stosowanymi lekami tej grupy są: *Metotreksat*, *Fluorouracyl*, *Merkaptopuryna*.

Cytostatyki nie wykazują wybiórczego działania przeciwnowotworowego i uszkadzają nie tylko komórki nowotworowe, ale również tkanki prawidłowe, szybko rosnące (zmienne), w których często występują podziały komórkowe. Do takich tkanek należą: szpik, komórki nabłonkowe, gamety, immunokompetentne komórki układu chłonnego. Uszkodzenie wymienionych tkanek może prowadzić do stanu zapalnego i owrzodzeń błon śluzowych, wyłysienia, upośledzenia czynności narządów rozrodczych, zmniejszenia odporności na zakażenia w wyniku osłabienia namnażania się komórek układu immunologicznego, zaburzeń układu trawiennego, takich jak biegunki, nudności i wymioty w następstwie pobudzania chemoreceptorów tzw. pola najdalszego mózgu.

W zależności od rodzaju, rak reaguje w różnym stopniu na leczenie polegające na wyborze jednej z kilku stosowanych metod. Oprócz chemioterapii, wykorzystuje się naświetlania promieniami rentgenowskimi, zabiegi chirurgiczne i terapię biologiczną.

Termin „terapia biologiczna nowotworów” jest pojęciem szerokim i oznacza leczenie cytokinami (interferony – *Roferon A*, *Berofer*, *Wellferon*), czynnikami wzrostu, swoistą immunoterapię szczepionkami nowotworowymi, przeciwciałami monoklonalnymi (*Rituksan*, *Herceptin*) oraz terapię genową.

Terapia biologiczna, w odróżnieniu od radioterapii i chemioterapii, polega na stosowaniu naturalnych cząsteczek wytwarzanych przez organizm. Należą do nich związki modulujące odpowiedź immunologiczną lub cząsteczki wytwarzane w

odpowiedzi na pojawienie się „intruza”, takie jak przeciwciała. Te naturalne substancje mogą być modyfikowane, np. poprzez połączenie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenom nowotworowym z izotopem promieniotwórczym lub toksyną.

## 2.2. Analogi strukturalne kwasu foliowego

Jednym z ważniejszych podejść do problemu uzyskania syntetycznych leków przeciwnowotworowych jest projektowanie związków o strukturach zbliżonych do naturalnych pirymidyn i puryn, które uczestniczą w biosyntezie DNA. Związki te są znane pod nazwą antymetabolitów, ponieważ uniemożliwiają tworzenie i wykorzystanie normalnych metabolitów komórkowych.

Badania w dziedzinie syntezy inhibitorów reduktazy dihydrofolianowej (DHRF), syntazy tymidylanowej (TS) i formylotransferazy fosforybozylglicynamidowej (GARTF) toczą się od wielu lat. W następnych podrozdziałach przedstawiono ważniejsze osiągnięcia w tej dziedzinie.

### 2.2.1. Inhibitory reduktazy dihydrofolianowej (DHFR)

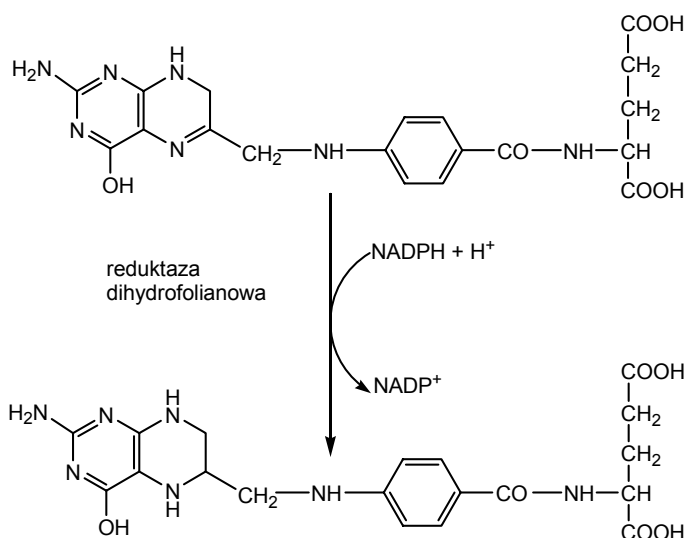
Kwas tetrahydrofoliowy (THF) jest koenzymem niezwykle ważnych przemian biochemicznych, które polegają na przenoszeniu i użytkowaniu jednej cząsteczki węgla w procesie syntezy zasad purynowych i pirymidynowych [2], co przedstawia Rysunek 1.

Reduktaza dihydrofolianowa jest enzymem niezbędnym dla biosyntezy nukleotydów - prekursorów kwasów nukleinowych. Inhibitory kompetycyjne tego enzymu stanowią ważną grupę związków przeciwnowotworowych, których prototypami są *Aminopteryna* i *Metotreksat* (MTX) stosowane w praktyce klinicznej od blisko 60-ciu lat.

Długotrwałe leczenie *Metotreksatem* powoduje występowanie poważnych objawów ubocznych, takich jak dysfunkcja wątroby i zwłóknienie płuc [3]. MTX jest substratem syntazy foliopoliglutaminowej, która katalizuje tworzenie poliglutaminianów z udziałem grupy karboksylowej leku, stąd jego działanie przeciwnowotworowe i objawy uboczne [4]. Efektem stosowania *Metotreksatu* jest także powstawanie komórek opornych na działanie inhibujące leku, a przyczynami

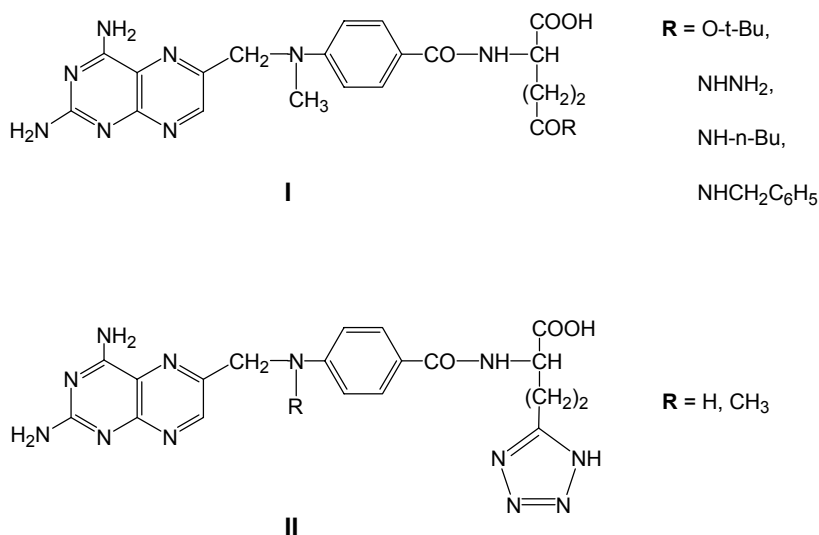


tego zjawiska są: nadprodukcja reduktazy dihydrofolianowej w wyniku amplifikacji genu, powstawanie zmutowanych form enzymu o obniżonym powinowactwie do MTX oraz uszkodzenie układu transportu [5].



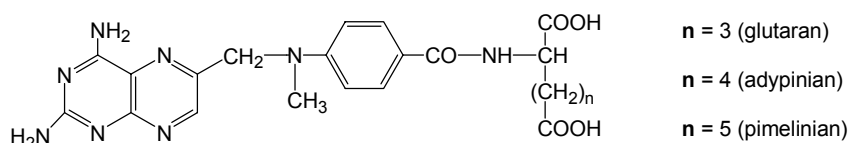
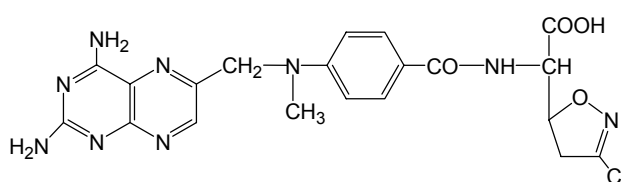
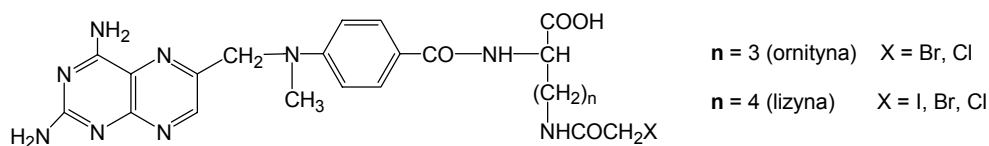
Rysunek 1

Stąd też, wiele zespołów badawczych pracuje nad syntezą analogów *Metotreksatu*, które odznaczałyby się lepszą selektywnością działania oraz pozbawionych niekorzystnych działań ubocznych.



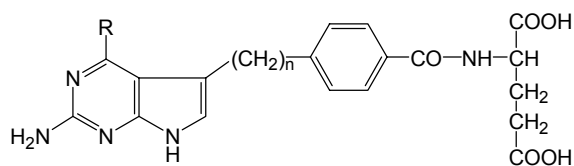
Poszukiwania związków o mniejszej toksyczności doprowadziły do otrzymania grupy  $\gamma$ -podstawionych pochodnych MTX [6, 7] oraz analogów *Aminopteryny* (AMT) – związki I – II. Modyfikacje polegały na zastąpieniu grupy  $\gamma$ -karboksylowej

ugrupowaniem amidowym, estrowym lub pierścieniem tetrazolu. Uzyskano w ten sposób związki, których konwersja do poliglutaminianów jest uniemożliwiona, a tym samym obniżona została ich toksyczność.

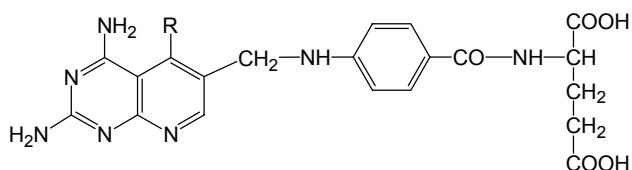


Związki **III** – **V** to analogi MTX, które posiadają zmodyfikowaną resztę kwasu glutaminowego. Została ona zastąpiona lizyną, ornityną (związki typu **III**), azawicyną (3-chloro-4,5-dihydro-5-izoksazoloocetanem - związek **IV**) [8], a także kwasem aminopimelinowym i aminoglutazarowym (związek **V**) [9].

Kolejne zmiany w strukturze wprowadził zespół badaczy japońskich zastępując układ pteryny pirolo[2,3-*d*]pirymidyną (związek **VI**) [10, 11]:



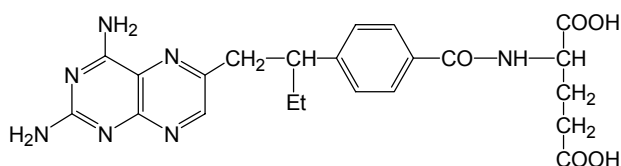
Z kolei grupa badaczy amerykańskich otrzymała nowe analogi MTX poprzez wprowadzenie pirydo[2,3-*d*]pirymidyny w miejsce pierścienia pteryny (związek **VII**) [12]:



**VII**

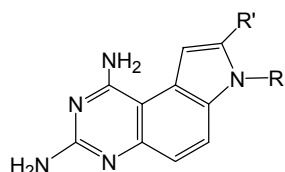
R = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>

Jednym z efektów tych modyfikacji było otrzymanie *Edatreksatu* (EDAM). Jest to nowy lek z grupy antymetabolitów kwasu foliowego, który wykazuje mniejszą toksyczność w porównaniu z MTX:



**Edatreksat**

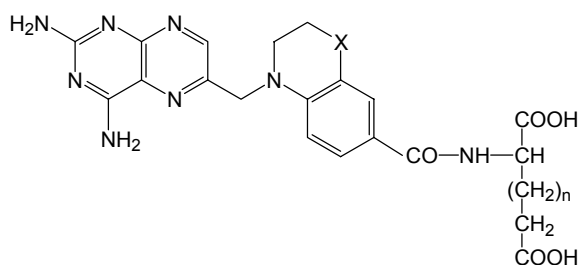
Następną grupą związków heterocyklicznych o wysokim powinowactwie do reduktazy dihydrofolianowej są lipofilowe pochodne chinazoliny typu **VIII** [13]:



**VIII**

R' = H, Me, Et, i-Pr, t-Bu, n-Pr, n-Bu

R = H, Me, Et, CHEt<sub>2</sub>, C(Me)<sub>2</sub>Et, CH(Me)Et, i-Pr, t-Bu, 3,4,5-trimetoksybenzyl



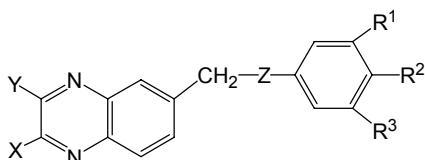
**IX**

X = O, S

n = 1, 2

Pochodne typu **IX**, to związki uzyskane przez badaczy japońskich, wykazujące znacznie większe powinowactwo do DHFR niż *Metotreksat*. Analogi te otrzymano poprzez wbudowanie egzocyklicznego atomu azotu funkcji aminowej kwasu *p*-aminobenzoesowego w pierścień benzoksazyny lub benzotiazyny [14].

Intensywne prace Lorigiego oraz współpracowników skoncentrowały się na otrzymaniu analogów MTX (związki **X** – **XIII**), które zawierają pierścień chinoksaliny w miejscu pierścienia pteryny [15, 16, 17]:



**X**

Y = Cl, NH<sub>2</sub>, OMe

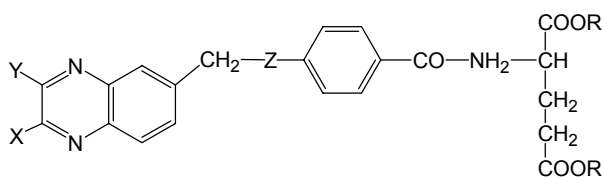
X = Ph, OMe

Z = NH, O, N-CH<sub>2</sub>-C≡CH

R<sup>1</sup> = H, Cl, OMe

R<sup>2</sup> = OMe, Cl, F, COOEt, COOH

R<sup>3</sup> = H, OMe



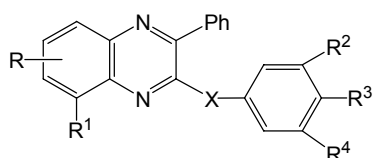
**XI**

Y = Cl, NH<sub>2</sub>, OMe

X = Ph, OMe

Z = NH, O, N-CH<sub>2</sub>-C≡CH

R = Et, H



**XII**

X = O, CH<sub>2</sub>O

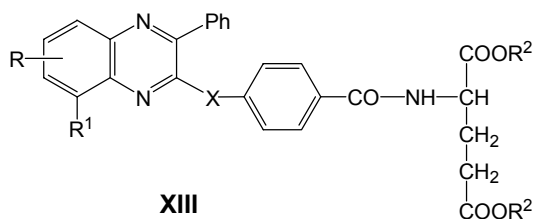
R = H, 6-CF<sub>3</sub>, 7-CF<sub>3</sub>

R<sup>1</sup> = H, NH<sub>2</sub>

R<sup>2</sup> = OMe, H

R<sup>3</sup> = OMe, H, CN, F, COOMe, COOH

R<sup>4</sup> = OMe, H



**XIII**

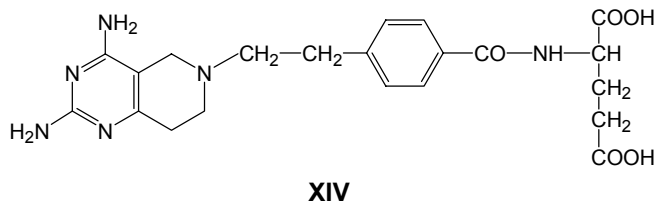
X = O, CH<sub>2</sub>O

R = H, 6-CF<sub>3</sub>, 7-CF<sub>3</sub>

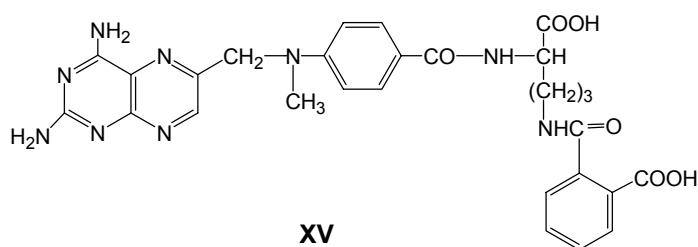
R<sup>1</sup> = H, NH<sub>2</sub>

R<sup>2</sup> = Et, H

Związek **XIV** to analog MTX, którego aktywność cytotoksyczna jest porównywalna do leku prototypowego. 6-Aza-5,8,10-trideaza-5,6,7,8-tetrahydropteryna ulega w małym stopniu konwersji do form poliglutaminianowych, mimo że posiada resztę *p*-aminobenzoilo-L-glutaminianu [18]:



Ponadto Rosowsky i jego współpracownicy wprowadzili N-hemifitaloilo-L-ornitynę w miejsce reszty kwasu glutaminowego otrzymując szereg pochodnych **XV** i **XVI** [19]:



**W** = N, CH(Me, Cl)

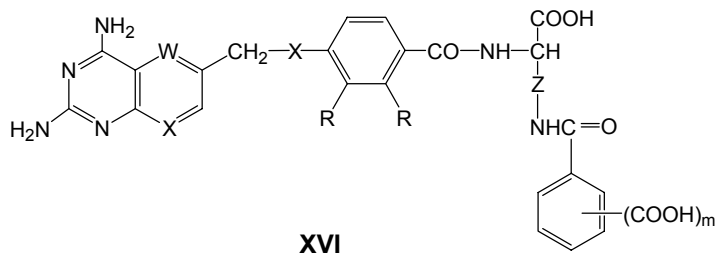
**X** = N, CH

**Y** = NH, CH<sub>2</sub>, CH(Me, Et), C(Et)CO<sub>2</sub>Me

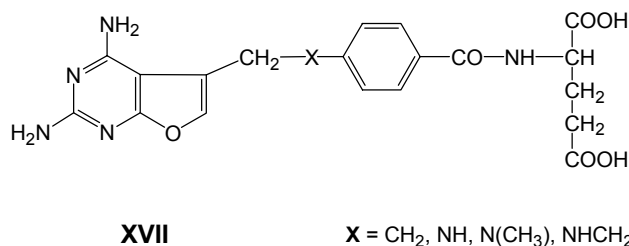
**R** = H, (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>

**Z** = (CH<sub>2</sub>)<sub>1, 2, 3, 4</sub>, CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>

**m** = meta, para



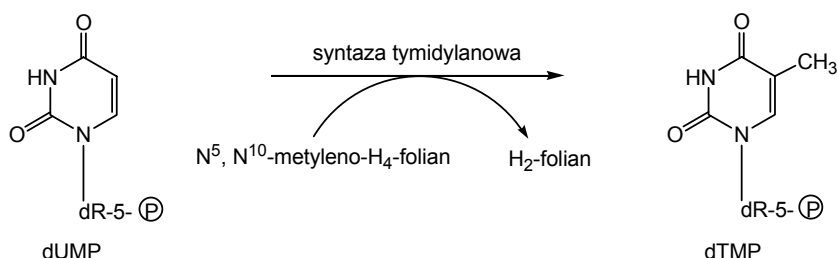
Związek **XVII** to kolejny, ciekawy przykład produktu, który został otrzymany na drodze wprowadzenia układu furo[2,3-*d*]pirymidyny w miejsce pierścienia pteryny [20]:



Reasumując, prace nad syntezą antymetabolitów kwasu foliowego są prężnie rozwijającą się dziedziną poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych i dostarczyły wielu substancji wykazujących korzystniejszy profil działania farmakologicznego od prototypowej *Aminopteryny* i *Metotreksatu*.

### 2.2.2. Syntaza tymidylanowa (TS)

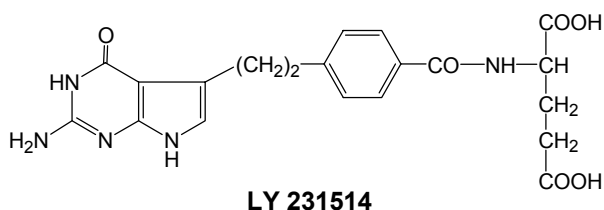
Syntaza tymidylanowa, to enzym, który katalizuje ostatni etap w biosyntezie *de novo* tymidylanu, który jest niezbędnym składnikiem DNA bowiem przekształca 2'-deoksyurydylan do 2'-deoksytymidylanu, co przedstawia Rysunek 2:



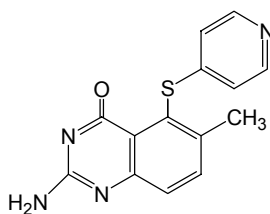
Rysunek 2

Hamowanie działania syntazy tymidylanowej w komórce nowotworowej blokuje biosyntezę DNA i jest przyczyną śmierci komórki. Inhibitory TS są zatem skutecznymi lekami przeciwnowotworowymi [1].

Prace Taylora i współpracowników w dziedzinie syntezy związków zdolnych do hamowania TS doprowadziły do uzyskania analogu LY 231514 [21], który wykazuje powinowactwo zarówno do TS, jak i do DHFR:

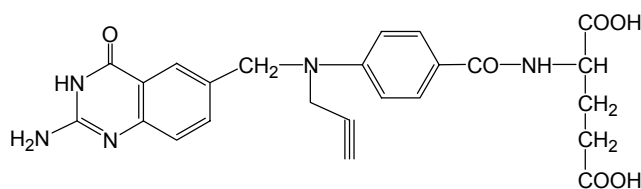


Kolejnym analogiem otrzymanym w 1983 roku przez Webbera i współpracowników jest AG 337 (Thymitaq) – pierwszy nieklasyczny inhibitor syntazy tymidylanowej, który został zakwalifikowany do badań klinicznych [22]:



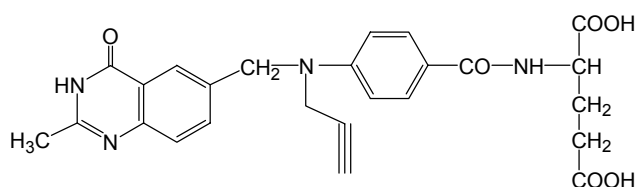
**Thymitaq**

Następnym związkiem, który również osiągnął etap badań klinicznych był kwas CB 3717 (PDDF). Badania te jednak zostały przerwane, ponieważ wykazał on działanie neurotoksyczne oraz hepatotoksyczne [23]:



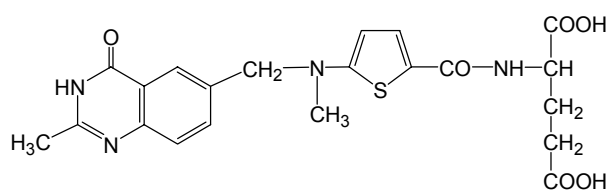
**CB 3717**

Zamiana grupy aminowej PDDF na metylową w pozycji C-2 doprowadziła do otrzymania związku ICI 198583, który nie wykazywał wyżej wymienionych działań ubocznych [24]:



**ICI 198583**

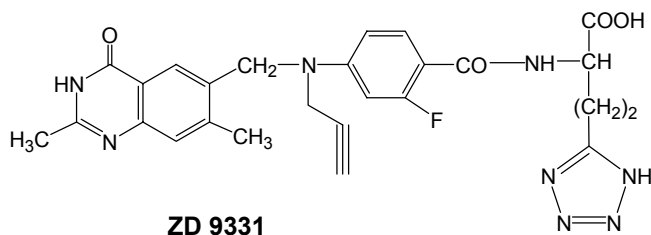
Innym inhibitorem syntazy tymidylanowej jest ZD 1694 (*Tomudeks*), w którym pierścień fenyłowy kwasu *p*-aminobenzoowego zastąpiono tiofenem [25]:



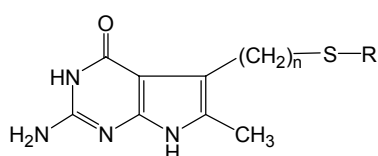
**Tomudeks**

Lek ten jest na etapie badań klinicznych, mających na celu wykazanie jego skuteczności w leczeniu raka jelita grubego. Posiada 60-krotnie wyższą aktywność niż związek macierzysty.

Kolejnym analogiem PDDF jest ZD 9331 otrzymany przez inną grupę badaczy [26]. Brak konwersji do poliglutaminianów spowodowany jest obecnością pierścienia tetrazolu w miejscu grupy  $\gamma$ -karboksylowej i obecnością podstawnika metylowego w pozycji 7:



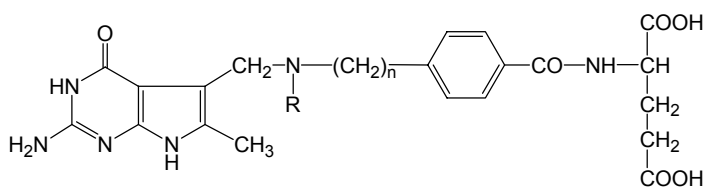
Związki oznaczone numerami **XVIII** i **XIX** (5-podstawione pochodne 2-amino-4-okso-6-metylopirolo[2,3-d]pirymidyny) są przykładem klasycznych i nieklasycznych inhibitorów TS [27, 28]:



**XVIII**

$n = 0, 1$

**R** = 4-pirydyna, p-benzoilo-L-glutaminian,  
4'-ClPh, 3',4'-diClPh, 4'-NO<sub>2</sub>Ph



**XIX**

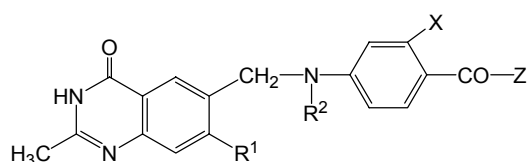
$n = 0, 1$

**R** = H, CH<sub>2</sub>CCH

Bevetsias i jego współpracownicy zsyntetyzowali dipeptydowe analogi kwasu 2-desamino-*N*<sup>10</sup>-propargilo-5,8-dideazafoliowego (związek **XX**) [29].

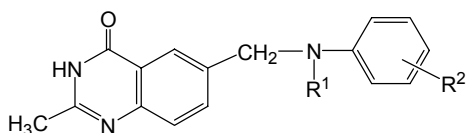
Analogi kwasu 5,8-dideazafoliowego (związek **XXI**), otrzymane na drodze wprowadzenia lipofilowego podstawnika w pozycję *meta* lub *para* pierścienia benzenu, to kolejna interesująca grupa związków hamujących TS [30].





XX

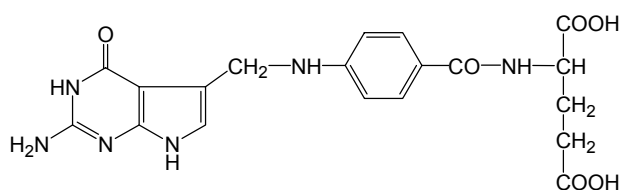
$R^1 = H, Me$   
 $R^2 = Me, Et$   
 $X = H, F$   
 $Z = L-Glu-D-Glu, D-Glu-L-Glu, D-Glu-D-Glu,$   
 $L-Glu-D-Ala, L-Glu-D-Phe, L-Glu-D-add$



XXI

$R^1 = CH_2CCH, H, CH_2CH_3$   
 $R^2 = 3-CH_3, 3-C_2H_5, 3-CH_2OH, 3-CH(OH)CH_3, 3-CF_3,$   
 $3-Br, 3-J, 3-CCH, 4-Cl, 4-CN, 4-NO_2, 4-CO-C_6H_5,$   
 $4-SO_2-C_6H_5, 4-SO_2-NH_2, 4-SO-C_6H_5, 4-COCF_3$

Gangjee i jego współpracownicy powołując się na wcześniejsze doniesienia literaturowe o wysokiej aktywności biologicznej związku LY 231514, otrzymali jego analog (związek **XXII**). Jednakże związek ten wykazywał działanie toksyczne spowodowane jego przedłużoną retencją wewnątrzkomórkową [31]:



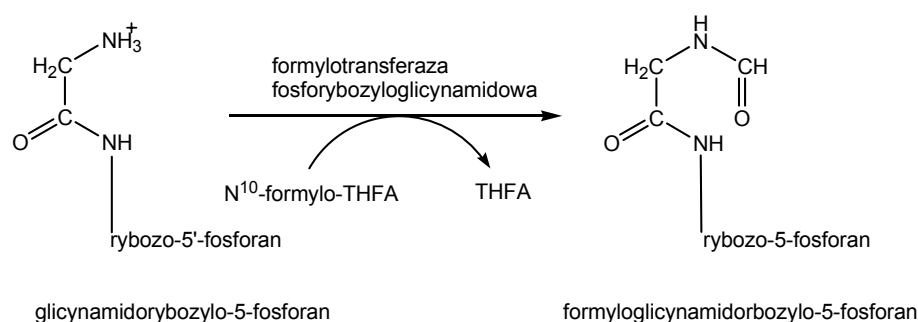
XXII

### 2.2.3. Inhibitory formylotransferazy fosforybozylglicynamidowej (GARTF)

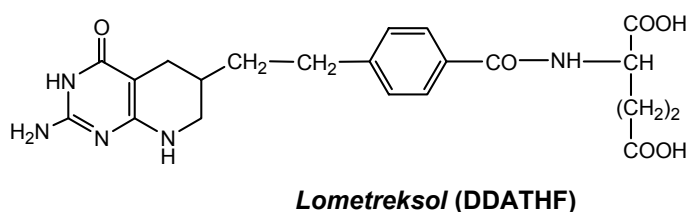
GARTF to enzym odpowiedzialny w biosyntezie puryn za przeniesienie pierwszego z dwóch fragmentów jednowęglowych z  $N^{10}$ -formylotetrahydrofolianu na grupę aminową glicynamidorybozyl-5-fosforanu, co widać na Rysunku 3.

Znaczne osiągnięcia w dziedzinie syntezy potencjalnych leków przeciwnowotworowych z grupy antymetabolitów folianowych posiada zespół kierowany przez E. C. Taylora, koncentrujący się głównie na otrzymywaniu pochodnych kwasu 5,10-dideaza-5,6,7,8-tetrahydrofoliowego. Prace te doprowadziły do uzyskania *Lometreksolu* (DDATHF), którego mechanizm działania przeciwnowotworowego jest odmienny od MTX i polega na hamowaniu

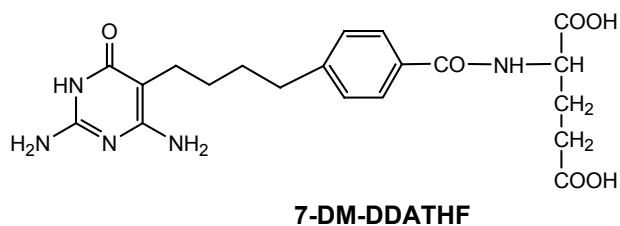
formylotransferazy glicynoamidorybonukleotydu [32]. Niedawno została zakończona druga faza badań klinicznych tego związku [33].



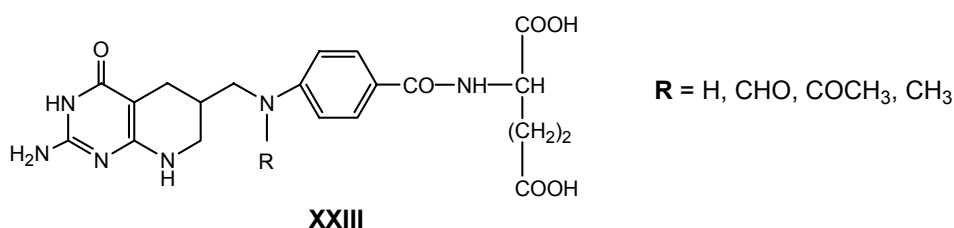
Rysunek 3



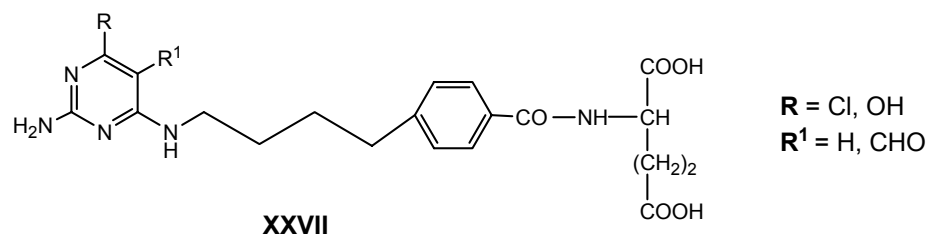
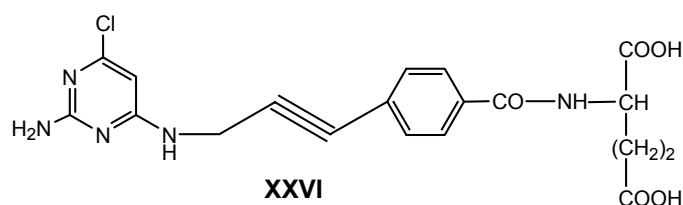
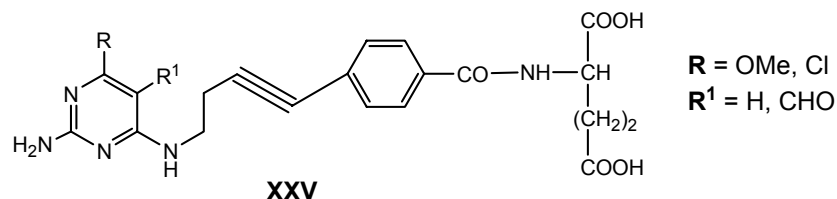
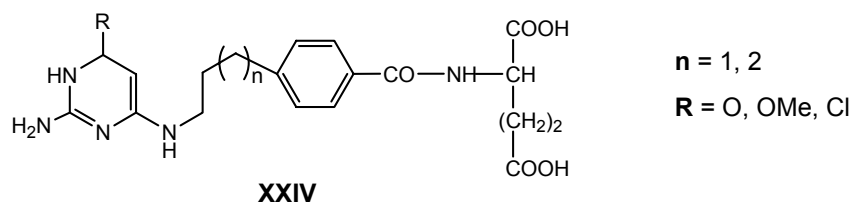
Silne działanie przeciwrakowe wykazał również analog 7-desmetylowy *Lometreksolu* (7 DM-DDATHF) [34]. Obserwowano aktywność *in vitro* i *in vivo* porównywalną do związku macierzystego, również po podaniu doustnym.



Ten sam zespół naukowców zsyntetyzował kwas 5-deaza-5,6,7,8-tetrahydrofaliowy i jego analogi 10-formylo, 10-acetylo i 10-metylo o wysokim powinowactwie do GARTF (struktura **XXIII**) [35]:

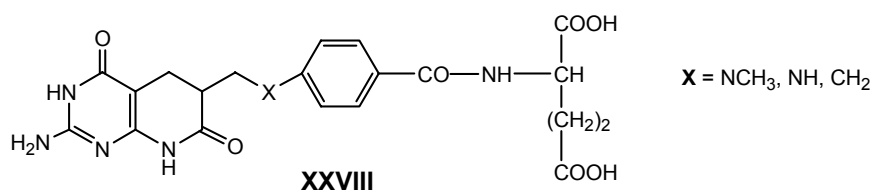


Powyższe osiągnięcia grupy Taylora doprowadziły do otrzymania 5-desmetylowych analogów DDATHF (związki **XXIV** – **XXVII**), które znajdują się w trakcie badań klinicznych [36]:



Natomiast zespół Borella, bazując na doświadczeniach Taylora i jego współpracowników, przeprowadził syntezę analogów DDATHF i 5-DDATHF. Związki te zawierają układ 5,6,7,8-tetrahydropirydo[2,3-d]pirymidyn-7-onu (związek **XXVIII**).

Analogi te jednak nie wykazały zdolności hamowania formylotransferazy fosforybozylglicynamidowej. Powodem braku pożądanego działania może być obecność grupy karbonylowej w pozycji 7 [37]:

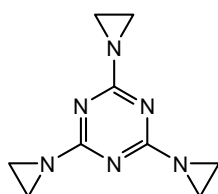


## 2.3. Pochodne 1,3,5-triazyny o działaniu przeciwnowotworowym

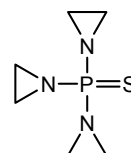
Pochodne 1,3,5-triazyny wykazują szerokie spektrum działania biologicznego, między innymi aktywność przeciwnowotworową.

Podstawę do szeroko zakrojonych badań nad nowymi pochodnymi tej grupy związków dają doniesienia literaturowe na temat leków takich jak: *Tretamina*, *Altretamina*, *Trimelamol*, *Furazil* i *Dioxadet*.

*Tretamina* jest analogiem *Thiotepy*, ma zachowane grupy etylenoiminowe, a zmieniony nośnik tych grup, którym jest pierścień triazyny.

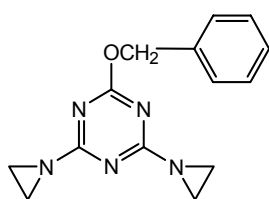


**Tretamina**

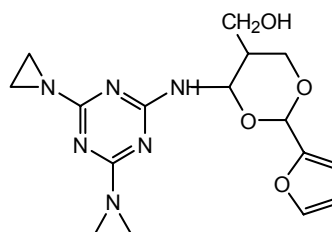


**Thiotepa**

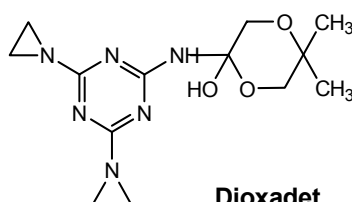
Obecnie lek ten jest rzadko stosowany, aczkolwiek okazał się skuteczny w leczeniu raka jajników, rozlanego raka sutka oraz choroby Hodgkina [38]. Na podstawie struktury tego związku zsyntetyzowano inne analogi z grupami etylenoiminowymi o działaniu przeciwnowotworowym takie jak *Benzodet*, *Furazil* i *Dioxadet* [39]:



**Benzodet**

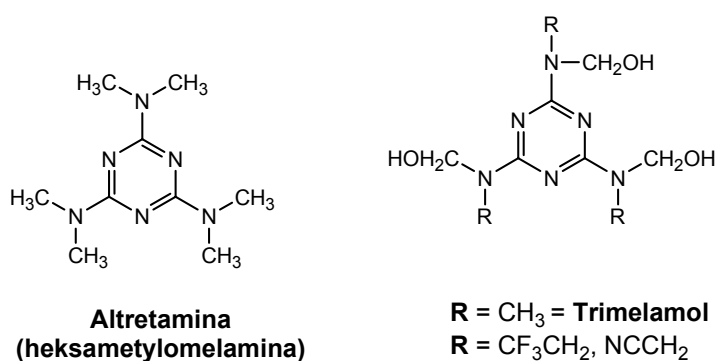


**Furazil**



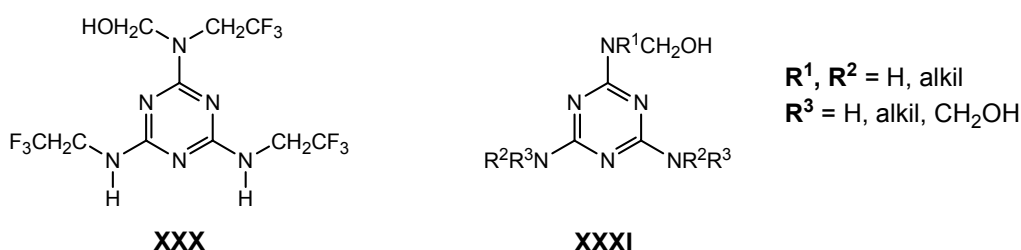
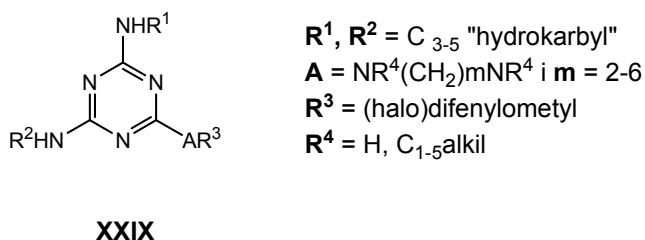
**Dioxadet**

Innym analogiem *Tretaminy* jest *Altretamina*, w której grupy etylenoiminowe zastąpiono dimetyloaminowymi [40]. Heksametylomelamina jest do dziś stosowana w chemioterapii raka jajników, różnego rodzaju chłoniaków, w szczególności po nieefektywnym leczeniu *Cisplatyną*, a także w raku piersi [41]. Jednak mechanizm działania przeciwnowotworowego *Altretaminy* jest dotychczas nieznan.

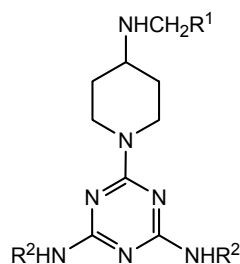


Modyfikując strukturę ugrupowania dimetyloaminowego *Altretaminy* otrzymano szereg pochodnych 1,3,5-triazyny wykazujących aktywność cytostatyczną [42], z których na wyróżnienie zasługuje *Trimelamol*.

Kolejne triaminopochodne triazyny typu **XXIX**, **XXX** i **XXXI** także wykorzystano w leczeniu różnego rodzaju białaczek [43]:



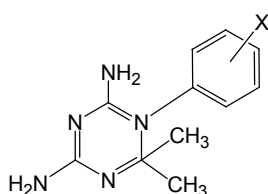
Stwierdzono również, że związki typu **XXXII** mogą powodować odwrócenie oporności względem podstawowych leków przeciwnowotworowych [44]:



$R^1 = CH(C_6H_5F)_2$ ;  $R^2 = H, 2\text{-propenyl}$   
 $R^1 = H, \text{alkil}$ ;  $R^2 = \text{allyl}$

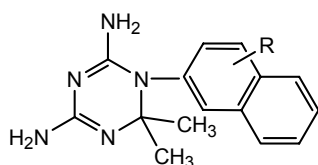
**XXXII**

Pochodne 2,4-diamino-1,2-dihydro-2,2-dimetylo-1-fenyls-triazyny **XXXIII** także wykazują działanie przeciwnowotworowe hamując aktywność DHFR [45, 46]:



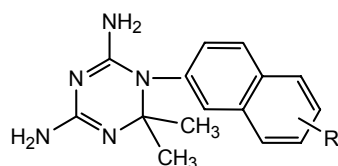
$X = 3\text{-H}, 3\text{-SO}_2\text{NH}_2, 3\text{-COCH}_3,$   
 $3\text{-COOCH}_2\text{CH}_3, 3\text{-OH},$   
 $3\text{-F}, 3\text{-Cl}, 4\text{-SO}_2\text{NH}_2, 4\text{-SO}_2\text{CH}_3,$   
 $4\text{-COCH}_3, 4\text{-COOCH}_3 \text{ itd.}$

**XXXIII**



$R = 6\text{-COOH}, 6\text{-OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5, 6\text{-OH}$

**XXXIV**

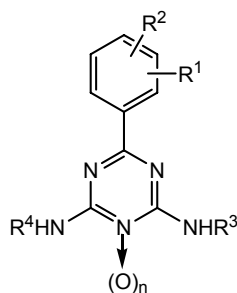


$R = H, 6\text{-Br}, 6\text{-CH}_3\text{O}, 6\text{-PrO}, 6\text{-OH},$   
 $6\text{-PhCH}_2\text{O}, 6\text{-COOH}$

**XXXV**

Z kolei grupa chińskich naukowców stwierdziła, iż analogi 4,6-diamino-1,2-dihydro-2,2-dimetylo-1-naftylo-1,3,5-triazyny **XXXIV** i **XXXV** wykazują działanie przeciwnowotworowe, głównie względem raka żołądka typu MGC-823 [47, 48].

Pochodne 2,4-diamino-6-fenyls-triazyny **XXXVI** opatentowano jako potencjalne środki w leczeniu raka okrężnicy [49], zaś lekiem stosowanym w białaczce P 388 jest *Teroksiron* [50]:

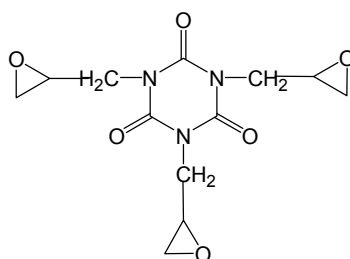


XXXVI

$R^1, R^2 = H, \text{ halo, amino, aralkiloamino, NO}_2, \text{ alkil, alkoksyl, alkoksyalkil, aralkiloksyl, aryl}$

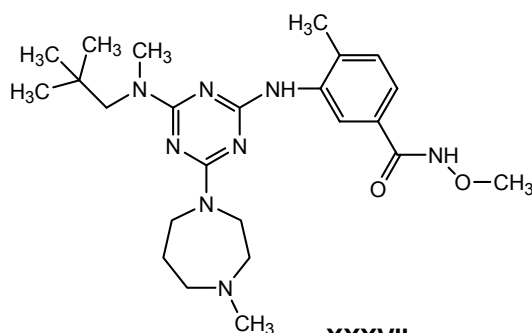
$R^3, R^4 = H, \text{ nikotynoil, alkoksyl;}$

$n = 0, 1$



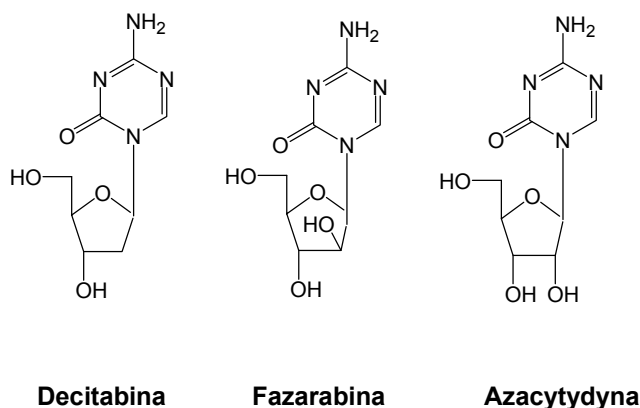
Teroksiron

Związek **XXXVII** posiada aktywność zarówno *in vivo* (w podaniu doustnym), jak i *in vitro* w przewlekłych chorobach o podłożu zapalnym [51]:



XXXVII

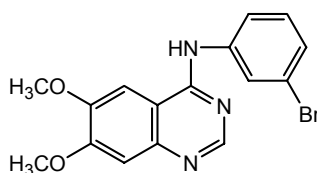
Interesujący wątek poszukiwania leków przeciwnowotworowych stanowią syntezy analogów nukleozydów pirymidynowych zawierających pierścien 1,3,5-triazyny. Przykładowo *Decitabinę* stosuje się w przypadkach przewlekłej białaczki szpikowej (CML) [52] oraz w nowotworach płuc i okrężnicy typu DLD-1 [53]. Jej pochodnymi są *Fazarabina* [54] oraz *Azacytydyna*, która znalazła zastosowanie w leczeniu białaczki oraz raka piersi [55]. Ostatnie doniesienia wykazały, że wpływa hamująco na replikację wirusa HIV-1 [56]:



## 2.4. Inhibitory kinazy tyrozynowej receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR)

EGFR (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) to receptor, który jest dogodnym celem chemioterapii nowotworów, ponieważ odgrywa ważną rolę w procesach stymulacji wzrostu i występuje w nadmiernych ilościach w komórkach nowotworów ludzkich [57].

Odkrycie inhibitorów z grupy 4-anilino-chinazoliny było bardzo ważnym momentem wykorzystania inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR w terapii nowotworów [58]. Związki te działają poprzez kompetycyjne wypieranie ATP z centrum aktywnego enzymu. Aktywność biologiczną zawdzięczają obecności lipofilowych, elektrono-akceptorowych grup w pozycji 3 pierścienia aniliny oraz elektrono-donorowych grup w pozycji 6 lub 7 ugrupowania chinazoliny. Bromopochodna typu **A** jest przykładem, dla której  $IC_{50} = 0.025 \mu\text{M}$  [59]:

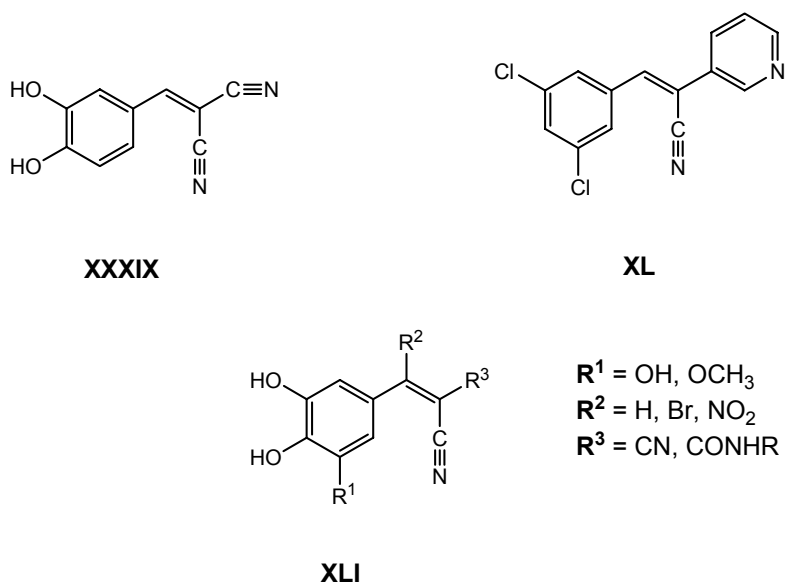


**XXXVIII**

*Tyrfostyny* są odrębną klasą związków, które są inhibitorami kinazy tyrozynowej. Te niewielkie cząsteczki związków organicznych zostały zaprojektowane jako mimetyki tyrozyny mające działać w centrum aktywnym proteinowych kinaz tyrozynowych. Modyfikując nieznacznie ich strukturę odkryto

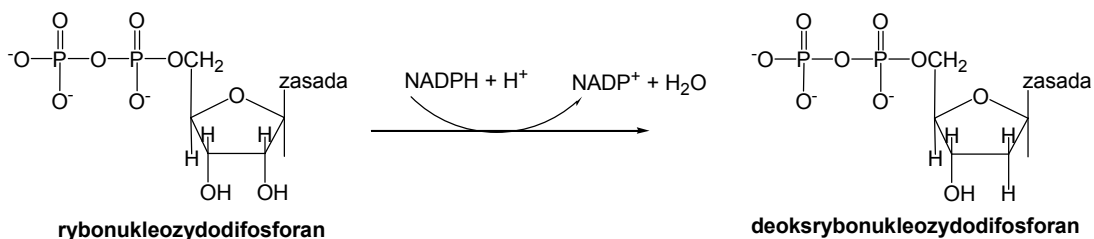


analogi hamujące selektywnie kinazę tyrozynową EGFR. Związki **XXXIX** – **XLI** wykazały znaczną aktywność przeciwnowotworową w badaniach na zwierzętach [60-62]:



## 2.5. Inhibitory reduktazy rybonukleotydowej (RR)

Reduktaza rybonukleotydowa RR jest enzymem odpowiedzialnym za przekształcenie rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów (Rysunek 4). RR działa jedynie w komórkach dzielących się, które aktywnie syntetyzują DNA [2].



Rysunek 4

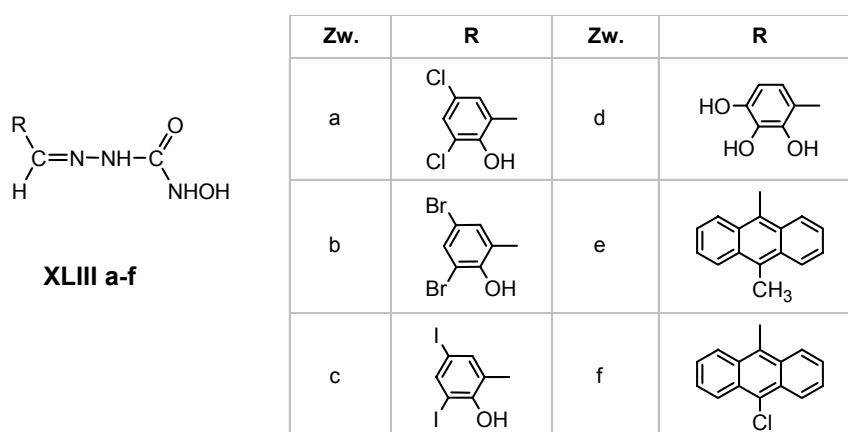
RR odgrywa bardzo ważną rolę w momentach przełomowych dla rozwoju komórek nowotworowych a jej aktywność jest ściśle powiązana z nowotworowym stanem ekspresji. Istnieją dwie główne klasy leków hamujących ten enzym, które omówiono w kolejnych podrozdziałach.

### 2.5.1. Pochodne hydroksymocznika

Hydroksymocznik, hydroksyguanidyna, tiosemikarbazon oraz podstawiony kwas benzohydroksamowy, wykazują działanie przeciwnowotworowe polegające na hamowaniu syntezy DNA poprzez blokowanie aktywności RR [63].

Hydroksymocznik (HU), znany pod nazwą *Hydroksykarbamid*, jest obecnie stosowany w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej, czerwienicy prawdziwej i czerniaka złośliwego. Związek ten jest także inhibitorem cytozolowych izoenzymów hCAI i hCAII ludzkiej anhidrazy węglanowej [64]. Dowiedziono jednak, że jego zastosowanie terapeutyczne ma kilka wad: krótki okres półtrwania, konieczność stosowania dużych dawek oraz szybki rozwój oporności nowotworów na leczenie.

Związki **XLIII a – f**, to 6 analogów zasad Schiffa hydroksysewikarbazydu (SB-HSC), które w badaniach *in vitro* na komórkach białaczki mysiej L 1210 wykazały 11 - 30-krotnie wyższą aktywność biologiczną niż związek macierzysty:

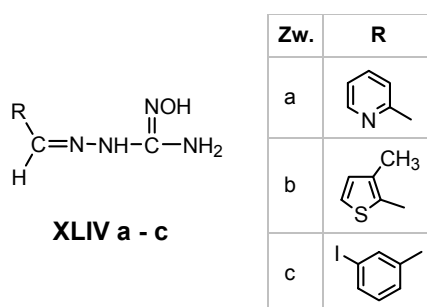


Czynnikiem przeciwnowotworowym jest obecność farmakoforu – ugrupowań NHCONHOH oraz grupy hydroksylowe w pozycji *orto*- obecne w pierścieniu fenylowym (**XLIII a – d**). Związek **XLIII d**, który posiada ponadto 2 grupy hydroksylowe w pozycji *meta* i *para* jest w tej grupie najaktywniejszym inhibitorem RR. Poza tym, badania *in vitro* z użyciem ludzkich komórek CCRF-CEM białaczki dowiodły, że pochodne **XLIII a** oraz **XLIII e** odznaczają się dużą selektywnością działania i mniejszą toksycnością [65].

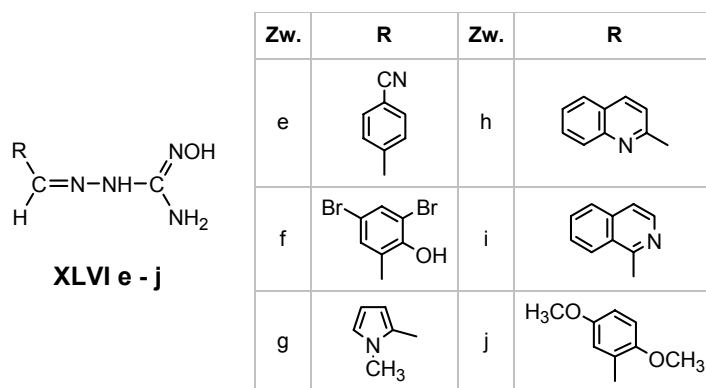
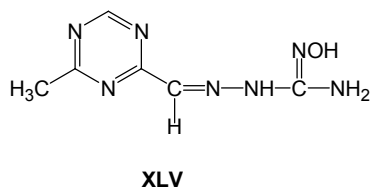
## 2.5.2. Pochodne hydroksyguanidyny

Hydroksyguanidyna zawiera grupę iminową układu guanidyny oraz grupę hydroksyaminową hydroksymocznika odpowiedzialną za działanie przeciwnowotworowe [66].

Zespół kierowany przez Liena otrzymał pochodne *N*-hydroksy-*N'*-aminoguanidyny. W wyniku badań *in vitro* na komórkach rakowych szczurów związki **XLIV a – c** wykazały wysoką aktywność przeciwnowotworową [67]:

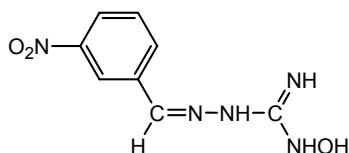


Kolejne modyfikacje struktury doprowadziły do uzyskania nowego związku **XLV**. Jest to pochodna triazyny, otrzymana w wyniku modyfikacji struktury powyższych analogów, która posiada 10-krotnie większą aktywność przeciwnowotworową i niższą toksyczność niż związki macierzyste [68]:



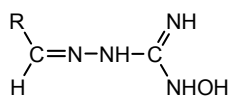
W grupie pochodnych hydroksyguanidyny **XLVI**, obiecującym środkiem farmakologicznym jest związek **XLVI f** będący przedmiotem badań w NCI.

Mechanizm hamowania reduktazy rybonukleotydowej był badany przez kilka zespołów naukowych, a wyniki były podobne. Związki **XLVI h**, **XLVI i** oraz **XLVI k** hamują enzym, przy czym najsilniejszym inhibitorem jest **XLVI i** [69].



**XLVI k**

Analogi hydroksyguanidyny oznaczone symbolami **XLVII a - f** zostały przebadane *in vitro* na komórkach białaczki mysiej L 1210 oraz komórkach ludzkiego raka gruczołu piersiowego ZR-75 [70]. Wszystkie pochodne okazały się bardzo skutecznymi chemioterapeutykami.

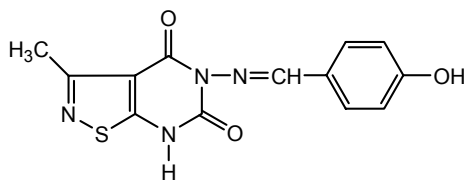


**XLVII a - f**

Zw.	R	Zw.	R
a		d	
b		e	
c		f	

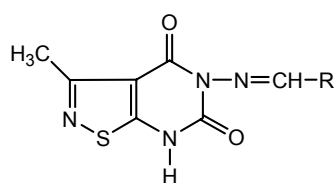
## 2.6. Analogi puryn

Zespół badaczy z AM we Wrocławiu kierowany przez profesora Z. Machonia wykazał, iż zasada Schiffa oznaczona symbolem **IP-10** tj. 5-(4'-hydroksybenzylidenoimino)-3-metylo-izotiazolo[5,4-d]pirymidyno-(7H)-4,6-dion wykazuje silną aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek białaczki i czerniaka [71].



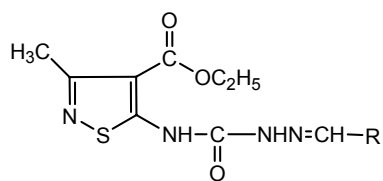
IP - 10

Następnie otrzymano pochodne 5-amino-3-metylo-izotiazolo[5,4-*d*]pirymidyno-(7*H*)-4,6-dionu (**XLVIII a – g**), a także pochodne estru etylowego kwasu 3-metylo-5-semikarbazido-4-izotiazolokarboksylowego (**XLIX a – d**), z których największe nadzieje na uzyskanie leków onkostatycznych rokują związki **XLVIII b i c** oraz **XLIX a** [72]:



XLVIII a - g

Zw.	R	Zw.	R
a		e	
b		f	
c		g	
d			

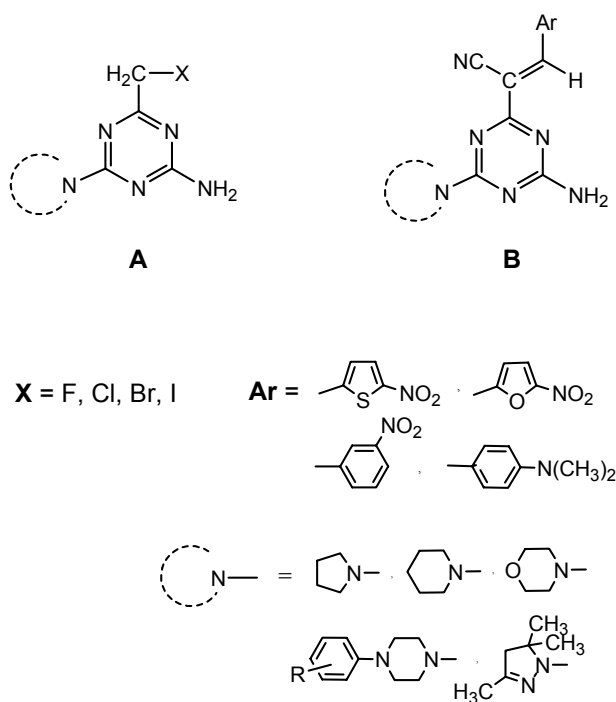


XLIX a - d

Zw.	R	Zw.	R
a		c	
b		d	

### 3. CEL PRACY

Badania prowadzone od szeregu lat w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych we współpracy z Katedrą Chemii Organicznej AMG dotyczą poszukiwania nowych syntetycznych leków przeciwnowotworowych. Obiecujące wyniki uzyskano w grupie pochodnych 1,3,5-triazyny zawierających ugrupowania aminowe w położeniu 2 i 4 oraz podstawnik halometylowy [73] lub akrylonitrylowy [74] w pozycji 6 pierścienia heterocyklicznego. Struktury najaktywniejszych związków typu **A** i **B** przedstawiono na Rysunku 5:



Rysunek 5

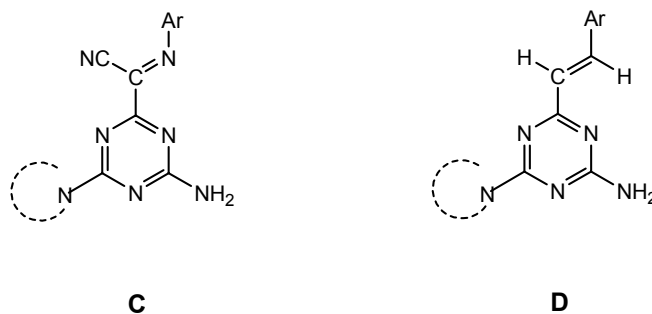
Jakkolwiek spektrum działania przeciwnowotworowego związków **A** i **B** jest odmienne, wspólnym elementem strukturalnym jest obecność ugrupowania 2,4-diamino-1,3,5-triazyny, przy czym atom azotu w położeniu 4 jest wbudowany w pierścień heterocykliczny. Oznacza to, że 2-aminotriazyna stanowi istotny element farmakoforowy tej klasy cytostatyków.

Związki typu **A** zostały wyczerpująco zbadane pod kątem zależności struktura-aktywność biologiczna [74]. Wykazano, że najaktywniejszy związek zawiera w pozycji 4 triazyny pierścień 3,5,5-trimetylopirazoliny, a w położeniu 6 ugrupowanie bromometylowe.

Pod tym względem pochodne typu **B** są mniej zbadane, a obecność ugrupowania akrylonitrylowego rodzi szereg istotnych pytań na gruncie chemii medycznej:

- Czy obecność grupy nitylowej (CN) jest niezbędna dla aktywności przeciwnowotworowej?
- Czy obecność grupy nitrowej (NO<sub>2</sub>) pierścienia aromatycznego (heteroaromatycznego) jest niezbędna?
- Jaki jest wpływ azotowego pierścienia heterocyklicznego w położeniu 4 triazyny na aktywność biologiczną?

Szukając odpowiedzi na powyższe pytania postanowiono przeprowadzić syntezy dwóch szeregów pochodnych triazyny oznaczonych na Rysunku 6 ogólnymi wzorami **C** i **D**:



Rysunek 6

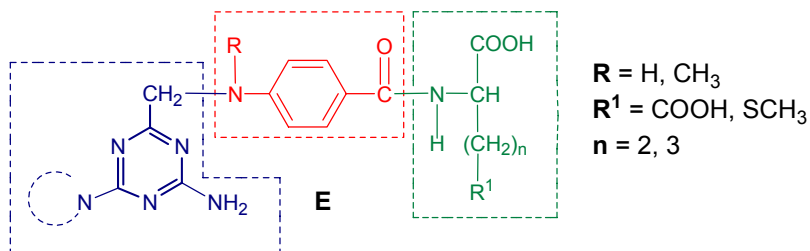
Związki typu **C** posiadają atom azotu w miejscu grupy = C3-H akrylonitrylu. Natomiast związki typu **D** pozbawione są grupy nitylowej przy alkenylowym atomie węgla.

Obie serie zawierają zróżnicowane podstawniki heterocykliczne w pozycji 4 triazyny oraz różne pierścienie aromatyczne (heteroaromatyczne) przy alkenylowym atomie węgla.

W ostatnich latach rosnącego znaczenia nabierają badania w dziedzinie syntezy potencjalnych leków posiadających dwa punkty uchwytu, a więc działających za pośrednictwem dwóch niezależnych mechanizmów (ang. *dual acting drugs*) [75, 76]. Związki tego typu posiadają cechy strukturalne umożliwiające wpływ na biomolekuły odpowiedzialne za procesy metaboliczne, których efektem końcowym - jak w przypadku leków cytostatycznych - jest zahamowanie wzrostu lub apoptoza komórek nowotworowych.

W „Części Teoretycznej” pracy (Rozdział 2) omówiono ważniejsze osiągnięcia w zakresie syntezy antymetabolitów kwasu foliowego, których prototypem jest *Metotreksat*. Naszą uwagę zwrócił fakt, iż dokonano syntezy związków zawierających ugrupowanie 2-aminopirymidyny w miejscu pierścienia pteryny, natomiast brak jest informacji n.t. syntezy odpowiednich analogów 2-amino-1,3,5-triazyny.

Stąd też, kolejnym celem niniejszej pracy była synteza analogów *Metotreksatu* przedstawiona na Rysunku 7 o ogólnym wzorze **E**:



Rysunek 7

Budowa chemiczna analogów *Metotreksatu* typu **E** umożliwia modyfikacje w obrębie trzech elementów strukturalnych:

- ugrupowania 2-aminotriazyny: zróżnicowane azotowe pierścienie heterocykliczne w położeniu 4;
- ugrupowania kwasu *p*-aminobenzoowego: **R** = H lub CH<sub>3</sub>;
- ugrupowania aminokwasu: **n** = 2, 3; **R**<sup>1</sup> = COOH lub SCH<sub>3</sub>.

Reasumując, celem niniejszej pracy było opracowanie metod syntezy trzech nie opisanych uprzednio w literaturze chemicznej, szeregów związków pochodnych 1,3,5-triazyny **C**, **D** i **E** o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej oraz w przypadku wystąpienia takiego działania dokonanie analizy zależności struktura - aktywność (SAR).



## 4. BADANIA WŁASNE

### 4.1. Otrzymywanie pochodnych 2-(2,4-diaminotriazyn-6-ylo)-2-iminoarylo-acetonitrylu

Analogi pochodnych akrylonitrylu zawierające atom azotu w miejscu grupy =C3H oznaczone w rozdziale 2 (Cel Pracy) ogólnym wzorem **C** otrzymywano na drodze reakcji kondensacji pochodnych (2,4-diamino-1,3,5-triazyn-6-ylo)acetonitrylu ze związkami nitrozowymi [77].

W kolejnych podrozdziałach omówiono wyniki badań nad syntezą (2,4-diamino-1,3,5-triazyn-6-ylo)acetonitryli stosowanych jako substraty oraz ich kondensacji ze związkami nitrozowymi.

#### 4.1.1. Synteza (2,4-diamino-1,3,5-triazyn-6-ylo)acetonitryli (11–19)

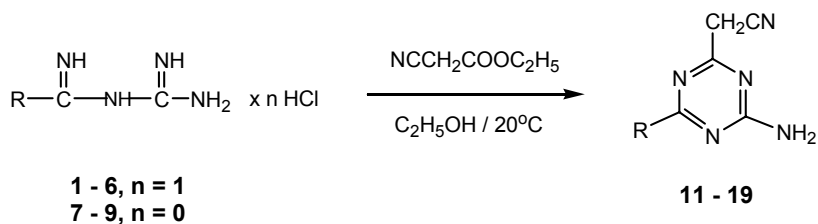
Znana metoda otrzymywania pochodnych 2,4-diamino-1,3,5-triazyny polega na reakcji cyklokondensacji biguanidów z odpowiednimi estrami kwasów karboksylowych [78]. Zastosowanie cyjanooctanu etylu umożliwia otrzymanie odpowiednich pochodnych acetonitrylu [79].

W celu otrzymania tytułowych pochodnych acetonitrylu **11 – 19**, w pierwszym etapie przeprowadzono syntezę odpowiednich pochodnych biguanidu działając cyjanoguanidyną na chlorowodorki amin cyklicznych. Na tej drodze otrzymano biguanidy **1 – 6** w formie chlorowodorków, a po neutralizacji chlorowodorków wodnym roztworem NaOH uzyskano biguanidy **7 – 9** w postaci wolnych zasad.

Następnie przeprowadzono syntezę acetonitryli **11 – 19** zgodnie ze Schematem 1.

Syntezy związków **11 – 19** przeprowadzono dwiema metodami. Pierwsza z nich, przy zastosowaniu chlorowodorków biguanidu **1 – 6** wymagała zastosowania etanolanu sodu w bezwodnym etanolu i umożliwiła otrzymanie produktów **11 – 16** z wydajnością 34 - 76%. Druga metoda, przy zastosowaniu wolnych zasad **7 – 9**, prowadzona w środowisku alkoholu etylowego w temperaturze pokojowej prowadziła do wytworzenia związków **17 – 19** z wydajnością 16 - 63%.

Schemat 1



Zw.	R	Zw.	R
1, 11		6, 16	
2, 12		7, 17	
3, 13		8, 18	
4, 14		9, 19	
5, 15			

Spośród pochodnych biguanidu związki oznaczone numerami **2**, **3**, **4** i **7** nie były wcześniej opisane w literaturze chemicznej. W grupie pochodnych acetonitrylu nowymi związkami są: **12**, **13**, **14** i **17**.

Strukturę otrzymanych związków **11** – **19** potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz w przypadku związków nie opisanych w piśmiennictwie, na podstawie analizy widm IR i NMR.

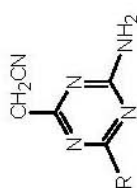
Przykładowo, w widmie IR związku **17** znajdujemy pasmo odpowiadające drganiom walencyjnym grupy CN przy  $2259 \text{ cm}^{-1}$  oraz dwa intensywne pasma drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grupy  $\text{NO}_2$  przy  $1322$  i  $1534 \text{ cm}^{-1}$ .

W widmie  $^1\text{H}$  NMR tego związku występują dwa multiplety o intensywności czterech protonów każdy w zakresach 3.61 i 3.88 ppm; singlet 6- $\text{CH}_2$ - przy 3.93 ppm oraz dwa dublety w zakresie aromatycznym widma przy 7.06 i 8.1 ppm odpowiadające protonom pierścienia fenyłowego podstawionego w pozycjach 1 i 4. Obecność protonów grupy aminowej potwierdza szeroki singlet o intensywności dwóch protonów przy 7.17 ppm.

Reasumując, w tej części pracy otrzymano 18 związków, w tym 8 wcześniej nie opisanych w literaturze (**2**, **3**, **4**, **7**, **12**, **13**, **14**, **17**). Pochodne acetonitrylu **11** – **19** posłużyły jako substraty do reakcji ze związkami nitrozowymi.


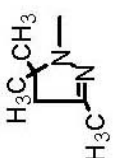
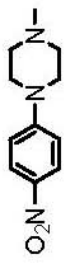
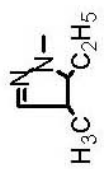
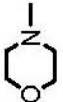
Właściwości fizykochemiczne i spektroskopowe otrzymanych związków przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe związków (11 – 19)



Nr zw.	R	Sposób syntezy	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
11		A	40	205-209 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> 295.35	3433, 3323, 3156, 2259, 1653	3.14-3.19 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.86 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.9 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.83 (t, 1H, CH, J = 7.2 Hz), 6.98 (d, 2H, CH, J = 7.6 Hz), 7.2 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.25 (t, 2H, CH, J = 8.5 Hz)
12		A	34	173-176 (MeOH)	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> 309.37	3350, 3325, 2255, 1650, 1632	2.32 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.84-2.89 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.35-3.89 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.92 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.99-7.22 (m, 4H, CH + 2H, NH <sub>2</sub> )
13		A	46	160-162 (MeOH)	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>7</sub> 329.79	3436, 3322, 3155, 2259, 1650	3.24 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.86 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.92 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.83 (d, 1H, CH, J = 7.8 Hz), 6.96 (d, 1H, CH, J = 8.3 Hz), 7.01 (s, 1H, CH), 7.13 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.27 (t, 1H, CH, J = 8.1 Hz, J = 8 Hz)
14		A	73	180-182 (MeOH)	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> FN <sub>7</sub> 313.34	3416, 3326, 3153, 2262, 1656	3.07-3.18 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.85 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.9 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.95-7.12 (m, 4H, CH + 2H, NH <sub>2</sub> )

Tabela 1 cd.

Nr zw.	R	Sposób syntezy	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
*15		A	76	174-176 (MeOH)	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> 204.24	3459, 3339, 3200, 2255, 1660	1.95-1.96 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.5-3.52 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.58-3.6 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.63 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.3 (s, 2H, NH <sub>2</sub> )
**16		A	50	236-237 (butanol)	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>7</sub> 245.29	3350, 3315, 3200, 2255, 1650	
17		B	59	263-265 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub> 340.35	3455, 3332, 3196, 2259, 1630	3.56-3.61 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.88 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.93 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7.06 (d, 2H, CH, J = 9.5 Hz), 7.17 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 8.1 (d, 2H, CH, J = 9.4 Hz)
*18		B	63	278-280 (MeOH)	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>7</sub> 245.29	3503, 3120, 2977, 2257, 1642	1.21-1.28 (m, 6H, CH <sub>3</sub> ), 2.38-2.43 (m, 1H, CH), 2.59-2.67 (m, 1H, CH), 3.25-3.3 (m, 1H, CH), 3.69 (m, 3H, CH + CH <sub>2</sub> ), 4.22 (s, 1H, CH), 5.41 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> )
*19		B	16	178-180 (MeOH)	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> O 220.23	3369, 3223, 2924, 2259, 1646	3.64 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.73 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.8-3.87 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 5.2 (s, 2H, NH <sub>2</sub> )

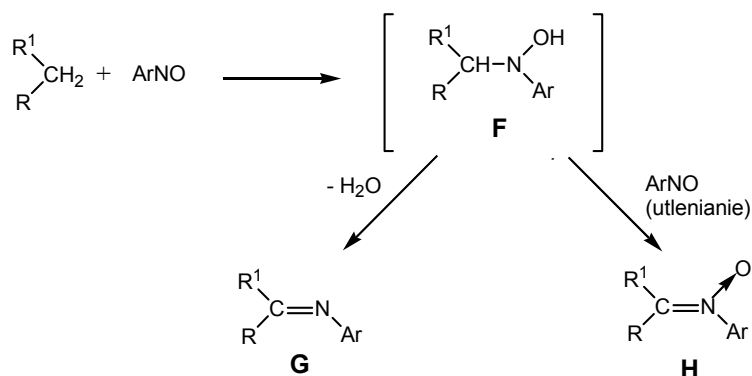
\*\*Właściwości fizykochemiczne i spektralne związku (16) są zgodne z piśmiennictwem [ 74 ].

Widma <sup>1</sup>H NMR wykonano w DMSO-d<sub>6</sub> lub CDCl<sub>3</sub>\*

#### 4.1.2. Reakcje triazyn-2-ylo-acetonitryli (11–19) z *N,N*-dimetylo-4-nitrozoaniliną. Synteza 2-(4,6-diamino-1,3,5-triazyn-2-ylo)-2-[[4-(dimetyloamino)fenylo]imino]acetonitryli (20–28)

Reakcje kondensacji związków posiadających ugrupowanie metylenowe (C-H kwasu) z aromatycznymi związkami nitrozowymi po raz pierwszy przeprowadzone zostały w drugiej połowie XIX wieku przez Ehrlicha i Sachsa [80]. W kolejnych latach Barrow i Thorneycroft dowiedli, iż tego typu reakcje – w zależności od struktury substratów – mogą prowadzić do wytworzenia produktów o strukturze imin **G** lub nitronów **H** [81]:

Schemat 2



Reakcja przebiega za pośrednictwem adduktu **F**, który wskutek utraty cząsteczki wody tworzy iminę **G**, lub ulega utlenieniu przez drugą cząsteczkę związku nitrozowego, co prowadzi do powstania nitronu **H** (Schemat 2).

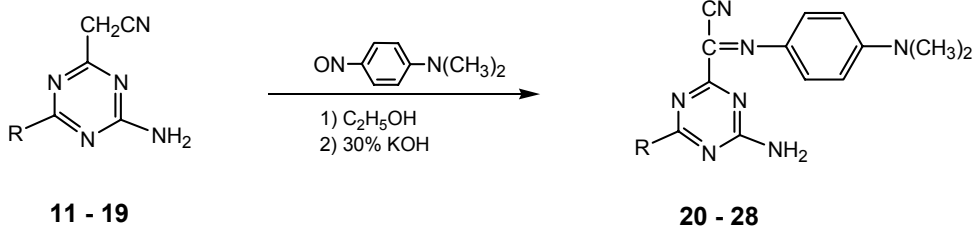
Związki o strukturze nitronów otrzymano działając *N,N*-dimetylo-4-nitrozoaniliną na fenyloacetonitryl w obecności zasady [81].

W niniejszej pracy reakcje pochodnych triazyny **11** – **19**, posiadających aktywne ugrupowanie metylenowe w położeniu 2 z *N,N*-dimetylo-4-nitrozoaniliną prowadzono w środowisku wrzącego alkoholu etylowego w obecności 30% wodnego roztworu KOH, zgodnie ze Schematem 3.

Otrzymane tym sposobem pożądane pochodne iminoacetonitrylu **20** – **28** były jedynymi produktami tej reakcji i powstawały z wydajnością 36 - 89%.

Strukturę iminoacetonitryli określono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz analizę spektroskopową IR, NMR i MS.

## Schemat 3



Zw.	R	Zw.	R
11, 20		16, 25	
12, 21		17, 26	
13, 22		18, 27	
14, 23		19, 28	
15, 24			

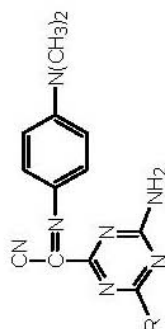
Przykładowo, w widmie IR związku **20** znajdujemy pasma absorpcji grupy  $\text{NH}_2$  przy  $3317$  i  $3180\text{ cm}^{-1}$  oraz grupy  $\text{CN}$  przy  $2204\text{ cm}^{-1}$ . Przesunięcie położenia pasma absorpcji grupy  $\text{CN}$  w kierunku niższych liczb falowych w porównaniu z substratem ( $\nu_{\text{CN}} = 2259\text{ cm}^{-1}$ ) potwierdza fakt sprzężenia grupy nitylowej z wiązaniem podwójnym  $\text{C}=\text{N}$  ugrupowania iminowego. To ostatnie w widmie IR manifestuje się obecnością pasma absorpcji przy  $1614\text{ cm}^{-1}$ .

W widmie  $^1\text{H NMR}$  tego związku występuje singlet o intensywności 6 protonów przy  $3.11\text{ ppm}$  odpowiadający protonom grup metylowych *N,N*-dimetyloaniliny, trzy multiplety przy  $3.25$ ,  $3.89$  i  $3.99\text{ ppm}$  o intensywności odpowiednio 4, 2 i 2 protonów potwierdzają obecność pierścienia piperazyny. Dwa dublety przy  $6.75$  i  $7.86\text{ ppm}$  o stałej sprzężenia  $J = 9\text{ Hz}$  wskazują na obecność pierścienia aromatycznego podstawionego w pozycjach 1 i 4, natomiast trzy multiplety przy  $6.91$  (1H),  $6.97$  (2H) oraz  $7.32$  (2H) ppm odpowiadają protonom monopodstawionego pierścienia fenylowego.

Wykonano także widmo masowe związku **20**, w którym znajdujemy pasmo jonu macierzystego  $\text{M}^+$  przy  $m/z = 427$  o intensywności 100% oraz pasma jonów fragmentacyjnych przy  $m/z = 295$  (52%) i  $132$  (22%).

Właściwości fizykochemiczne i spektroskopowe otrzymanych związków **20 – 28** przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe związków (20 – 28)



Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
*20	68	243-246 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>9</sub> 427.5	3317, 3180, 2914, 2204, 1653, 1614	3.11 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 3.25 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.89-3.99 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 5.62 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.75 (d, 2H, CH, J = 9.3 Hz), 6.91 (t, 1H, CH, J = 7.3 Hz, J = 6.8 Hz), 6.97 (d, 2H, CH, J = 7.8 Hz), 7.28-7.32 (m, 2H, CH), 7.86 (d, 2H, J = 8.8 Hz)
21	84	294-296 (DMF)	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> N <sub>9</sub> 441.53	3473, 3278, 3134, 2202, 1629, 1557	2.33 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.91 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.08 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 3.36 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.87 (d, 2H, CH, J = 9.3 Hz), 6.9-7.25 (m, 4H, CH), 7.4 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.61 (d, 2H, CH, J = 9.1 Hz)
22	36	250-254 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>9</sub> 461.76	3311, 3213, 2908, 2203, 1644, 1615	3.08 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 3.29 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.92 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 3.93 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.58-6.63 (m, 1H, CH), 6.82-7.04 (m, 4H, CH), 7.22-7.3 (m, 2H, CH), 7.62 (d, 1H, CH, J = 9.1 Hz)
23	50	236-240 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>8</sub> 431.50	3318, 3176, 2906, 2202, 1644, 1557	3.08 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 3.17 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.94 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.87 (d, 2H, J = 9.3 Hz), 6.98-7.14 (m, 4H, CH), 7.16 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.62 (d, 2H, CH, J = 9.1 Hz)
*24	65	295-299 (DMF)	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>8</sub> 336.39	3407, 3327, 3210, 2201, 1661, 1613	1.98 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.1 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 3.55 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.75 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.4 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.75 (d, 2H, CH, J = 8.3 Hz), 7.84 (d, 2H, CH, J = 6.8 Hz)

Tabela 2 cd.

Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
25	89	>350 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>9</sub> 377.44	3398, 3306, 3225, 2202, 1633, 1615	1.64 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 1.99 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.86 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.1 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 6.85 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 7.3 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.6 (d, 2H, CH, J = 8.3 Hz)
26	60	273-276 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>10</sub> O <sub>2</sub> 472.50	3348, 3135, 2908, 2201, 1633, 1599	3.06 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 3.61 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.92 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.84 (d, 2H, CH, J = 9.1 Hz), 7.06 (d, 2H, CH, J = 9.2 Hz), 7.3 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.6 (d, 2H, CH, J = 8.9 Hz), 8.08 (d, 2H, CH, J = 9 Hz)
27	79	271-274 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>9</sub> 377.44	3313, 3179, 2932, 2200, 1652, 1613	1.1-1.17 (m, 6H, CH <sub>3</sub> ), 2.29-2.43 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.04 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 3.2-3.23 (m, 1H, CH), 3.49-3.51 (m, 1H, CH), 4.13 (s, 1H, CH), 6.84 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 7.35 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.58 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz)
*28	79	239-241 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>8</sub> 352.39	3330, 3184, 2858, 2203, 1655, 1614	3.11 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 3.76 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.82 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.99 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.5 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.75 (d, 2H, CH, J = 9.3 Hz), 7.86 (d, 2H, J = 9.3 Hz)

 (20) MS (m/z): 427.2 M<sup>+</sup> (100%)

 Widma <sup>1</sup>H NMR wykonano w DMSO-d<sub>6</sub> lub CDCl<sub>3</sub>\*



#### 4.1.3. Reakcje [2,6-diamino-(1,3,5-triazyn-2-ylo)]acetonitryli z nitrozobenzenem (29–33)

Kontynuując badanie reakcji kondensacji triazyn-2-ylo-acetonitryli ze związkami nitrozowymi zastosowano dostępny w handlu nitrozobenzen. Spodziewano się, iż produkty tej reakcji będą posiadały strukturę iminoacetonitryli, a więc analogiczną do związków opisanych w poprzednim podrozdziale.

Poszukiwanie optymalnych warunków tej reakcji wykazało, iż największe wydajności czystych produktów (25 – 75%) uzyskano stosując etanolowo-wodny roztwór węgla sodowego.

Wyniki analizy elementarnej oraz szczegółowa analiza spektroskopowa struktury produktów reakcji dowiodły, iż mamy tu do czynienia ze związkami zawierającymi ugrupowanie amidowe. W widmach IR, obok szerokich pasm w zakresie 3100 – 3450 cm<sup>-1</sup> odpowiadających zasocjowanym wiązaniom N-H, znajdujemy pasma o dużej intensywności w zakresie 1686 – 1703 cm<sup>-1</sup> charakterystyczne dla obecności grupy C=O.

W widmach <sup>1</sup>H NMR tej klasy związków występują linie rezonansowe w zakresie 10.12 – 10.28 ppm silnie odsłanianych protonów grupy amidowej CON-H.

W widmie heterokorelacyjnym HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) związku **31** proton grupy amidowej nie wykazuje korelacji z żadnym z obserwowanych pasm rezonansowych atomów węgla, co wyklucza strukturę nitronu. Natomiast w widmie HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) proton NH wykazuje silną korelację przez 3 wiązania chemiczne z atomami węgla w pozycji *orto* pierścienia fenyłowego (Widmo 1 i 2).

Charakterystyczny jest także obraz widma masowego związku **31**, gdzie obok pasm jonu molekularnego, obserwujemy piki jonów tworzących się w wyniku utraty przez jon molekularny grupy C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NOC<sup>+</sup> [82].

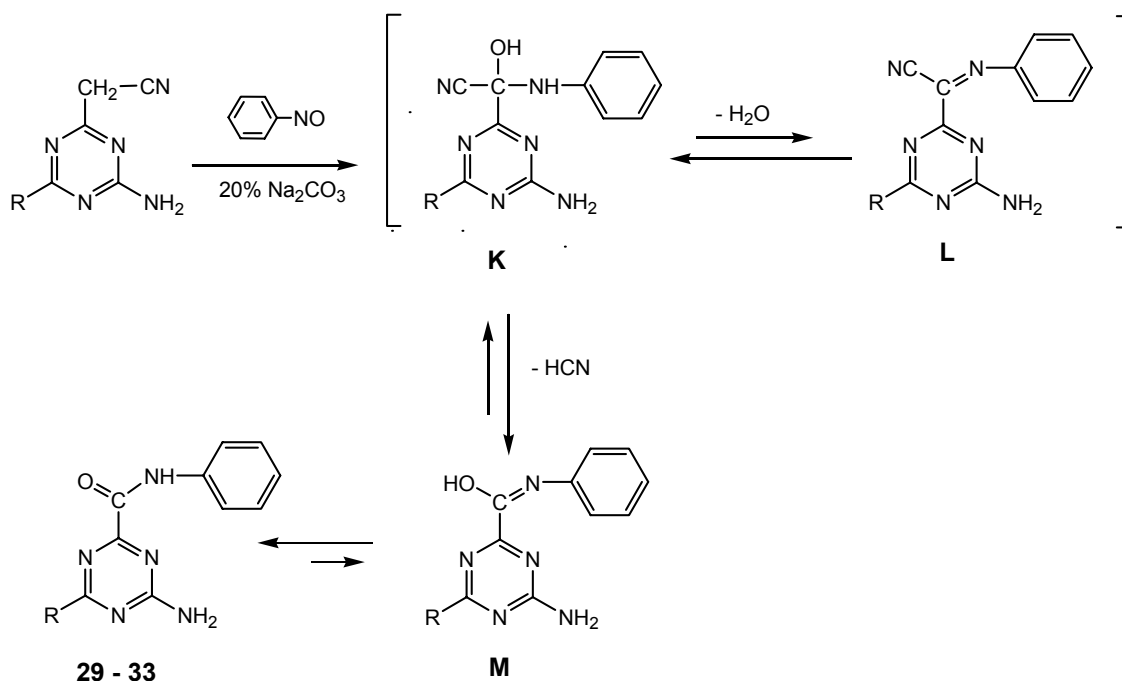
Jakkolwiek badanie mechanizmu reakcji wykraczało poza ramy niniejszej rozprawy, w celu uzasadnienia tworzenia produktów o strukturze amidów **29** – **33** zaproponowano sekwencję przedstawioną na Schemacie 4.

Pierwszy etap reakcji jest analogiczny do omówionej poprzednio kondensacji z udziałem *N,N*-dimetylnitrozoaniliny i polega na addycji grupy C-H acetonitrylu do

wiązania N=O z wytworzeniem cyjanohydryny typu **K** zawierającej grupę NH przy czwartorzędowym atomie węgla.

Połączenie tego typu jest nietrwałe i może ulec stabilizacji poprzez utratę cząsteczki wody z wytworzeniem iminoacetonitrylu **L** lub poprzez wydzielenie cząsteczki cyjanowodoru, co prowadzi do powstania kolejnego związku pośredniego **M** zawierającego ugrupowanie iminolowe. Ten ostatni związek na drodze tautomeryzacji tworzy finalny produkt o strukturze amidowej.

Schemat 4

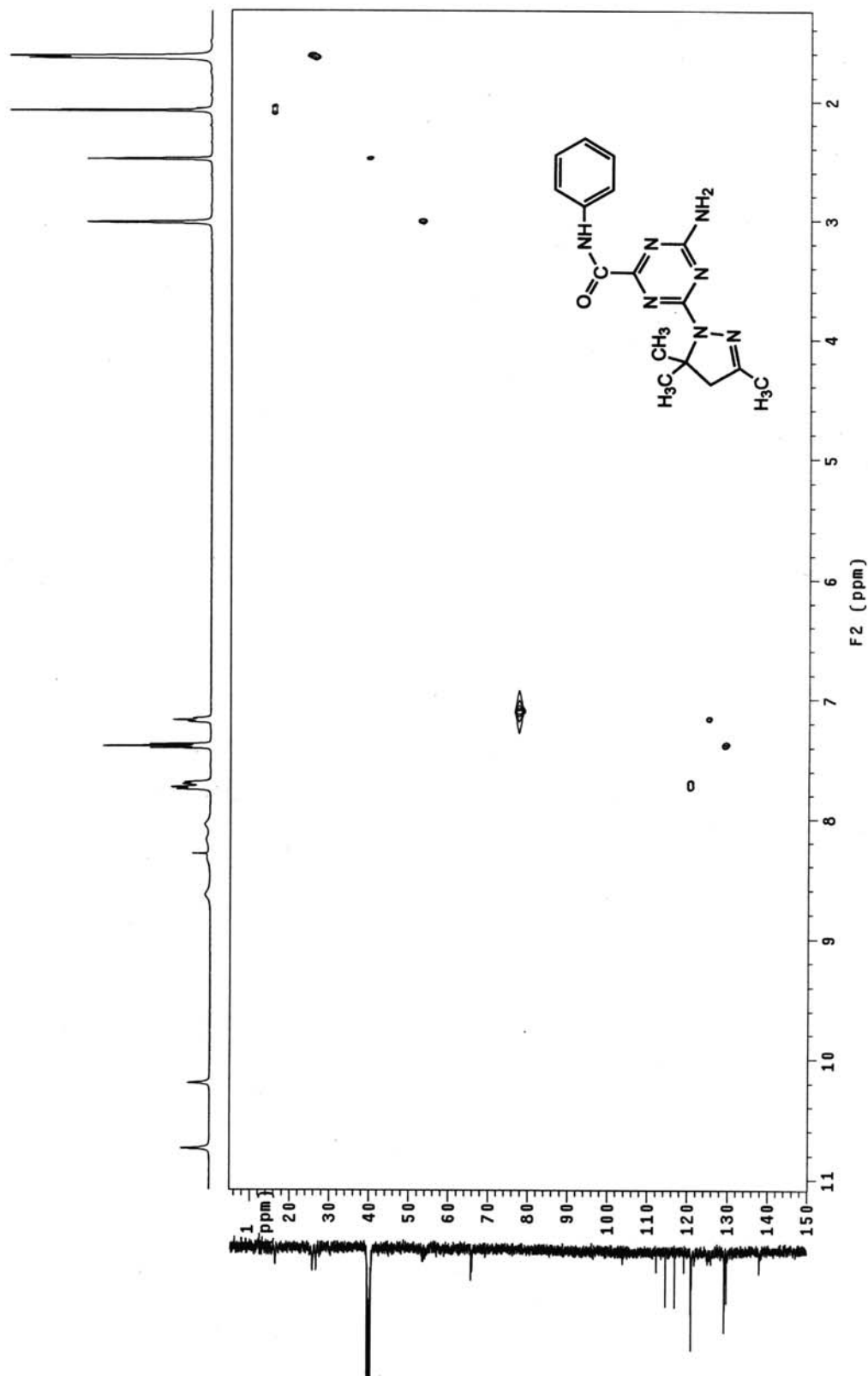


Zw.	11, 29	15, 30	16, 31	18, 32	19, 33
R					

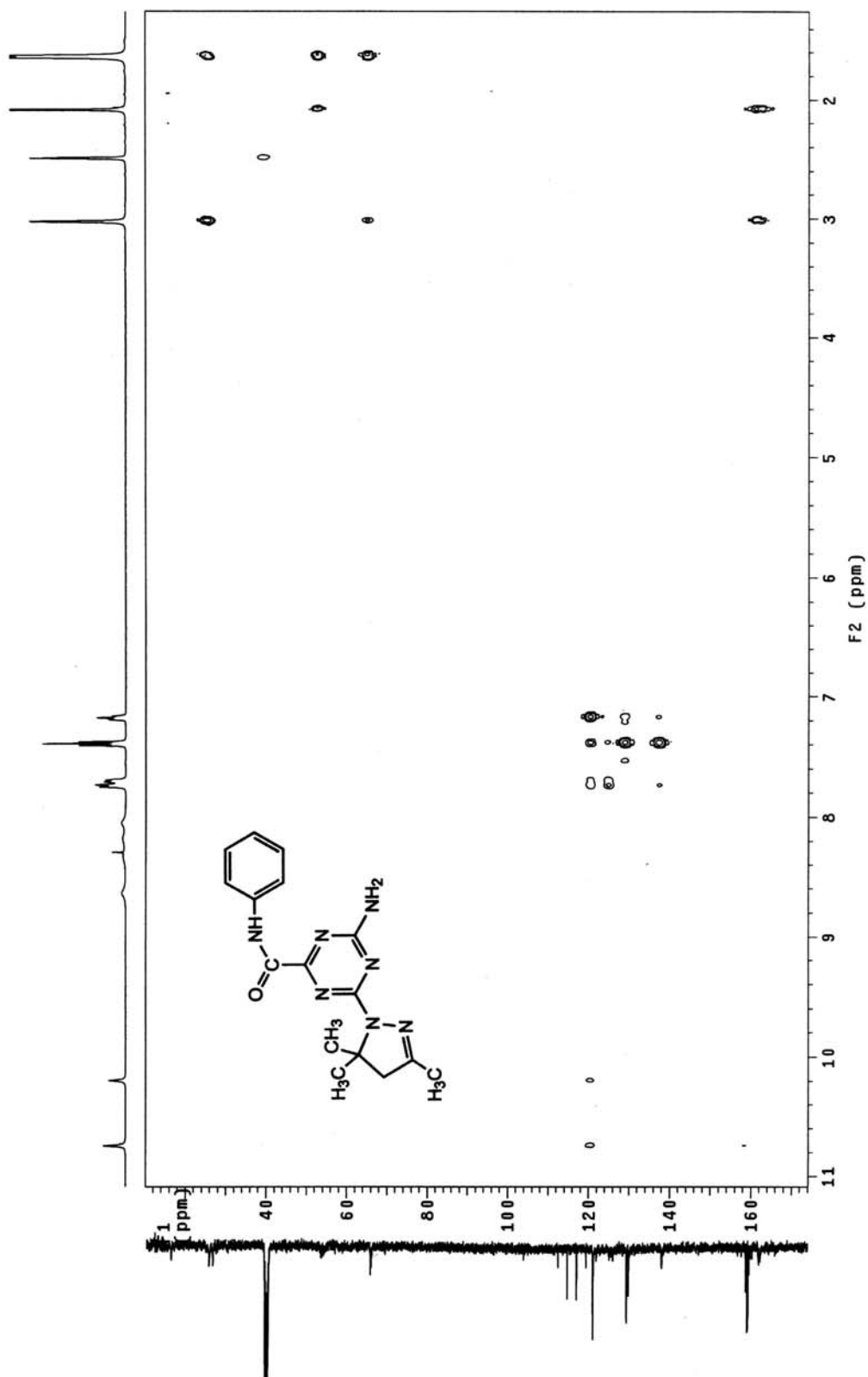
Różnica w przebiegu reakcji triazyn-2-ylo-acetonitryli ze związkami nitrozowymi dotyczy zatem procesu rozpadu adduktu **K**, którego przebieg jest zależny od efektu elektronowego (lub jego braku) wywoływanego przez podstawnik obecny przy pierścieniu fenylowym. Uprzywilejowany jest proces utraty przez związek **K** cząsteczki wody prowadzący do tworzenia iminoacetonitrylu **L** posiadającego układ sprzężonych wiązań wielokrotnych N=C-C≡N. Proces ten może być odwracalny, bowiem reakcja prowadzona jest w środowisku alkoholowo - wodnym. Proces hydrolizy inicjowany jest atakiem jonu hydroksylowego OH<sup>-</sup> na atom

węgla grupy iminowej. Obecność grupy dimetyloaminowej w pozycji *para* pierścienia fenyłowego o charakterze elektrono-donorowym obniża deficyt elektronów na atomie węgla, uniemożliwiając tym samym proces tworzenia związku pośredniego **K**. Natomiast w przypadku nitrozobenzenu równowaga przesunięta jest w kierunku tworzenia adduktu **K**, który ulega alternatywnemu procesowi polegającemu na eliminacji cząsteczki cyjanowodoru. Wytworzony na tej drodze związek pośredni **M** ulega tautomerii dając w efekcie trwały produkt o strukturze amidu.

Właściwości fizykochemiczne i spektroskopowe otrzymanych związków **29 – 33** przedstawiono w Tabeli 3.

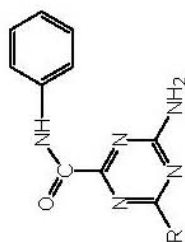


Widmo 1. Widmo 2D-HSQC związku **31** w  $\text{DMSO-d}_6$  + TFA.



Widmo 2. Widmo 2D-HMBC związku **31** w DMSO-d<sub>6</sub> + TFA.

Tabela 3. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe związków (29 – 33)



Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
29	36	237-240 (THF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>7</sub> O 375.43	3490, 3330, 3139, 1686, 1636, 1515	3.2 (t, 4H, CH <sub>2</sub> , J = 5.1 Hz, J = 4.8 Hz), 3.92-3.99 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.81 (t, 1H, CH, J = 7.3 Hz, J = 7 Hz), 6.99 (d, 2H, CH, J = 7.7 Hz), 7.13 (t, 1H, CH, J = 7.3 Hz, J = 7.7 Hz), 7.22-7.38 (m, 6H, CH + NH <sub>2</sub> ), 7.76 (d, 2H, CH, J = 7.7 Hz), 10.27 (s, 1H, NH)
30	39	>350 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O 284.32	3322, 3162, 2977, 1655, 1540, 1499	1.9 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.43-3.59 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.12 (t, 1H, CH, J = 7.3 Hz, J = 7.3 Hz), 7.17 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.36 (t, 2H, CH, J = 7.8 Hz, J = 7.3 Hz), 7.54 (d, 2H, CH, J = 7.8 Hz), 10.24 (s, 1H, NH)
31	26	282-283 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O 325.37	3335, 3226, 2919, 1693, 1637, 1600	1.59 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 1.98 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.85 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7.1 (t, 1H, J = 7.3 Hz, J = 7.3 Hz), 7.2 (szer. s, 1H, NH <sub>2</sub> ), 7.35 (t, 2H, CH, J = 7.8 Hz, J = 7.8 Hz), 7.45 (szer. s, 1H, NH <sub>2</sub> ), 7.71 (d, 2H, CH, J = 7.8 Hz), 10.12 (s, 1H, NH)
32	72	236-239 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O 325.37	3504, 3147, 2977, 1691, 1638, 1559	1.1-1.17 (m, 6H, CH <sub>3</sub> ), 2.3-2.44 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.23 (m, 1H, CH), 3.56 (s, 1H, CH), 4.15 (s, 1H, CH), 7.12 (t, 1H, CH, J = 7.3 Hz), 7.34-7.36 (m, 4H, CH + NH <sub>2</sub> ), 7.74 (d, 2H, CH, J = 7.8 Hz), 10.28 (s, 1H, NH)

Tabela 3 cd.

Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
33	27	>350 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> 300.32	3496, 3334, 2954, 2256, 1702, 1626	3.63 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.7-3.83 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 7.11 (t, 1H, CH, J = 7.32 Hz, J = 7.3 Hz), 7.2 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.34 (t, 2H, CH, J = 7.8 Hz, J = 7.3 Hz), 7.73 (d, 2H, CH, J = 8.3 Hz), 10.27 (s, 1H, NH)

(31) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub> + TFA) δ ppm: 12.49, 25.85; 26.80; 39.59; 39.76; 39.92; 65.83; 66.09; 121.10; 129.37; 129.85; 138.01; 161.91

MS (m/z): 325.1 M<sup>+</sup> (72.22%)

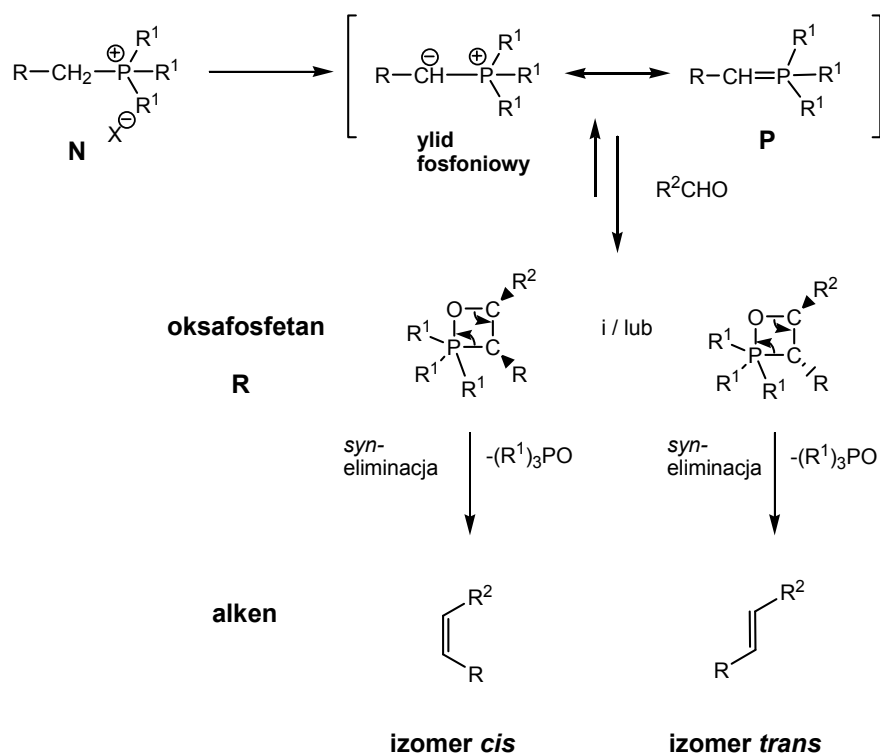
(33) MS (m/z): 300.1 M<sup>+</sup> (100%)

Widma <sup>1</sup>H NMR wykonano w DMSO-d<sub>6</sub>.

## 4.2. Synteza pochodnych 2-alkenylo-4,6-diamino-1,3,5-triazyny

Pośród szeregu metod syntezy chemicznej, umożliwiających tworzenie wiązania podwójnego C=C, szczególną pozycję i uniwersalny charakter posiada reakcja Wittiga [83, 84]. Umożliwia ona transformację alkilowych chlorowcopochodnych do alkenów na drodze reakcji wytworzonych uprzednio soli fosfoniowych ze związkami karbonyłowymi w obecności zasad. Mechanizm reakcji Wittiga oraz stereochemia produktów były przedmiotem wielu badań, a jej przebieg obrazuje Schemat 5.

Schemat 5

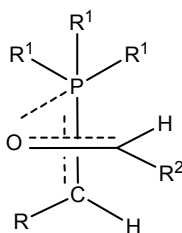


Reakcja chlorowcopochodnej z trifenylfosfiną prowadzi do wytworzenia soli fosfoniowej **N**, która poddana działaniu zasady tworzy związek **P** o charakterze ylidu fosfoniowego, w którym nakładanie się orbitalu *p* atomu węgla z jednym z orbitali *d* atomu fosforu prowadzi do wytworzenia wiązania podwójnego C=P. W tej formie ylid **P** ulega reakcji cykloaddycji [2 + 2] ze związkiem karbonyłowymi, której produktem jest oksafosfetan **R**. Proces kończy *syn*-eliminacja tj. równoczesny proces rozpadu oksafosfetanu do tlenku trifenylfosfiny i alkenu.



Produktem reakcji ylidu fosfoniowego (alkylidenu fosforanu) z aldehydami lub ketonami może być mieszanina alkenów o konfiguracji *E* i *Z*. Wykazano, iż ylidy stabilizowane przez rezonans dają produkty o konfiguracji *E*, natomiast ylidy niestabilizowane zazwyczaj tworzą alkeny o konfiguracji *Z*. Stereochemia alkenów jest uwarunkowana stereochemiczną budową oksafosfetanu **R**, bowiem izomer *cis* rozpada się z wytworzeniem alkenu *Z*, natomiast izomer *trans* daje w efekcie alken o konfiguracji *E*.

W przypadku ylidów fosfoniowych niestabilizowanych proces tworzenia oksafosfetanu jest nieodwracalny. Stąd też stosunek produktów *E* - *Z* jest odzwierciedleniem stereoselektywności pierwszego etapu reakcji zachodzącej pod kontrolą kinetyczną. Preferencja dla tworzenia *cis*-oksfosfetanu jest rezultatem minimalnych oddziaływań sterycznych w stanie przejściowym, w którym uczestniczą oba reagenty (ylid i związek karbonylowy) ułożone prostopadle względem siebie (Rysunek 8).



Rysunek 8. Stan przejściowy tworzenia oksafosfetanu.

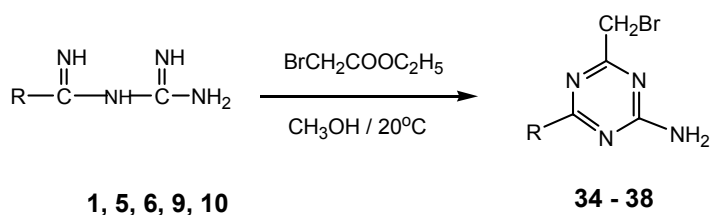
W przypadku ylidów stabilizowanych przez sprzężenie z grupą elektronoakceptorową **R**, tworzenie oksafosfetanu jest procesem odwracalnym z uwagi na większą trwałość ylidu. Dlatego też stosunek stereoizomerów *E* - *Z* jest odzwierciedleniem trwałości termodynamicznej diastereoizomerycznych oksafosfetanów. Z uwagi na większe oddziaływanie steryczne w *cis*-oksfosfetanie, gdzie podstawniki **R** i **R**<sup>2</sup> znajdują się po tej samej stronie pierścienia heterocyklicznego, ten diastereoizomer jest mniej trwały i szybciej ulega rozpadowi do substratów niż do pożądanego alkenu. Rekombinacja substratów prowadzi w efekcie do wytworzenia bardziej trwałego termodynamicznie *trans*-oksfosfetanu, który w procesie *syn*-eliminacji tworzy alken o konfiguracji *E*.

W kolejnych podrozdziałach omówiono syntezy pochodnych 6-bromometylo-1,3,5-triazyny, soli fosfoniowych oraz pożądaných 2-alkenylo-1,3,5-triazyn.

#### 4.2.1. Otrzymywanie pochodnych 2,4-diamino-6-bromometylo-1,3,5-triazyny (34–38)

Pożądane związki bromometylowe **34** – **38** otrzymano na drodze reakcji odpowiednich biguanidów z bromooctanem etylu w roztworze bezwodnego alkoholu metylowego w temperaturze pokojowej zgodnie ze Schematem 6:

Schemat 6

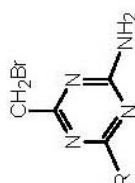


Zw.	1, 34	5, 35	6, 36	9, 37	10, 38
R					

Związek **36** był wcześniej opisany w literaturze chemicznej [73], natomiast pochodne **34**, **35**, **37** i **38** są związkami nowo otrzymanymi.

Właściwości fizykochemiczne i spektroskopowe pochodnych **34** - **38** przedstawiono w Tabeli 4. Cechą wspólną tych związków jest obecność w widmach  $^1\text{H}$  NMR linii rezonansowych przy 4.1 ppm odpowiadających protonom grupy metylenowej  $\text{CH}_2\text{-Br}$ .

Tabela 4. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe związków (34 – 38)



Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
34	51	184-186 (EtOH)	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> BrN <sub>6</sub> 349.24	3472, 3312, 3152, 2856, 1660, 1520	3.13-3.18 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.82-3.38 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.14 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.77-7.27 (m, 5H, CH), 6.99 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> )
35	57	>350 (EtOH)	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> BrN <sub>5</sub> 258.13	3472, 3312, 3136, 1664, 1503	1.86-1.95 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.36-3.43 (m, 4H, CH <sub>2</sub> , J = 6.75 Hz), 4.09 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.9 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> )
**36	48	265-269 (EtOH)	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> BrN <sub>6</sub> 299.18	3323, 3216, 2963, 1657, 1535	
*37	49	163-167 (EtOH)	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> BrN <sub>5</sub> O 274.0	3472, 3312, 3120, 2848, 1648, 1584	3.7-3.9 (m, 8H, CH <sub>2</sub> ), 4.1 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.3 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> )
38	49	122-125 (EtOH)	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> BrN <sub>5</sub> 294.16	3335, 3243, 3163, 1656, 1520, 1440	3.39 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.09 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7.06 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.19-7.43 (m, 5H, CH)

\*\*Właściwości fizykochemiczne i spektralne związku (36) są zgodne z piśmiennictwem [73].

Widma <sup>1</sup>H NMR wykonano w DMSO-d<sub>6</sub> i CDCl<sub>3</sub>\*.

## Synteza bromków [(4,6-diamino-triazyn-2-yl)-metylo]trifenilo-fosfoniowych (soli fosfoniowych) (39–42)

Oczekiwane sole fosfoniowe **39** – **42** otrzymano na drodze reakcji chlorowcopochodnych **34** – **37** z trifenilofosfiną w środowisku wrzącego dioksanu [85]. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej produkty uległy wytrąceniu w formie bezpostaciowych bezbarwnych kryształów. Przebieg reakcji obrazuje Schemat 7:

Schemat 7



Zw.	34, 39	35, 40	36, 41	37, 42
R				

Strukturę produktów potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz widma IR. Właściwości fizykochemiczne i spektroskopowe otrzymanych związków **39** – **42** przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe IR związków (39 – 42)



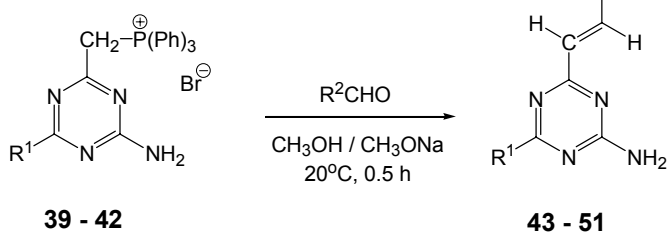
Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]
39	80	157-160	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> BrN <sub>6</sub> P 611.51	3324, 3057, 2806, 1658, 1567, 1438, 1335, 1107, 862, 772, 692, 515
40	94	180-184	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> BrN <sub>6</sub> P 549.43	3399, 3057, 2847, 1660, 1543, 1437, 1335, 1107, 774, 719, 692, 518
41	76	104-108	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> BrN <sub>5</sub> P 520.40	3337, 2965, 2870, 1645, 1558, 1437, 1340, 1107, 855, 719, 690, 513
42	64	238-242	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> BrN <sub>5</sub> PO 536.40	3463, 3248, 3131, 2848, 1618, 1576, 1437, 1110, 995, 853, 756, 691, 515

#### 4.2.2. Synteza pochodnych 2-alkenylo-4,6-diamino-1,3,5-triazyny (43–51) na drodze reakcji Wittiga

Reakcje Wittiga zazwyczaj prowadzi się w środowisku rozpuszczalnika aprotowego i butylolitu jako zasady generującej ylid fosfoniowy. W przypadku soli fosfoniowych zawierających ugrupowanie elektrono-akceptorowe w sąsiedztwie grupy metylenowej  $-\text{CH}_2-$ , reakcję można prowadzić w środowisku alkoholu w obecności odpowiedniego alkoholanu sodu.

Stwierdzono, iż sole fosfoniowe triazyny **39** – **42** reagują z aldehydami w metanolemym roztworze metanolanu sodu w temperaturze pokojowej z wytworzeniem pochodnych 2-alkenylo-1,3,5-triazyny **43** – **51**. Przebieg tej reakcji przedstawia Schemat 8:

Schemat 8



Zw.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
39, 43		
40, 44		
41, 45		
39, 46		
39, 47		
39, 48		
42, 49		
41, 50		
40, 51		

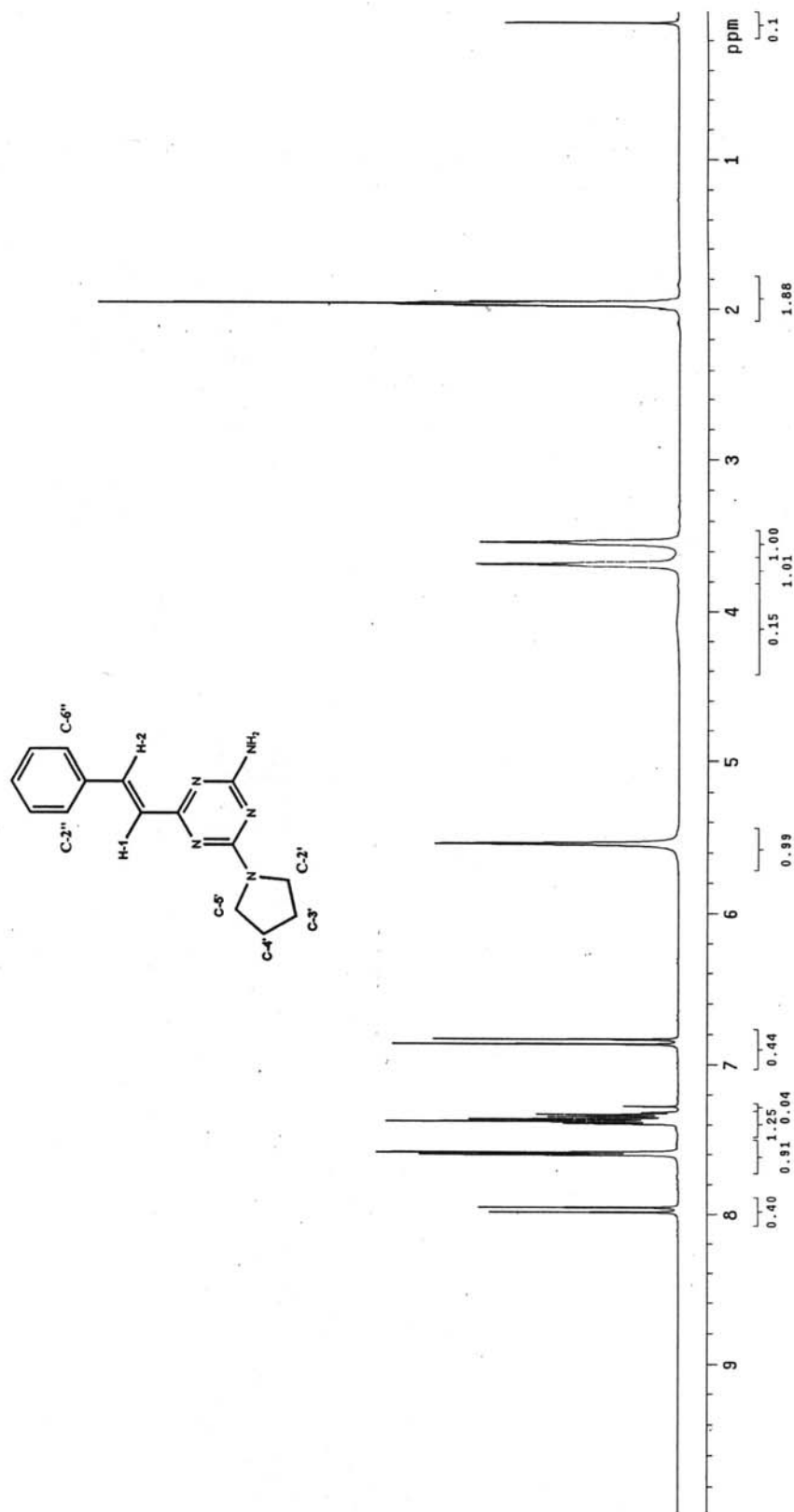
Strukturę otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz analizę widm IR oraz 1D i 2D NMR. Pełen zakres badań spektroskopowych wykonano dla związku **44** zawierającego pierścień pirolidyny w

pozycji 6 1,3,5-triazyny oraz pierścień fenyłowy przy alkenyłowym atomie węgla ( $R^2 = C_6H_5$ ).

W widmie IR związku **44** występują 2 pasma absorpcji potwierdzające obecność grupy  $NH_2$  przy 3329 i 3171  $cm^{-1}$ . W zakresie 1600 – 1700  $cm^{-1}$  znajdujemy 2 pasma absorpcyjne przy 1642 i 1665  $cm^{-1}$ . Pierwsze z nich można przypisać wiązaniu  $C=N$  pierścienia triazyny, natomiast drugie prawdopodobnie odpowiada spolaryzowanemu wiązaniu alkenyłowemu  $C=C$ . Takie założenie uzasadnia fakt, iż w widmach IR substratów (soli fosfoniowych) w zakresie 1600 – 1700  $cm^{-1}$  występuje tylko 1 pasmo absorpcji charakterystyczne dla wiązania  $C=N$  triazyny.

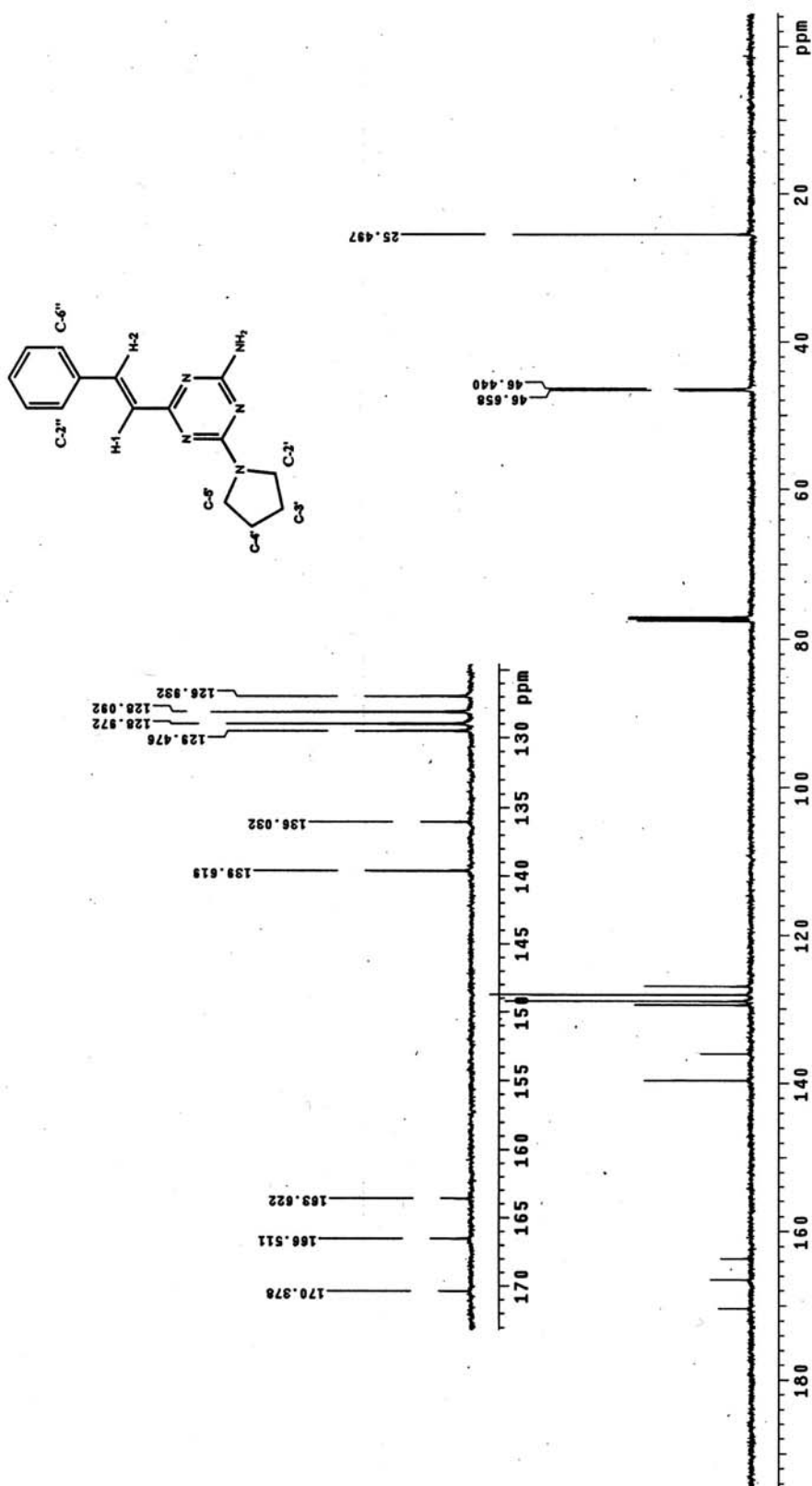
Widmo  $^1H$  NMR związku **44** (Widmo 3) potwierdza strukturę szkieletu węglowodorowego cząsteczki. W zakresie alifatycznym widma znajdujemy 3 grupy linii rezonansowych z maksimum przy 1.96 ppm (4H), 3.54 ppm (2H) i 3.68 ppm (2H), które odpowiadają protonom grup  $CH_2$  piperolidyny odpowiednio w pozycjach 3' i 4' (4H), 2' (2H) oraz 5' (2H). Nierównocенność protonów w pozycjach 2' i 5' pierścienia heterocyklicznego potwierdza obecność w widmie  $^{13}C$  NMR 2 sygnałów przy 46.44 i 46.66 ppm (Widmo 4).

W zakresie aromatycznym widma  $^1H$  NMR związku **44** znajdujemy multiplety odpowiadające 5 protonom pierścienia fenyłowego w zakresie 7.3 – 7.6 ppm oraz dwa dublety przy 6.88 i 8.04 ppm o intensywności 1 protonu każdy, potwierdzające obecność ugrupowania alkenyłowego. Wartość stałej sprzężenia  $J = 16$  Hz wskazuje, iż mamy do czynienia z izomerem *E* alkenu.

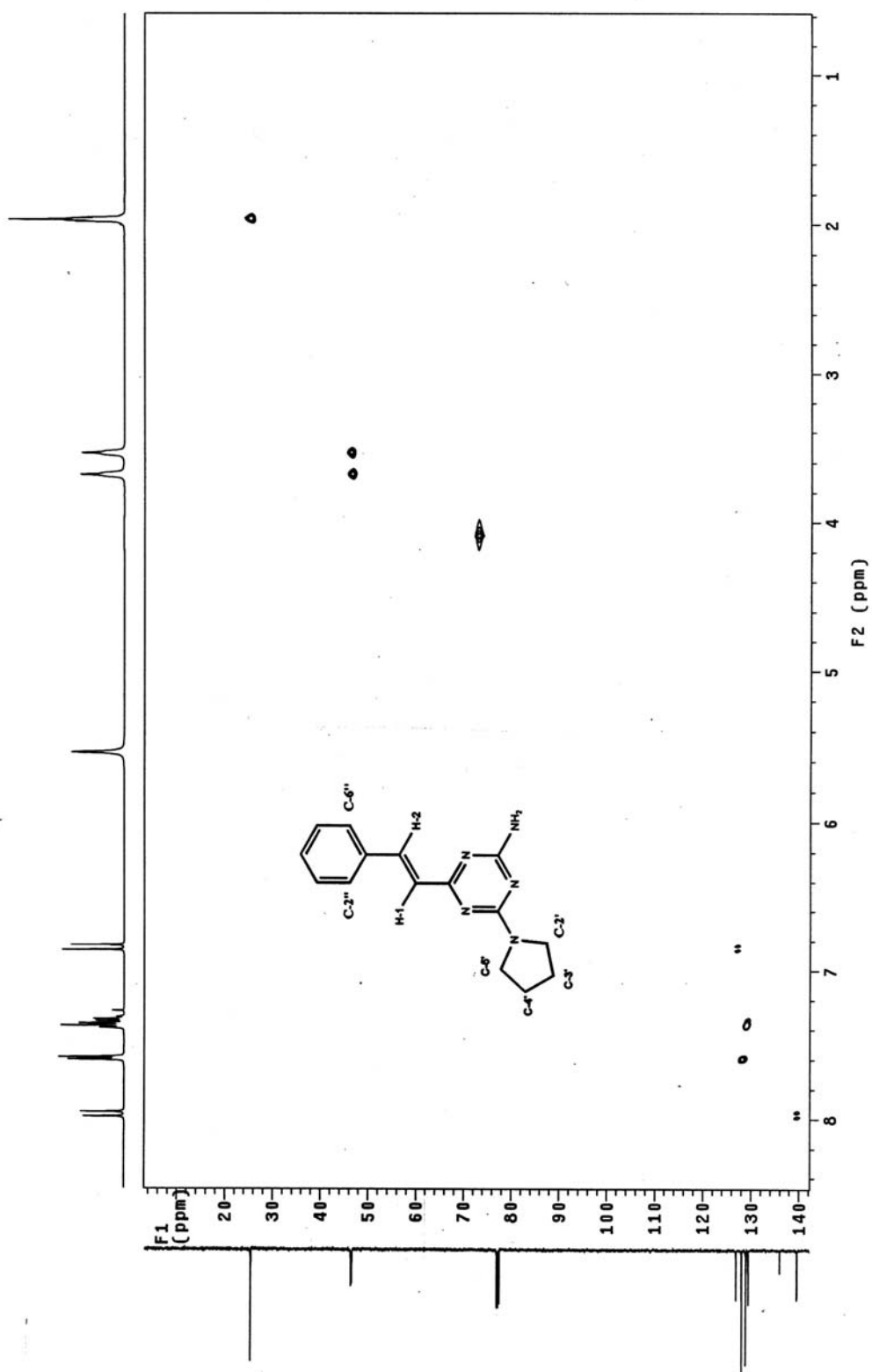


Widmo <sup>1</sup>H NMR związku 44 w CDCl<sub>3</sub>.

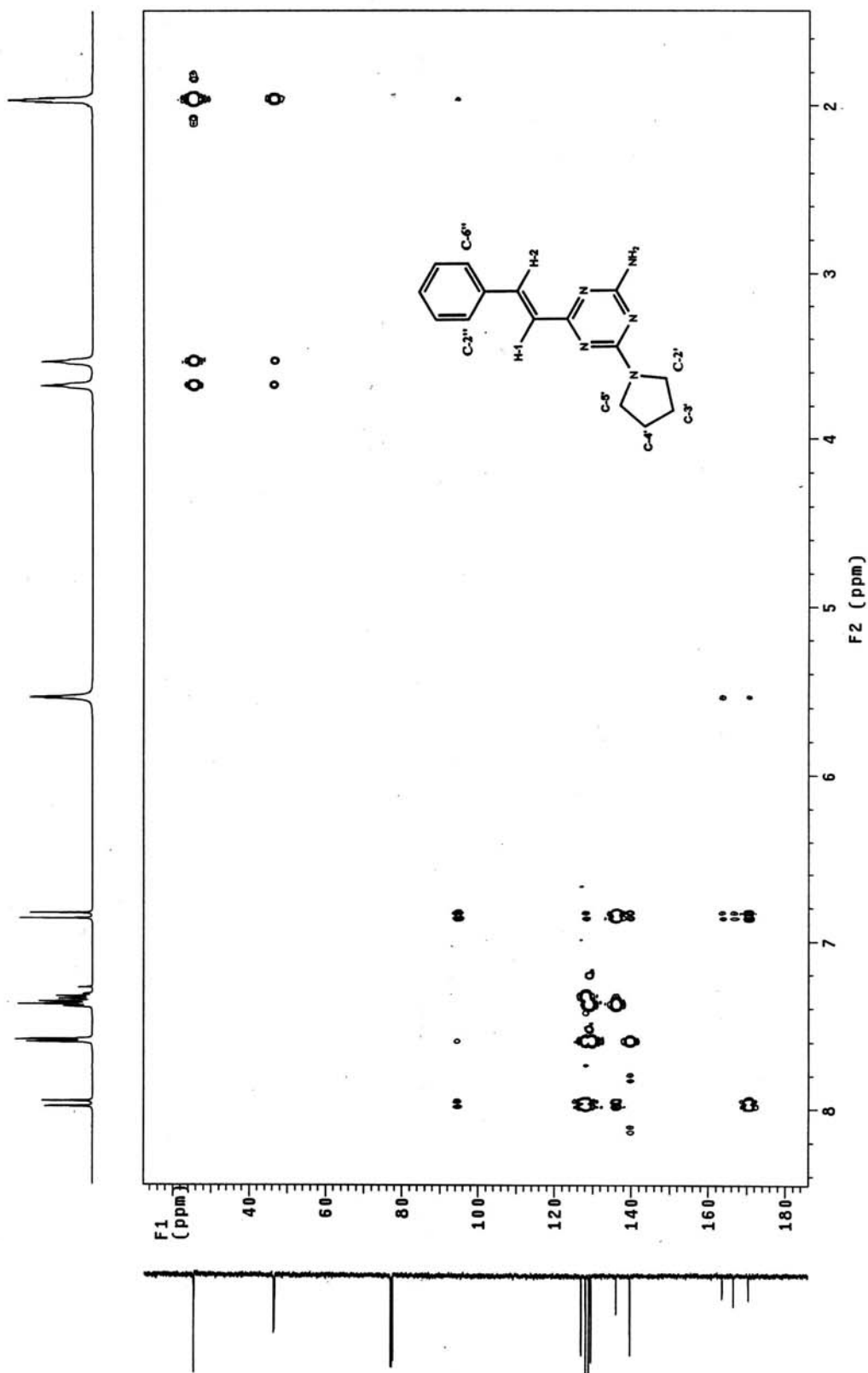




Widmo 4. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR związku 44 w  $\text{CDCl}_3$ .



Widmo 5. Widmo HSQC związku **44** w  $\text{CDCl}_3$ .



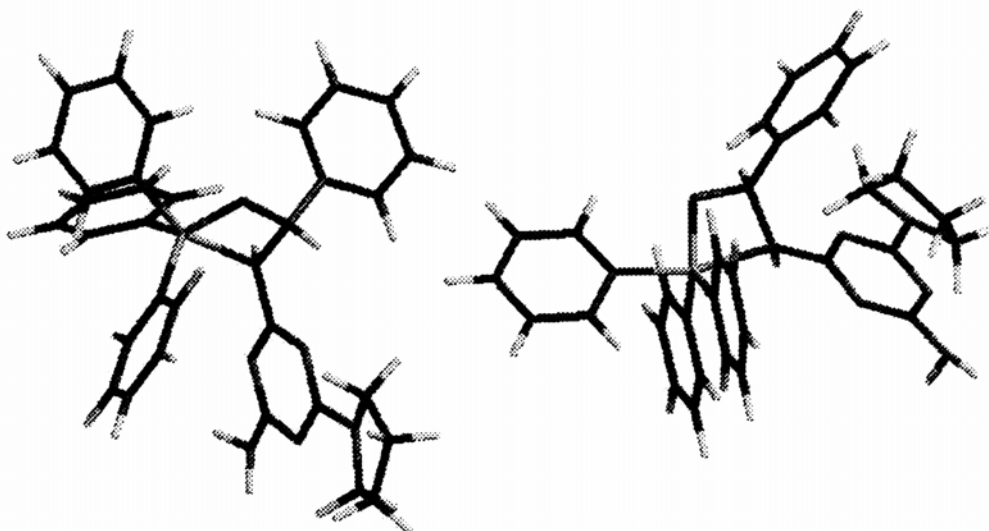
Widmo 6. Widmo HMBC związku 44 w CDCl<sub>3</sub>.

Jakkolwiek przedstawiona powyżej analiza widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR potwierdza strukturę badanego związku **44**, rozstrzygnięcia wymaga przyporządkowanie poszczególnych sygnałów protonom H-1 i H-2 ugrupowania alkenylowego. W tym celu wykonano widma heterokorelacyjne HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) i HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Widmo HSQC (Widmo 5) wskazuje, iż proton występujący w postaci dubletu przy 6.88 ppm połączony jest z atomem węgla, którego sygnał w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR występuje przy 128 ppm, natomiast proton obecny w postaci dubletu przy 8.04 ppm koreluje z atomem węgla przy 139.6 ppm (Widmo 4).

Analiza korelacji proton-węgiel obserwowanych w widmie HMBC (Widmo 6) potwierdza, iż oba protony H-1 i H-2 znajdują się w odległości 2 – 3 wiązań chemicznych od atomu węgla C-2 pierścienia triazyny (170.3 ppm) oraz czwartorzędowego atomu węgla pierścienia fenyloвого (136.0 ppm). Rozstrzygającą tę kwestię jest korelacja protonu przy 8.04 ppm z sygnałem atomów węgla C-2'' i C-6'' pierścienia fenyloвого, które dzieli odległość 3 wiązań chemicznych. Stąd wniosek, że sygnał protonu przy 8.04 ppm odpowiada protonowi H-2, natomiast dublet 6.88 ppm pochodzi od protonu oznaczonego jako H-1.

Stereoselektywność przebiegu reakcji Wittiga wskazuje, iż produkt pośredni o strukturze oksafosfetanu **R** posiada konfigurację *trans*. Stereoizomer *trans* powinien więc być trwalszy termodynamicznie od izomeru *cis*. Potwierdzenia tego faktu próbowano poszukiwać na drodze komputerowego modelowania molekularnego przy zastosowaniu programu SPARTAN, wersja 5.0 zainstalowanego na stacji roboczej Silicon Graphics 02.

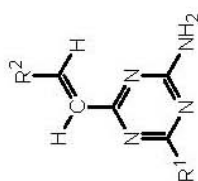
W tym celu struktury obu stereoizomerów *cis* i *trans* oksafosfetanu **R** poddano optymalizacji metodą półempiryczną PM3 (Rysunek 9). Obliczone ciepło tworzenia  $\Delta H_f$  izomeru *trans* wynosi 123.4 kcal/mol ( $\mu = 3.97$  Debye), a izomeru *cis* 126.8 kcal/mol ( $\mu = 4.02$  Debye), co potwierdza większą trwałość tego pierwszego. Zbliżone wartości momentów dipolowych obu cząsteczek nie stwarzają preferencji do tworzenia któregoś z izomerów w środowisku polarnym, jakim jest metanol.



Rysunek 9. Struktura oksafosfetanu *trans* (po lewej) oraz *cis* (po prawej) zoptymalizowana metodą semiempiryczną PM3.

Właściwości fizykochemiczne i spektroskopowe otrzymanych związków **43 – 51** przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe związków (43 – 51)



Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
*43	46	139-143 (AcCN)	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> 358.44	3318, 3175, 2921, 2828, 1637, 1527, 1446, 1392, 1328	3.26 (t, 4H, CH <sub>2</sub> , J = 5.1 Hz), 4.07 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 5.49 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.82-7.0 (m, 4H, CH), 7.31-7.45 (m, 5H, CH), 7.6-7.65 (m, 2H, CH), 8.05 (d, 1H, CH, J = 16 Hz)
*44	66	180-183 (AcCN)	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> 267.33	3329, 3171, 2971, 2870, 1665, 1642, 1533, 1451, 1340	1.94-2.07 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.55-3.72 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 5.58 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.88 (d, 1H, CH, J = 15.9 Hz), 7.3-7.46 (m, 3H, CH), 7.6-7.66 (m, 2H, CH), 8.04 (d, 1H, CH, J = 16 Hz)
*45	32	237-240 (DMF)	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> 308.38	3302, 3169, 2961, 1639, 1519, 1450, 1378, 1331, 1233	1.73 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 2.14 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.85 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.89 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.85 (d, 1H, CH, J = 15.8 Hz), 7.36-7.61 (m, 5H, CH), 7.97 (d, 1H, CH, J = 16 Hz)
46	73	258-262 (DMF)	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> 403.44	3403, 3316, 3158, 2825, 1639, 1518, 1441, 1390, 1336	3.25 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.95 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.8-7.09 (m, 6H, CH + NH <sub>2</sub> ), 7.26 (t, 2H, CH, J = 7.3 Hz, J = 8.4 Hz), 7.92-8.02 (m, 3H, CH, J = 15.9 Hz), 8.26 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz)
*47	88	215-217 (AcCN)	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub> 393.40	3516, 3400, 3148, 2820, 1612, 1555, 1440, 1348, 1288	3.28 (t, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.08 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 5.43 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.8 (d, 1H, CH, J = 3 Hz), 6.92-7.12 (m, 4H, CH), 7.33-7.41 (m, 3H, CH), 7.86 (d, 1H, CH, J = 15.5 Hz)

Tabela 6 cd.

Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
48	91	240-242 (DMF)	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> S 409.46	3443, 3307, 3159, 2821, 1625, 1544, 1512, 1436, 1356	3.2 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.94 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.8-7.04 (m, 6H, CH + NH <sub>2</sub> ), 7.26 (t, 2H, CH, J = 7.3 Hz, J = 8.3 Hz), 7.63 (d, 1H, CH, J = 4.4 Hz), 8.0 (d, 1H, CH, J = 15.7 Hz), 8.15 (d, 1H, CH, J = 4.27 Hz)
49	71	240-243 (DMF)	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S 334.35	3457, 3304, 3131, 2861, 1630, 1513, 1432, 1328, 1281	3.63 (t, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.76 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.85 (d, 1H, CH, J = 16.1 Hz), 7.07 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.6 (d, 1H, CH, J = 3.9 Hz), 8.0 (d, 1H, CH, J = 15.6 Hz), 8.13 (d, 1H, CH, J = 4 Hz)
50	76	277-280 (DMF)	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> S 359.41	3509, 3271, 3136, 2912, 1675, 1626, 1513, 1431, 1329	1.61 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 1.98 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.83 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.88 (d, 1H, CH, J = 16.1 Hz), 7.1 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.61 (d, 1H, CH, J = 4.4 Hz), 7.86 (d, 1H, CH, J = 15.6 Hz), 8.12 (d, 1H, CH, J = 4.4 Hz)
51	73	247-249 (DMF)	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S 318.35	3473, 3324, 3127, 2973, 2874, 1668, 1642, 1558, 1508	1.89 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.5 (d, 4H, CH <sub>2</sub> ), 6.85 (d, 1H, CH, J = 15.6 Hz), 7.03 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.59 (d, 1H, CH, J = 15.6 Hz), 7.95 (d, 1H, CH, J = 15.6 Hz), 8.11 (d, 1H, CH, J = 4.4 Hz)

(43) <sup>13</sup>C NMR δ ppm: 43.76, 49.95, 117.17, 120.92, 125.96, 128.51, 129.31, 129.74, 130.14, 135.95, 141.14, 151.65, 164.92, 165.99, 170.11.

(44) <sup>13</sup>C NMR δ ppm: 25.49, 46.44, 46.66, 126.93, 128.09, 128.97, 129.48, 136.03, 139.62, 163.62, 166.51, 170.38.

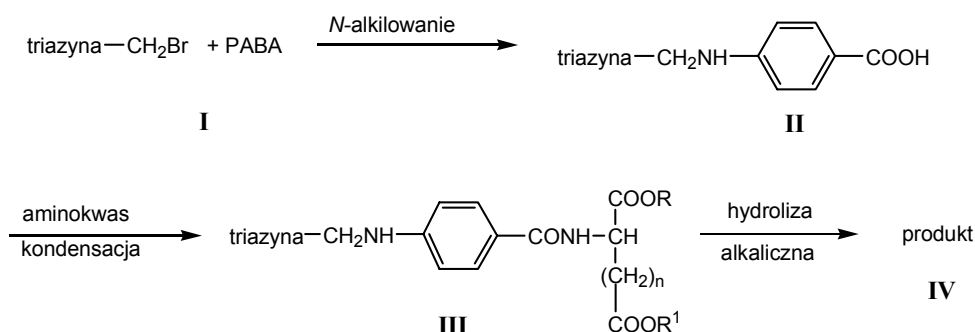
Widma NMR wykonano w DMSO-d<sub>6</sub> lub CDCl<sub>3</sub>\*.

### 4.3. Synteza analogów *Metotreksatu*

Przystępując do kilkietapowej syntezy analogów *Metotreksatu* zawierających pierścień heterocykliczny 1,3,5-triazyny należało zaplanować sekwencję reakcji prowadzących do pożądaných produktów z uwzględnieniem dostępności substratów.

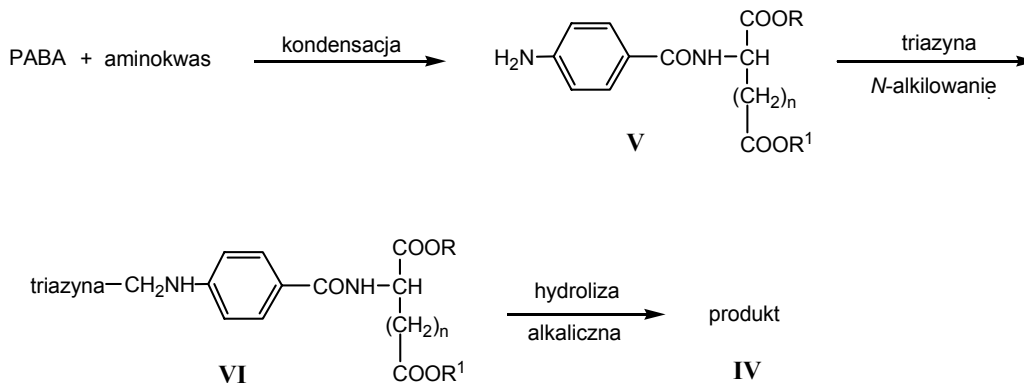
Teoretycznie istnieją dwie możliwe sekwencje reakcji umożliwiające otrzymanie antymetabolitów kwasu foliowego:

Sekwencja A:



N-Alkilowanie kwasu *p*-aminobenzoesowego (PABA) bromometylową pochodną 1,3,5-triazyny (I) prowadzi do wytworzenia pochodnej kwasowej II, która na drodze kondensacji z odpowiednim aminokwasem umożliwia otrzymanie estru III. Hydroliza alkaliczna funkcji estrowej dostarcza pożądaný analog *Metotreksatu* IV.

Sekwencja B:





W pierwszym etapie otrzymuje się pochodną estrową **V** na drodze kondensacji PABA z aminokwasem. *N*-Alkilowanie związku **V** bromometylową pochodną triazyny prowadzi do wytworzenia estru **VI**, który poddany reakcji hydrolizy alkalicznej daje finalny produkt **IV**.

W wyniku szeregu prób eksperymentalnych stwierdzono, iż synteza potencjalnych antymetabolitów kwasu foliowego zawierających pierścień 1,3,5-triazyny jest możliwa na drodze sekwencji **A**.

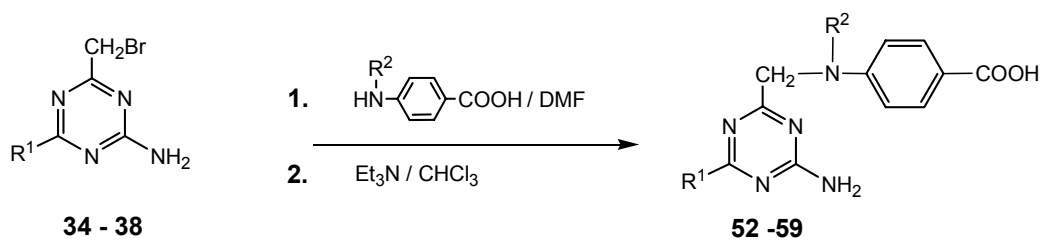
#### 4.3.1. Otrzymywanie kwasów 4-[[2,4-diamino-1,3,5-triazyn-6-ylo)metylo]amino} benzoesowych (**52–59**)

Substratami dla reakcji *N*-alkilowania kwasu *p*-aminobenzoesowego i jego pochodnej *N*-metylowej były 2-bromometylo-1,3,5-triazyny **34 – 38** (Schemat 9), z których pochodna zawierająca pierścień 3,5,5-trimetylopirazoliny **36** była wcześniej opisana [73], a związki **34**, **35**, **37** i **38** otrzymano w analogiczny sposób działaniem bromooctanu etylu na odpowiedni biguanid (Część Eksperymentalna). Reakcje chlorowcopochodnych **34 – 38** z kwasami *p*-aminobenzoesowymi prowadzono w temperaturze pokojowej w roztworze dimetyloformamidu. Otrzymane surowe bromowodorki przeprowadzono następnie w wolne zasady działaniem trietyloaminy w chloroformie [86].

Analiza widm IR tej klasy związków dostarcza dowodów na obecność grupy karboksylowej: w zakresie 2500 – 3400 cm<sup>-1</sup> występuje szerokie pasmo absorpcji zasocjowanej grupy –OH, natomiast w zakresie 1680 – 1690 cm<sup>-1</sup> znajdujemy pasmo charakterystyczne dla drgań rozciągających wiązania C=O.

W widmach <sup>1</sup>H NMR na uwagę zasługuje fakt, iż grupa CH<sub>2</sub> pochodnych PABA (**52 – 55**) występuje jako dublet w zakresie 4.2 – 4.4 ppm na skutek sprzężenia z protonem sąsiadującej grupy NH, natomiast analogiczny sygnał w widmach *N*-metylowych związków **56 – 59** występuje jako singlet.

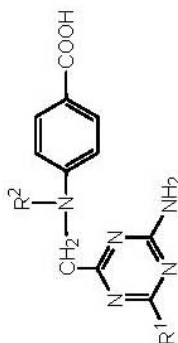
Schemat 9



Zw.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Stosunek molowy	Zw.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Stosunek molowy
34, 52		H	1 : 2	34, 56		CH <sub>3</sub>	1 : 3
35, 53		H	1 : 1.5	35, 57		CH <sub>3</sub>	1 : 2
37, 54		H	1 : 3	36, 58		CH <sub>3</sub>	1 : 3
38, 55		H	1 : 3	37, 59		CH <sub>3</sub>	1 : 3

Właściwości fizykochemiczne otrzymanych związków **52** – **59** przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe związków (52 – 59)



Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
52	61	>350 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> 405.45	3136, 1690, 1592, 1504, 1472, 1264	3.12-3.25 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.85-3.95 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.2 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 8.7 Hz), 6.66 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 6.82 (t, 1H, NH, J = 7.1 Hz, J = 7.3 Hz), 6.96-7.28 (m, 5H, CH), 7.7 (d, 2H, CH, J = 10 Hz), 7.68-7.72 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 12.0 (szer. s, 1H, COOH)
53	83	>350 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> 314.34	3363, 1684, 1664, 1504, 1456, 1296	1.85-2.0 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.2-3.4 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.0 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 5.1 Hz), 6.61 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 6.8 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.66 (d, 2H, CH, J = 8.4 Hz), 7.92 (t, 1H, NH, J = 6.9 Hz), 12.1 (szer. s, 1H, COOH)
54	80	266-270 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> 330.34	3405, 3184, 2941, 2854, 1638, 1440	3.58-3.68 (m, 8H, CH <sub>2</sub> ), 4.04 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 4.8 Hz), 6.59-6.64 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.68 (m, 1H, NH), 6.92 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.65-7.69 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 12.03 (szer. s, 1H, COOH)
55	93	236-238 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> 350.37	3360, 1680, 1640, 1572, 1476, 1392	3.37 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.01 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 5.9 Hz), 6.56 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.64 (t, 1H, NH, J = 5.9 Hz, J = 5.5 Hz), 6.94 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.19-7.37 (m, 5H, CH), 7.67 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 12.0 (szer. s, 1H, COOH)

Tabela 7 cd.

Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
56	97	>350 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> 419.48	3056, 1760, 1676, 1648, 1595, 1440	3.0-3.1 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.15 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.7-3.81 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.34 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.7 (d, 2H, CH, J = 9.1 Hz), 6.95 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.76-7.25 (m, 5H, CH), 7.71 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 12.08 (szer. s, 1H, COOH)
57	52	279-282 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> 328.37	3392, 1680, 1664, 1600, 1520, 1280	1.8-1.92 (m, 4H, CH <sub>2</sub> , J = 2.6 Hz), 3.15 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.3-3.43 (m, 4H, CH <sub>2</sub> , J = 7.1 Hz), 4.3 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.68 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.76 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.7 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 12.06 (szer. s, 1H, COOH)
58	43	265-270 (DMF-H <sub>2</sub> O)	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub> 369.41	3501, 3286, 1685, 1602, 1524, 1445	1.28 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 2.07 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.71 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.21 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.47 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.25 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.68 (d, 2H, CH, J = 9.4 Hz), 7.91 (d, 2H, CH, J = 9.4 Hz), 12.0 (szer. s, 1H, COOH)
59	98	253-257 (MeOH-H <sub>2</sub> O)	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> 344.37	3343, 3146, 2856, 1686, 1607, 1440	3.14 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.55-3.57 (m, 8H, CH <sub>2</sub> ), 4.32 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.65-6.69 (d, 2H, CH, J = 8.9 Hz), 6.89 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.68-7.72 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 12.08 (szer. s, 1H, COOH)

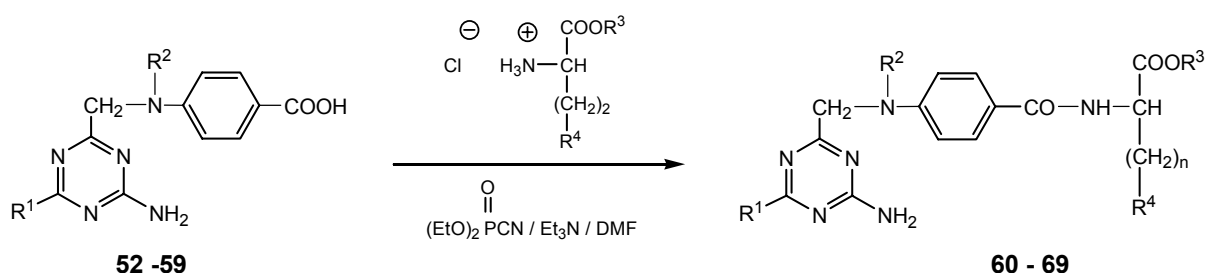
(54) <sup>13</sup>C NMR δ ppm: 44.35, 45.9, 65.65, 111.9, 118.95, 131.0, 151.76, 157.4, 160.97, 167.32, 168.42.

Widma NMR wykonano w DMSO-d<sub>6</sub>.

### 4.3.2. Reakcje kondensacji związków 52 – 59 z aminokwasami

Znanych jest szereg metod kondensacji kwasów karboksylowych z aminami prowadzących do wytworzenia wiązania peptydowego CO-NH. Przegląd piśmiennictwa dotyczącego syntezy analogów kwasu foliowego wskazuje, iż w zależności od rodzaju użytych substratów, powyższa reakcja może być prowadzona przy użyciu chlorków kwasowych [24, 87], lub kwasów karboksylowych w obecności czynników kondensujących, takich jak: heksafluorofosforan(benzotriazol-1-yloksy)tripirolidynofosfoniowy (PyBOP) [88], azydek difenylfosforylowy (DPPA) [10, 89], cyjanofosforan dietylowy [6, 90, 91] lub rozpuszczalny w wodzie 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylo-karbodiimid (EDCI) [92-94].

Schemat 10



Zw.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>4</sup>	n	Zw.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>4</sup>	n
60		H	SCH <sub>3</sub>	2	65		CH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	2
61		H	COOMe	2	66		CH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	2
62		H	SCH <sub>3</sub>	2	67		CH <sub>3</sub>	COOMe	2
63		H	COOEt	2	68		CH <sub>3</sub>	COOMe	1
64		H	COOMe	2	69		CH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	2

W trakcie prac eksperymentalnych wykluczono możliwość zastosowania chlorków kwasowych, których otrzymanie w stanie czystym okazało się niemożliwe. Sukcesem natomiast zakończyły się reakcje kwasów **52** – **59** z estrami kwasu glutaminowego, asparaginowego oraz metioniny prowadzone w obecności cyjanofosforanu dietylowego (Schemat 10) [93].

Reakcje przebiegały z wydajnościami 23 – 84% w temperaturze pokojowej w obecności trietyloaminy oraz dimetyloformamidu użytego jako rozpuszczalnika. Produkty izolowano przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej.

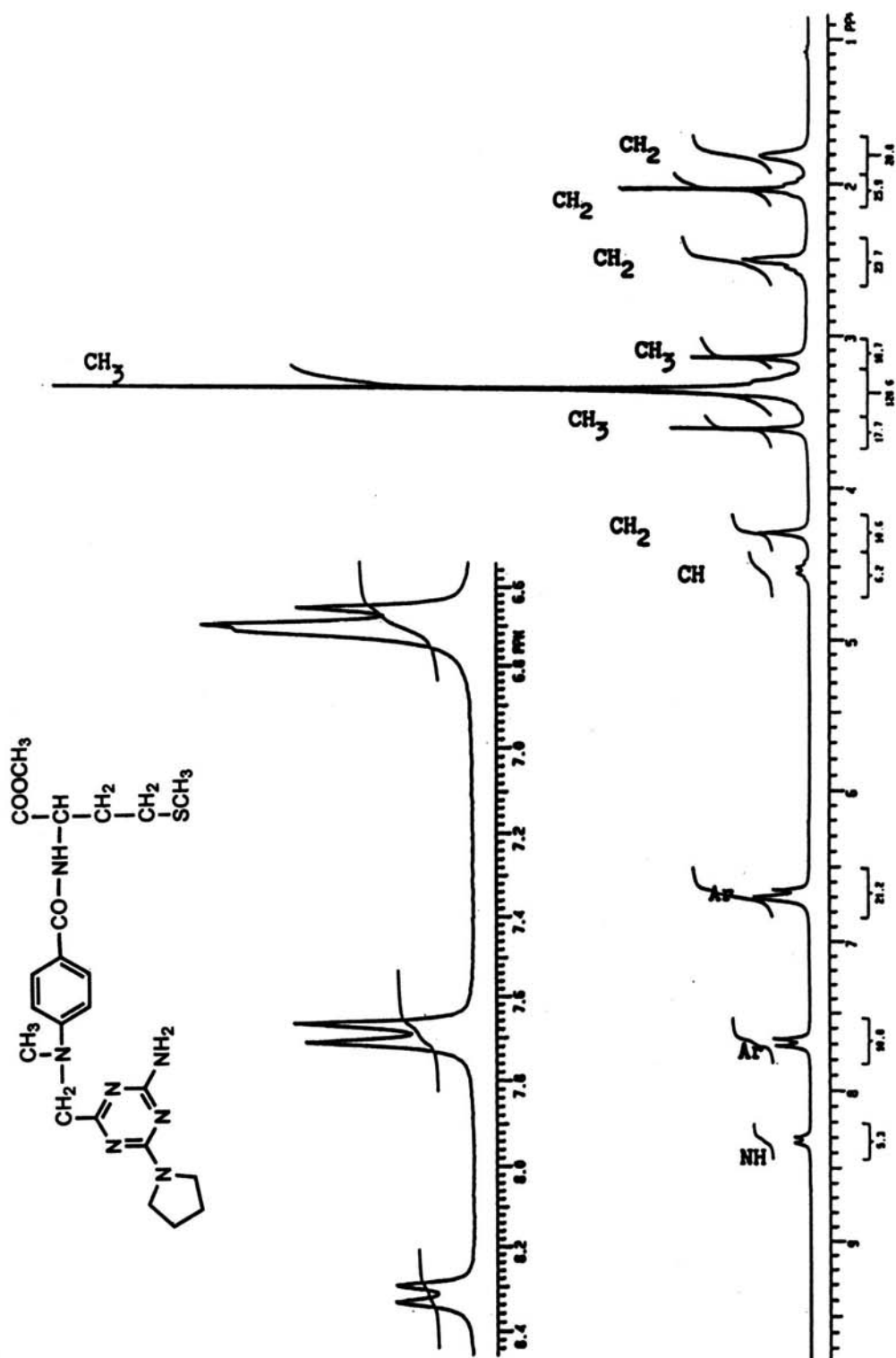
Struktury otrzymanych pochodnych estrowych **60** – **69** potwierdzono w oparciu o wyniki analizy elementarnej oraz analizę widm IR i  $^1\text{H}$  NMR, a w przypadku związku **66** wykonano także widmo MS.

Cechą charakterystyczną widm IR otrzymanych związków jest obecność pasm absorpcji w zakresie  $1720 - 1730\text{ cm}^{-1}$  potwierdzających obecność funkcji estrowej (drżania rozciągające wiązania C=O).

Przykładowe widmo  $^1\text{H}$  NMR pochodnej metioniny **66** (Widmo 7) zawiera trzy linie rezonansowe w postaci singletów przy 3.15, 3.37 i 3.63 ppm odpowiadające protonom grup metylowych S-CH<sub>3</sub>, N-CH<sub>3</sub> i O-CH<sub>3</sub>. Dublet o intensywności 1 protonu przy 8.32 ppm odpowiada protonowi NH wytworzonego wiązania amidowego.

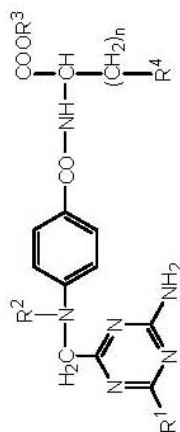
W widmie masowym tego związku występuje pik jonu macierzystego M<sup>+</sup> przy  $m/z = 473$  (4%) oraz pasma jonów fragmentacyjnych przy  $m/z = 311$  (10%), 193 (3%), 179 (100%) i 151 (5%).

Właściwości fizykochemiczne i spektroskopowe otrzymanych pochodnych estrowych **60** – **69** przedstawiono w Tabeli 8.



Widmo 7. Widmo <sup>1</sup>H NMR związku **66** w DMSO-d<sub>6</sub>.

Tabela 8. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe związków (60 – 69)



Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
60	23	175-176 (octan etylu/metanol, 20:0.5)	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S 550.67	3352, 1732, 1600, 1584, 1483, 1440	1.95-2.8 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.48-2.58 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.05-3.14 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.37 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.62 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.8-3.9 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.0 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 5.5 Hz), 4.5-4.54 (m, 1H, CH, J = 6.9 Hz), 6.5 (t, 1H, NH), 6.63 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.95 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.76-7.27 (m, 5H, CH), 7.67 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 8.3 (d, 1H, NH, J = 7.4 Hz)
*61	42	154-156 (chloroform/octan etylu, 1:1)	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub> 562.61	3458, 3392, 2955, 1735, 1609, 1480	2.06-2.54 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.23 (t, 4H, CH <sub>2</sub> , J = 4.8 Hz, J = 5.4 Hz), 3.66 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.79 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.0 (szer. s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.18 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 4.4 Hz), 4.78-4.89 (m, 1H, CH), 5.16 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 5.36 (t, 1H, NH, J = 4.3 Hz, J = 4.1 Hz), 6.68 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 6.79 (d, 1H, NH, J = 7.6 Hz), 6.89-7.0 (m, 3H, CH), 7.31-7.36 (m, 2H, CH), 7.71 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz)
62	38	90-93 (octan etylu/metanol, 10:0.5)	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S 459.57	3392, 1735, 1563, 1392, 1344, 1243	1.8-1.9 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.0-2.1 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.34 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.37-3.45 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.63 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.0 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 5.4 Hz), 4.45-4.6 (m, 1H, CH), 6.45 (t, 1H, NH), 6.62 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.78 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.66 (d, 2H, CH, J = 8.5 Hz), 8.28 (d, 1H, NH, J = 7.4 Hz)



Tabela 8 cd.

Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.c.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
63	38	185-189 (octan etylu/eter dietylowy, 6:4)	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> 487.50	3347, 1727, 1609, 1572, 1305, 1191	1.12-1.23 (t, 3H, CH <sub>3</sub> , J = 7.2 Hz), 1.88-2.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.45-2.9 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.58-3.66 (m, 8H, CH <sub>2</sub> ), 3.98-4.08 (m, 4H, CH <sub>2</sub> , J = 7.1 Hz), 4.28-4.39 (m, 1H, CH <sub>2</sub> ), 6.41-6.46 (t, 1H, NH, J = 5.5 Hz, J = 5.3 Hz), 6.6-6.64 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.9 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.63-7.67 (d, 2H, CH, J = 8.4 Hz), 8.1- 8.14 (d, 1H, NH, J = 7.7 Hz), 12.0 (s, 1H, COOH)
64	25	74-77 (chloroform/metanol, gradient stężenia)	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> 507.55	3374, 2951, 2361, 1738, 1635, 1562	1.8-2.2 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.39-2.49 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.38 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.57 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.62 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.7 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 5.5 Hz), 4.3-4.5 (m, 1H, CH), 6.43 (t, 1H, NH), 6.56 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 6.93 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.19-7.34 (m, 5H, CH), 7.65 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 8.28 (d, 1H, NH, J = 7.4 Hz)
65	26	174-179 (octan etylu/metanol, 20:0.5)	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S 564.70	3323, 1735, 1600, 1584, 1480, 1449	1.9-2.1 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.48-2.58 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.0-3.12 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.16 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.34 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.62 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.68-3.76 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.34 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.45-4.55 (m, 1H, CH, J = 6.7 Hz), 6.7 (d, 2H, CH, J = 8.9 Hz), 6.97 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.76-7.26 (m, 5H, CH), 7.71 (d, 2H, CH, J = 8.9 Hz), 8.33 (d, 1H, NH, J = 7.5 Hz)
66	28	82-84 (octan etylu/metanol, 20:0.5)	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S 473.59	3440, 2352, 1723, 1632, 1584, 1452	1.81-1.9 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.0-2.1 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.5 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.15 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.37 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.63 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.3 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.4-4.6 (m, 1H, CH), 6.68 (d, 2H, CH, J = 9.2 Hz), 6.7 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.7 (d, 2H, CH, J = 8.6 Hz), 8.32 (d, 1H, NH, J = 7.4 Hz),

Tabela 8 cd.

Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
67	64	95-98 (chloroform/metanol, gradient stężeń)	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> 526.58	3320, 3214, 1735, 1637, 1528, 1440	1.31 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 2.06 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.09-2.28 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.35-2.48 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.7 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.18 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.64 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.76 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.37 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.79-4.81 (m, 1H, CH, J = 4.8 Hz), 5.43 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.67 (d, 2H, CH, J = 7.7 Hz), 6.76 (d, 1H, NH, J = 8.9 Hz), 7.66 (d, 2H, CH, J = 7.7 Hz)
68	72	68-70 (chloroform/metanol, gradient stężeń)	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> 512.55	3322, 2953, 2362, 1740, 1608, 1445	1.31 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.32 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.07 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.72 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.9 (d, 2H, CH, J = 4.6 Hz), 3.19 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.69 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.78 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.42 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5.01-5.1 (m, 1H, CH), 5.74 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.68 (d, 2H, CH, J = 9.0 Hz), 7.02 (d, 1H, NH, J = 7.9 Hz), 7.67 (d, 2H, CH, J = 9.0 Hz)
69	84	94-99 (chloroform/metanol, gradient stężeń)	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S 514.63	3324, 2918, 1740, 1631, 1561, 1445	1.28 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.29 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.07 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.1 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.15-2.35 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.54-2.61 (m, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 7.5 Hz), 2.72 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.18 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.77 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.99-4.06 (m, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 7.0 Hz, J = 7.1 Hz), 4.47 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.88-4.91 (m, 1H, CH, J = 5.4 Hz), 6.67 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.76 (d, 1H, NH, J = 7.6 Hz), 7.67 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz)

(66) MS (m/z): 473.4 M<sup>+</sup> (3.9%).

Widma <sup>1</sup>H NMR wykonano w DMSO-d<sub>6</sub> i CDCl<sub>3</sub>\*.

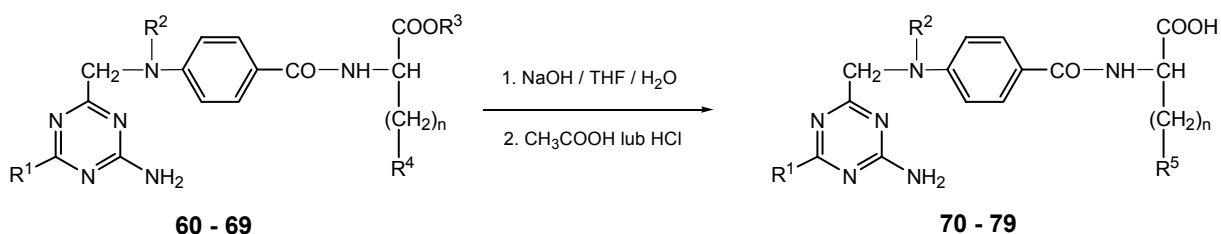
### 4.3.3. Hydroliza estrów 60 – 69 do pochodnych kwasowych 70 – 79

Jakkolwiek hydroliza alkaliczna estrów do odpowiednich kwasów karboksylowych wydaje się zabiegiem prostym, obecność w substratach innych ugrupowań wrażliwych na działanie silnych zasad (wiązania CONH i C=N) wymagała starannego doboru warunków reakcji, w tym rozpuszczalnika, temperatury i rodzaju użytej zasady.

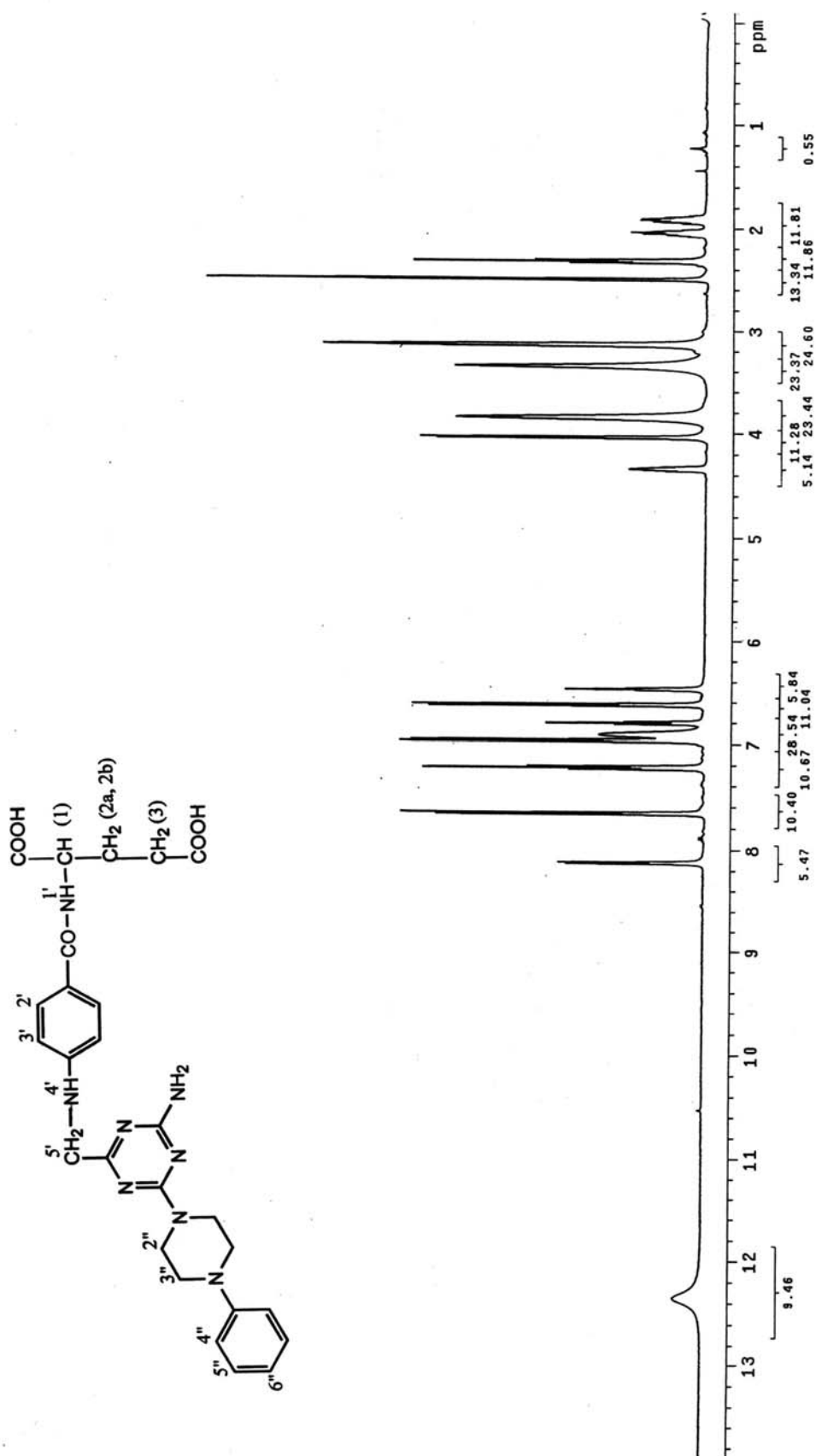
W oparciu o badania eksperymentalne stwierdzono, że reakcje hydrolizy przebiegają z dobrymi wydajnościami (44 – 87%) przy zastosowaniu wodorotlenku sodowego w mieszaninie tetrahydrofuran - woda w temperaturze pokojowej [95]. Wytworzone w pierwszym etapie sole sodowe odpowiednich kwasów karboksylowych przeprowadzono w pożądane analogi *Metotreksatu* 70 – 79 działaniem kwasu octowego lub 10% HCl (Schemat 11).

Strukturę otrzymanych tym sposobem związków potwierdziły wyniki analizy elementarnej i spektroskopowej IR, NMR i MS.

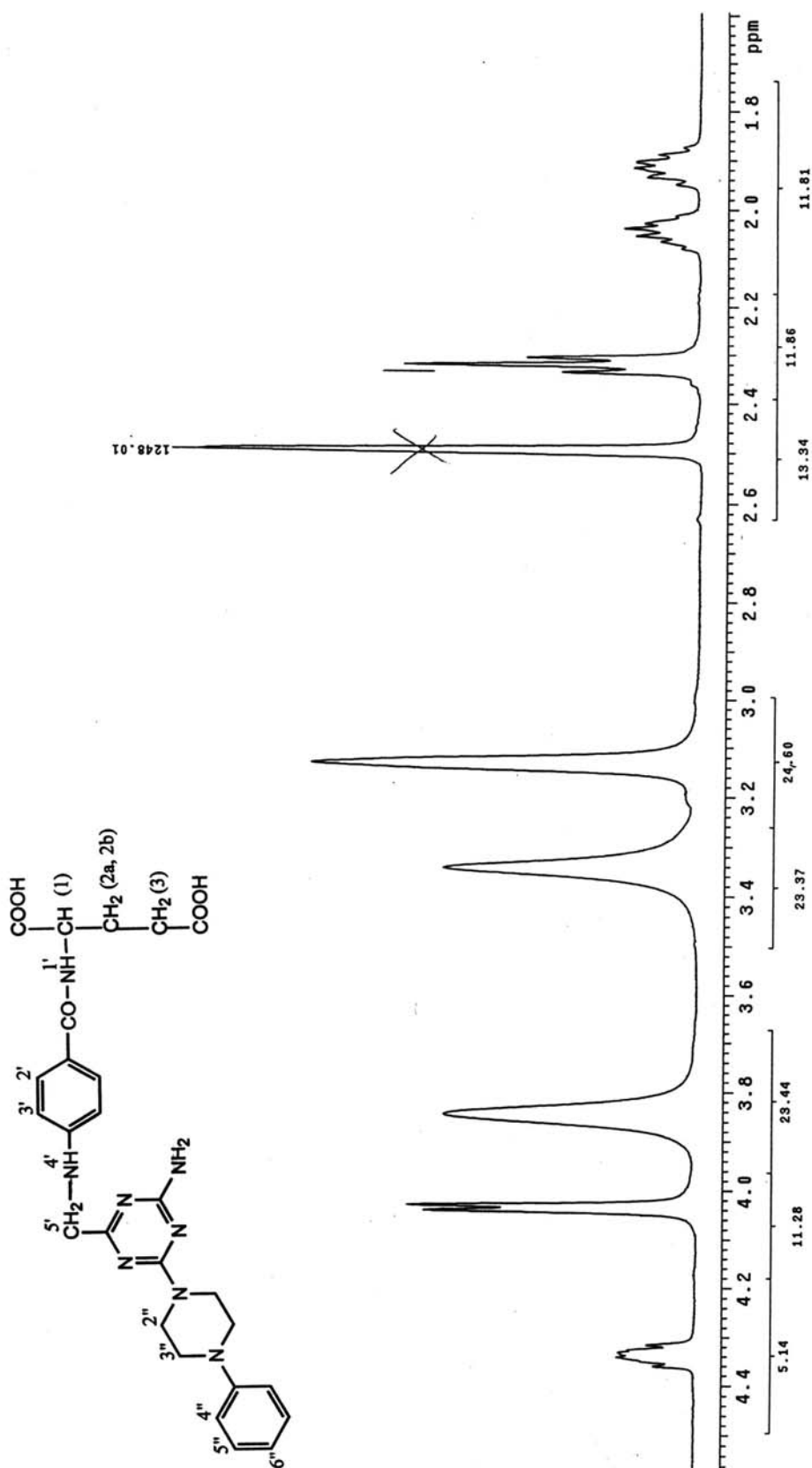
Schemat 11



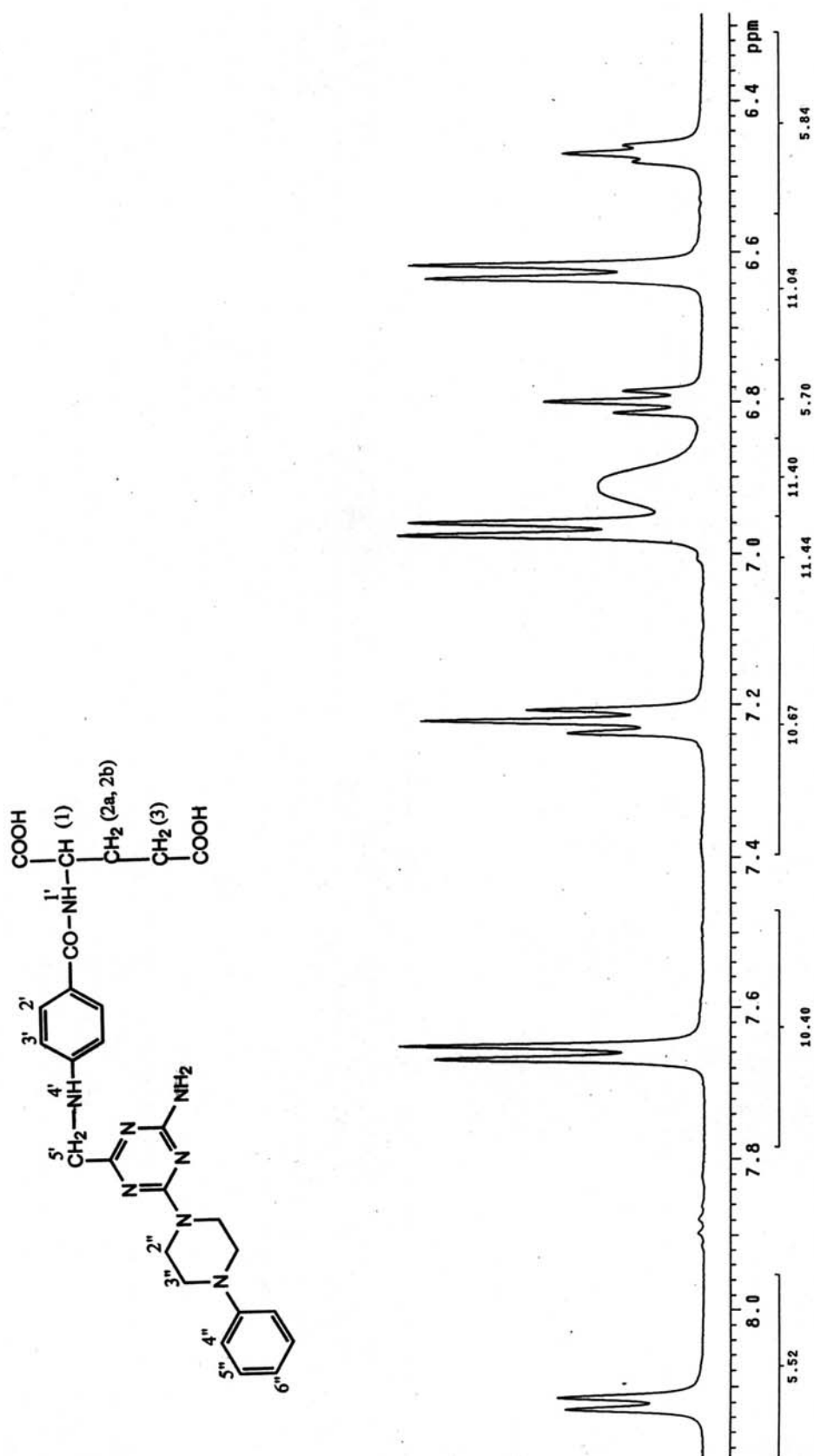
Zw.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>5</sup>	n	Zw.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>5</sup>	n
70		H	SCH <sub>3</sub>	2	75		CH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	2
71		H	COOH	2	76		CH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	2
72		H	SCH <sub>3</sub>	2	77		CH <sub>3</sub>	COOH	2
73		H	COOH	2	78		CH <sub>3</sub>	COOH	1
74		H	COOH	2	79		CH <sub>3</sub>	SCH <sub>3</sub>	2



Widmo 8. Widmo <sup>1</sup>H NMR związku 71 w DMSO-d<sub>6</sub>.



Widmo 8A. Widmo <sup>1</sup>H NMR związku 71 w DMSO-d<sub>6</sub>, zakres alifatyczny.



Widmo 8B. Widmo  $^1\text{H}$  NMR związku 71 w  $\text{DMSO-d}_6$ , zakres aromatyyczny.

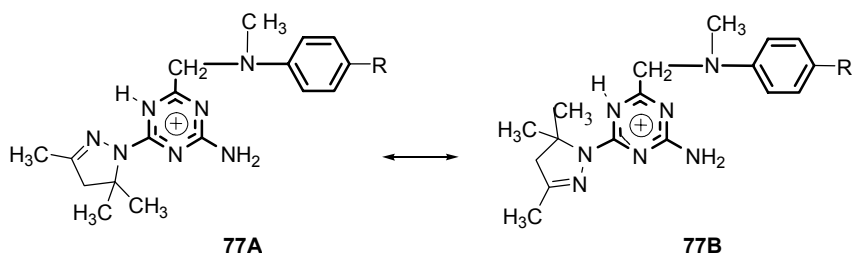
Przykładowe widmo  $^1\text{H}$  NMR związku **71** (Widmo 8, 8A i 8B) potwierdza w pełni strukturę szkieletu węglowodorowego oraz obecność grup funkcyjnych takich jak N-H i COOH. W Widmie 8 możemy wyróżnić trzy grupy linii rezonansowych występujących w zakresach: alifatycznym (1.86 – 4.42 ppm), aromatycznym (6.5 – 8.2 ppm) oraz szeroki singlet o intensywności 2 protonów przy 12.3 ppm odpowiadający dwóm grupom karboksylowym. W zakresie alifatycznym widma (Widmo 8A) znajdujemy dwa multiplety przy 1.86 – 1.96 ppm oraz 2.0 i 2.1 ppm o intensywności 1 protonu każdy, które odpowiadają protonom 2a i 2b kwasu glutaminowego. Protony te są nierównocenne magnetycznie z uwagi na sąsiedztwo asymetrycznego atomu węgla. Przy 2.32 ppm występuje triplet dwóch protonów grupy  $\text{CH}_2(3)$  kwasu glutaminowego, natomiast sygnał protonu  $\text{CH}(1)$  łańcucha występuje w postaci multipletu w zakresie 4.3 – 4.38 ppm. Ponadto, w Widmie 8A znajdujemy charakterystyczny dublet o intensywności 2 protonów przy 4.04 ppm grupy  $\text{CH}_2(5')$  sprzężonej z protonem  $\text{NH}(4')$  oraz dwa multiplety w formie poszerzonych singletów o intensywności 4 protonów każdy, pochodzących od protonów pierścienia pirazoliny (2" i 3").

W Widmie 8B występuje triplet protonu  $\text{NH}(4')$  przy 6.47 ppm sprzężonego z grupą  $\text{CH}_2(5')$ , szeroki singlet o intensywności dwóch protonów w zakresie 6.84 – 6.96 ppm odpowiadający grupie  $\text{NH}_2$  oraz dublet przy 8.12 ppm protonu  $\text{NH}(1')$  ugrupowania amidowego w sąsiedztwie protonu  $\text{CH}(1)$  kwasu glutaminowego. Pozostałe sygnały w formie dubletów i tripletów o łącznej integracji odpowiadającej 9 protonom potwierdzają obecność w cząsteczce dwóch pierścieni aromatycznych: monopodstawionego i podstawionego w pozycjach 1,4.

Właściwości fizykochemiczne otrzymanych analogów *Metotreksatu* od **70** – **79** przedstawiono w Tabeli 9.

W celu identyfikacji w widmach  $^1\text{H}$  NMR protonów pochodzących od grup NH i  $\text{NH}_2$  wykonano także pomiary przy użyciu mieszaniny DMSO – TFA (10:1). W przypadku związku **77** zaobserwowano podwojenie sygnałów pochodzących od pierścienia 3,5,5-trimetylopirazoliny, co wskazywało na obecność dwóch rotamerów, które mogą powstawać wskutek protonowania jednego z atomów azotu.

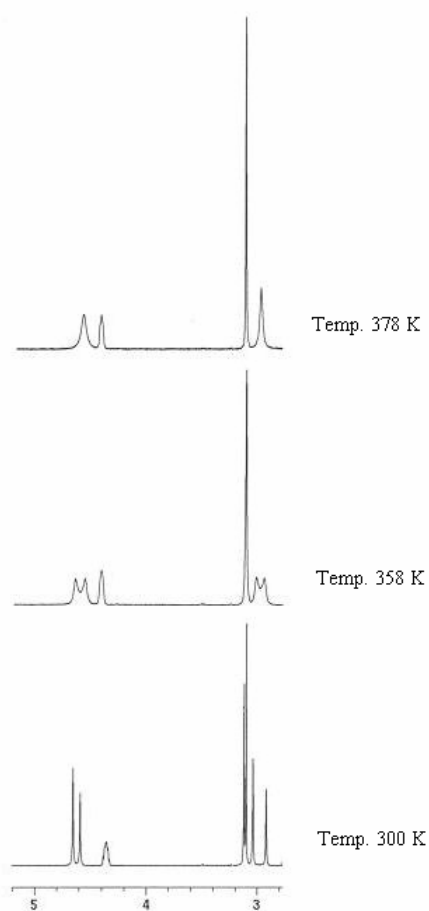
W celu określenia zasadowości związku **77** przeprowadzono obliczenia kwantowo-chemiczne jego form protonowanych [96]. Na tej podstawie wykazano, iż najniższym ciepłem tworzenia odznacza się pochodna triazyny protonowana przy atomie azotu N-5 (Rysunek 10).



Rysunek 10

Trwałość formy protonowanej przy atomie azotu N-5 pierścienia triazyny wynika z możliwości delokalizacji ładunku dodatniego w obrębie tego pierścienia heterocyklicznego.

Celem określenia bariery energetycznej procesu rotacji pierścienia pirazoliny wykonano widma zmiennotemperaturowe  $^1\text{H}$  NMR związku **77** (Rysunek 11).



Rysunek 11. Widma  $^1\text{H}$  NMR związku **77** wykonane w DMSO-TFA (10:1) w temperaturach 300, 358 i 378 K (pokazano zakres 2.8 – 5 ppm).



Na podstawie analizy intensywności sygnałów 3,5,5-trimetylopirazoliny wykazano, że w temperaturze 300 K rotamery **77A** i **77B** występują w stosunku 59 : 41. Koalescencja sygnałów nastąpiła w temperaturze 378 K. Na podstawie równania Eyringa [97, 98] obliczono, iż energia swobodna aktywacji ( $\Delta G^\ddagger$ ) procesu rotacji pierścienia pirazoliny wynosi 19 kcal/mol:

$$\Delta G^\ddagger = -RT_c \log \frac{k_c \cdot h}{k \cdot T_c} = 19.097 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$$

gdzie:  $k_c = \frac{\Pi \cdot \Delta \nu}{\sqrt{2}}$  (szybkość procesu rotacji)

$$k \text{ (stała Boltzmana)} = 3.29985867 \times 10^{-27} \frac{\text{kcal}}{\text{K}}$$

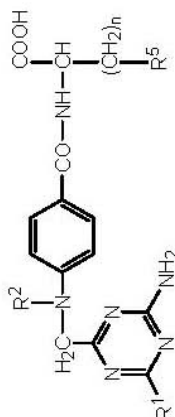
$$h \text{ (stała Plancka)} = 1.582571872 \times 10^{-37} \text{ kcal} \cdot \text{s}$$

$$T_c \text{ (temperatura koalescencji)} = 378 \text{ K}$$

$$R \text{ (stała gazowa)} = 0.00198722 \frac{\text{kcal}}{\text{K} \cdot \text{mol}}$$

$$\Delta \nu \text{ (różnica przesunięć chemicznych)} = 32.3 \text{ Hz}$$

Tabela 9. Dane fizykochemiczne i spektroskopowe związków (70 – 79)



Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
70	84	225-229	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S 535.64	3323, 1552, 1504, 1440, 1232, 1003	1.91-2.1 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.03 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.48-2.57 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.14-3.2 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.85-3.9 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.04 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 5.1 Hz), 4.43-4.53 (m, 1H, CH, J = 7.0 Hz), 6.46 (t, 1H, NH, J = 5.2 Hz, J = 5.1 Hz), 6.63 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.91 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.77-7.27 (m, 5H, CH), 7.67 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 8.13 (d, 1H, NH, J = 7.9 Hz), 12.15 (szer. s, 1H, COOH)
71	65	176-180	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> 534.56	3386, 2922, 1674, 1607, 1576, 1446	1.9-2.13 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.32 (t, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 7.6 Hz, J = 7.3 Hz), 3.16 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.88 (s, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.06 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 4.8 Hz), 4.31-4.42 (m, 1H, CH), 6.5 (t, 1H, NH, J = 5.2 Hz, J = 5.5 Hz), 6.65 (d, 2H, CH, J = 5.8 Hz), 6.79-7.02 (m, 2H, CH + 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.25 (t, 2H, CH, J = 7.8 Hz, J = 7.7 Hz), 7.69 (d, 2H, CH, J = 8.5 Hz), 8.15 (d, 2H, CH, J = 4.6 Hz), 12.36 (szer. s, 2H, COOH)
72	83	230-234	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S 445.54	3336, 1596, 1523, 1476, 1323	1.75-1.86 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 1.97-2.2 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.1 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.34-3.5 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.0 (szer. s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.4-4.48 (m, 1H, CH, J = 6.9 Hz), 6.4 (szer. s, 1H, NH), 6.2 (d, 2H, CH, J = 7.9 Hz), 6.78 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.66 (d, 2H, CH, J = 7.8 Hz), 8.15 (d, 1H, NH, J = 6.7 Hz), 12.45 (szer. s, 1H, COOH)

Tabela 9 cd.

Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.cz.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
73	80	243-245	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> 459.46	3373, 2926, 1730, 1607, 1510, 1409	1.85-2.11 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.29-2.37 (t, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 7.2 Hz, J = 7.3 Hz), 3.58-3.87 (m, 8H, CH <sub>2</sub> ), 4.01-4.04 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 4.8 Hz), 4.29-4.4 (m, 1H, CH), 6.41-6.46 (t, 1H, NH, J = 5.1 Hz, J = 5.4 Hz), 6.6-6.64 (d, 2H, CH, J = 7.8 Hz), 6.9 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.64-7.68 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 8.1-8.14 (d, 1H, NH, J = 7.8 Hz), 12.25 (szer. s, 2H, COOH)
74	70	144-148	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>5</sub> 479.48	3373, 2926, 1730, 1607, 1510, 1400	1.9-2.04 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.29-2.37 (t, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 7.4 Hz, J = 7.0 Hz), 3.39 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.0 (d, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 5.4 Hz), 4.33-4.35 (m, 1H, CH), 6.39 (t, 1H, NH), 6.56 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 6.93 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.16-7.38 (m, 5H, CH, J = 8.7 Hz), 7.64-7.68 (d, 2H, CH, J = 8.5 Hz), 8.13 (d, 1H, NH, J = 7.7 Hz), 12.3 (szer. s, 2H, COOH)
75	88	117-121	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S 550.68	3312, 1600, 1564, 1504, 1440, 1232	1.95-2.1 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.0 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.1-3.21 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.15 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.76-3.8 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 4.33 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.45-4.49 (m, 1H, CH, J = 7.3 Hz), 6.7 (d, 2H, CH, J = 9.0 Hz), 6.96 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.76-7.26 (m, 5H, CH), 7.71 (d, 2H, CH, J = 8.9 Hz), 8.2 (d, 1H, NH, J = 8.0 Hz), 12.01 (szer. s, 1H, COOH)
76	78	220-224	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S 459.56	3392, 2935, 1723, 1600, 1535, 1480	1.84-1.93 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.02-2.06 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 2.52 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.14-3.21 (m, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3.23 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.31 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.45-4.49 (m, 1H, CH, J = 7.3 Hz), 6.67-6.7 (d, 2H, CH, J = 9.2 Hz), 6.72 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.69-7.74 (d, 2H, CH, J = 8.7 Hz), 8.17-8.21 (d, 1H, NH, J = 7.2 Hz), 12.45 (szer. s, 1H, COOH)

Tabela 9 cd.

Nr zw.	Wyd. [%]	T. t. [°C]	Wzór sum. m.c.	IR [cm <sup>-1</sup> ]	<sup>1</sup> H NMR [δ ppm]
77	44	173-175	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub> 498.61	3348, 2922, 1720, 1607, 1532, 1448	1.27 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 1.84 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.91-2.06 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.32 (t, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 7.3 Hz, J = 7.2 Hz), 2.7 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.15 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.28 (m, 1H, CH), 4.34 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 6.66 (d, 2H, CH, J = 8.9 Hz), 6.83 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.69 (d, 2H, CH, J = 8.9 Hz), 8.15 (d, 1H, NH, J = 7.6 Hz), 12.25 (szer. s, 2H, COOH)
78	61	>250	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub> 484.48	3381, 2924, 1720, 1631, 1604, 1570	1.27 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ), 1.44 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.91 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.6-2.82 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.14 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.34 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.66-4.69 (m, 1H, CH, J = 6.7 Hz), 6.66 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 6.84 (szer. s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 7.65 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 8.27 (d, 1H, NH, J = 7.7 Hz), 12.6 (szer. s, 2H, COOH)
79	85	150-153	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S 500.61	3355, 2919, 1728, 1607, 1530, 1447	1.26 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 1.28 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.03 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.08 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 2.14-2.3 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2.58-2.66 (m, 2H, CH <sub>2</sub> , J = 8.7 Hz), 2.69 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3.16 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.4 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4.78-4.81 (m, 1H, CH, J = 5.9 Hz), 6.21 (szer. s, 3H, NH <sub>2</sub> + COOH), 6.63 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz), 7.02 (d, 1H, NH, J = 7.2 Hz), 7.68 (d, 2H, CH, J = 8.8 Hz)

Tabela 9 cd.

- (73)  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  ppm: 26.35, 30.76, 43.37, 48.53, 52.0, 66.3, 111.4, 121.1, 129.14, 151.43, 164.73, 166.73, 166.96, 174.12, 174.25, 174.7.
- (75)  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  ppm: 14.89, 30.46, 30.70, 41.06, 42.66, 48.48, 51.73, 57.26, 110.95, 116.17, 119.53, 120.79, 129.06, 129.23, 151.23, 152.06, 164.71, 166.78, 167.10, 174.16, 175.19.
- MS (m/z): 550.4  $\text{M}^+$
- (76)  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  ppm: 14.86, 24.86, 25.02, 30.43, 30.66, 45.80, 46.16, 51.74, 57.21, 110.93, 120.64, 129.02, 152.09, 163.28, 166.76, 166.87, 174.17, 174.51.
- MS (m/z): 459.3  $\text{M}^+$  (1.9%)
- (79)  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  ppm: 15.73, 16.58, 26.48, 30.52, 32.0, 40.0, 52.93, 54.1, 56.17, 64.7, 111.38, 121.15, 128.92, 151.91, 157.45, 161.54, 165.14, 167.57, 173.17, 176.27.

Widma NMR wykonano w  $\text{DMSO-d}_6$ .

## 5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Temperaturę topnienia otrzymanych związków oznaczono z użyciem aparatu Boetius i podano bez korekty. Widma IR wykonano spektrofotometrem SATELLITE FTIR (Mattson) techniką tabletki KBr. Do sporządzenia widm związków techniką magnetycznego rezonansu jądrowego  $^1\text{H}$  NMR przy częstotliwości odpowiednio 200 MHz lub 500 MHz oraz  $^{13}\text{C}$  NMR przy 50 MHz lub 125 MHz użyto aparatów Varian Gemini 200 i Varian Unity Plus 500 w rozpuszczalnikach deuterowanych podanych przy opisach widm, wobec tetrametylosilanu (TMS) jako wzorca wewnętrznego. Wartości przesunięcia chemicznego  $\delta$  odnotowano w ppm. W opisie multipletowości sygnałów protonów zastosowano następujące skróty: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kwartet, m – multiplet. Widma 2D NMR wykonano z wykorzystaniem spektroskopu Varian Unity Plus 500. Widma masowe wykonano aparatem Fenningan MAT 95 techniką EI z użyciem wiązki elektronów o energii 70 eV. Do chromatografii kolumnowej użyto żelu krzemionkowego Kieselgel (70 – 270 mesh) firmy Aldrich oraz Kieselgel 60 (70 – 230 mesh) firmy Fluka. Chromatografię cienkowsarstwową wykonano stosując płytki aluminiowe pokryte żelem krzemionkowym 60 F<sub>254</sub> firmy MERCK. Detekcję chromatogramów wykonano przy użyciu lampy UV ( $\lambda = 254$  nm). Wyniki wykonanych analiz elementarnych C, H, N mieściły się w zakresie  $\pm 0.4\%$ .

### 5.1. Syntezy substratów

#### 5.1.1. Chlorowodorek *N*-[imino-(4-fenylopiperazyn-1-ylo)-metylo]guanidyny (1)

Do suchego chlorowodoru *N*-fenylopiperazyny (13.52 g, 68.3 mmola) wprowadzono 5.74 g (68.3 mmola) cyjanoguanidyny oraz 20 cm<sup>3</sup> bezwodnego *n*-butanolu. Mieszając ostrożnie ogrzano do chwili zainicjowania egzotermicznego przebiegu reakcji (90°C), połączonego z samorzutnym wzrostem temperatury mieszaniny o 30°C, a następnie ogrzano i utrzymywano w temperaturze wrzenia (122 - 123°C) w ciągu 8 h. Po ochłodzeniu mieszano jeszcze około 6 h w temperaturze pokojowej. Następnego dnia wydzielony produkt reakcji odsączono,

przemyto *n*-butanolem, izopropanolem i oczyszczono przez krystalizację z metanolu, uzyskując bezpostaciowy osad związku **1**.

Wydajność: 14 g (70%), C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>6</sub> (282.81), t.t. 215 - 217°C (Lit. [99] t.t. 243 - 244°C).

W analogiczny sposób otrzymano związki **2 – 6**:

**Chlorowodorek *N*-{imino-[4-(2-metylofenylo)piperazyn-1-ylo]metylo}-  
guanidyny (2)**

Wydajność: 78%, C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>6</sub> (296.80), t.t. 230 - 232°C, IR (KBr)  $\nu$ : 3316, 3204, 2917, 1613, 1548, 1496, 999, 762, 725 cm<sup>-1</sup>.

**Chlorowodorek *N*-{[4-(3-chloro-fenylo)-piperazyn-1-ylo]-imino-metylo}-  
guanidyny (3)**

Wydajność: 61%, C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub> (317.22), t.t. 221 - 222°C, IR (KBr)  $\nu$ : 3308, 3186, 2839, 1649, 1539, 1496, 1239, 1002, 778 cm<sup>-1</sup>.

**Chlorowodorek *N*-{[4-(4-fluoro-fenylo)-piperazyn-1-ylo]-imino-metylo}-  
guanidyny (4)**

Wydajność: 55%, C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>ClFN<sub>6</sub> (300.76), t.t. 189 - 192°C, IR (KBr)  $\nu$ : 3322, 3189, 2833, 1644, 1505, 1441, 1237, 1003, 828 cm<sup>-1</sup>.

**Chlorowodorek *N*-(imino-pirolidyn-1-ylo-metylo)guanidyny (5)**

Wydajność: 47%, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub> (191.62), t.t. 223 - 225°C (Lit. [100, 101] t.t. 225 - 226°C).

**Chlorowodorek *N*-[imino-(3,5,5-trimetylo-4,5-dihydro-pirazolin-1-ylo)-metylo]-  
guanidyny (6)**

Wydajność: 85%, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub> (232.72), t.t. 228 - 232°C (Lit. [77] t.t. 238 - 239°C).

### 5.1.2. *N*-{Imino-[4-(4-nitrofenylo)-piperazyn-1-ylo]-metylo}guanidyna (7)

Suchy chlorowodorek 1-(4-nitrofenylo)-piperazyny (11.4 g, 46.8 mmola) dodano do roztworu cyjanoguanidyny (3.93 g, 46.8 mmola) w bezwodnym *n*-butanolu (30 cm<sup>3</sup>). Uzyskany roztwór mieszając ogrzewano:

- a) początkowo do 70 – 90°C w ciągu 40 minut,
- b) w temperaturze 121 - 123°C przez 8 h.

Otrzymaną zwartą krystaliczną masę rozdrobniono i w postaci gęstej zawiesiny odsączono, przemyto *n*-butanolem (2 × 5 cm<sup>3</sup>) oraz izopropanolem (4 × 5 cm<sup>3</sup>) i wysuszono. Uzyskano 13.7 g surowego związku, który następnie rozpuszczono w 16 cm<sup>3</sup> wody o temperaturze 60°C, wymieszano z węglem aktywnym. Roztwór ogrzano do 75°C i przesączono na gorąco. Otrzymany przesącz podgrzano do temperatury 55°C i mieszając stopniowo dodawano roztwór 2 g (50 mmola) NaOH w 2.4 cm<sup>3</sup> wody (pod koniec dodawania NaOH wpadał osad). W kolejnym etapie mieszanie reakcyjną oziębiono, osad odsączono, przemyto zimną wodą i oczyszczono przez krystalizację z metanolu.

Wydajność: 13.7 g (90 %), C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (243.68), t.t. 216 - 220°C, IR (KBr) ν: 3311, 3157, 2728, 1637, 1555, 1330, 1244, 1115, 999 cm<sup>-1</sup>.

W analogiczny sposób otrzymano związki 8 -9:

### *N*-[(5-Etylo-4-metylo-4,5-dihydro-pirazolin-1-ylo)-imino-metylo]guanidyna (8)

Wydajność: 75%, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub> (232.72), t.t. 157 - 158°C (Lit. [77] t.t. 189 - 191°C).

### *N*-(Imino-morfolin-4-ylo-metylo)guanidyna (9)

Wydajność: 40%, C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O (171.74), t.t. 173 - 176°C (Lit. [102] t.t. 195 - 202°C).

### *N*-(Imino-*N*-metyloanilino-metylo)guanidyna (10)

Wydajność: 85%, C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub> (191.23), t.t. 78 – 79°C (Lit. [102] t.t. 107 – 110 °C).



### 5.1.3. Otrzymywanie 2-[4-amino-6-R-1,3,5-triazyn-2-ylo]acetonitryli (11-19)

#### A. Otrzymywanie związków (11–16)

Do bezwodnego etanolu (36 cm<sup>3</sup>) dodano metaliczny sól (0.58 g, 25.36 mmola) i całość mieszano pod chłodnicą zwrotną w celu uzyskania etanolanu sodu. Następnie do roztworu dodano chlorowoderek odpowiedniego biguanidu **1 - 6** (25.36 mmola). Uzyskany roztwór mieszano 2 h w temperaturze pokojowej. W ciągu kolejnej godziny, przy stałym mieszaniu, wkroplono ester etylowy kwasu cyjanooctowego (2.71 cm<sup>3</sup>, 25.36 mmola). Wytrącony osad odsączono, przemyto etanolem i przekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

#### B. Otrzymywanie związków (17–19)

Do roztworu odpowiedniego biguanidu **7 – 9** (30.57 mmola) w bezwodnym metanolu (48 cm<sup>3</sup>) dodano kroplami ester etylowy kwasu cyjanooctowego (3.26 cm<sup>3</sup>, 30.57 mmola) mola ciągu 1 h. Całość mieszano przez dalsze 2 h w temperaturze pokojowej. Wytrącony osad odsączono i przemyto metanolem o temp. 5°C. Uzyskany produkt oczyszczono przez krystalizację z odpowiedniego rozpuszczalnika.

Dane dotyczące wydajności, temperatur topnienia oraz analizy widmowej związków **11 – 19** podano w Tabeli 1.

## 5.2. Syntezy własne

### 5.2.1. Otrzymywanie 2-(4,6-diamino-1,3,5-triazyn-2-ylo)-2-{[4-(dimetyloamino)-fenylo]imino}acetonitryli (20-28)

Odpowiednią triazynę **11 – 19** (3.2 mmola) rozpuszczono w 80 cm<sup>3</sup> etanolu w temperaturze wrzenia. Następnie kolejno dodano *N,N*-dimetylo-4-nitrozoanilinę (0.48 g, 3.2 mmola) oraz 30 % wodny roztwór KOH (0.1 cm<sup>3</sup>). Mieszanie kontynuowano w ciągu 12 h w temperaturze pokojowej, po czym wytrącony osad odsączono, przemyto etanolem, wysuszono i przekrytalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

Właściwości fizykochemiczne, spektroskopowe oraz wydajności otrzymanych acetonitryli **20** – **28** przedstawiono w Tabeli 2.

#### **5.2.2. 4-Amino-*N*-fenylo-6-(4-fenylo-piperazyn-1-ylo)-1,3,5-triazyno-2-karboksyamid (29)**

Do roztworu triazyny **11** (0.5 g, 1.69 mmola) dodano 20% wodny roztwór Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.4 cm<sup>3</sup>) i nitrozobenzen (0.217 g, 2.03 mmola) w 5 cm<sup>3</sup> etanolu. Całość mieszano 10 minut w temperaturze wrzenia a następnie 12 h w temperaturze pokojowej. Wytrącony osad odsączono, przemyto etanolem, wodą i wysuszono. Uzyskany produkt **29** przekrystalizowano z mieszaniny THF – H<sub>2</sub>O.

#### **5.2.3. 4-Amino-*N*-fenylo-6-pirolidyn-1-ylo-1,3,5-triazyno-2-karboksyamid (30)**

Do roztworu triazyny **15** (0.3 g, 1.47 mmola) dodano 20% wodny roztwór Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.36 cm<sup>3</sup>) i nitrozobenzen (0.19 g, 1.76 mmola) w 4.5 cm<sup>3</sup> DMF. Całość mieszano 15 minut w temperaturze wrzenia, a następnie 12 h w temperaturze pokojowej. Wytrącony osad odsączono, przemyto DMF, wodą i wysuszono. Uzyskany produkt **30** przekrystalizowano z DMF.

#### **5.2.4. 4-Amino-*N*-fenylo-6-(3,5,5-trimetylo-4,5-dihydro-1*H*-pirazolin-1-ylo)-1,3,5-triazyno-2-karboksyamid (31)**

Do roztworu triazyny **16** (0.5 g, 2.04 mmola) dodano 20 % wodny roztwór Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.45 cm<sup>3</sup>) i nitrozobenzen (0.26 g, 2.45 mmola) w 6 cm<sup>3</sup> etanolu. Całość mieszano 24 h w temperaturze wrzenia. Wytrącony osad odsączono, przemyto etanolem, wodą i wysuszono. Uzyskany produkt **31** oczyszczono przez krystalizację z mieszaniny DMF – H<sub>2</sub>O.

#### **5.2.5. 4-Amino-6-(5-etylo-4-metylo-4,5-dihydro-1H-pirazolin-1-ylo)-N-fenyl-1,3,5-triazyno-2-karboksyamid (32)**

Związek **32** otrzymano analogicznie jak związek **31**.

#### **5.2.6. 4-Amino-6-morfolin-4-ylo-N-fenyl-1,3,5-triazyno-2-karboksyamid (33)**

Do roztworu triazyny **19** (1 g, 4.54 mmola) dodano 20% wodny roztwór  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1  $\text{cm}^3$ ) i nitrozobenzen (0.58 g, 5.45 mmola) w 14  $\text{cm}^3$  DMF. Całość mieszano 10 minut w temperaturze wrzenia, a następnie 24 h w temperaturze pokojowej. Wytrącony osad odsączono, przemyto DMF, wodą i wysuszono. Uzyskany produkt **33** przekrystalizowano z mieszaniny DMF –  $\text{H}_2\text{O}$ .

Dane dotyczące wydajności, temperatur topnienia oraz widm IR i NMR otrzymanych związków **29** - **33** podano w Tabeli 3.

#### **5.2.7. Otrzymywanie 2,4-diamino-6-bromometylo-1,3,5-triazyn (34–36)**

Związkami wyjściowymi do tych syntez były opisane wcześniej chlorowodorki pochodnych biguanidu **1**, **5**, **6**, które przeprowadzono w wolne zasady działaniem ługu sodowego.

Do roztworu odpowiedniego biguanidu (41 mmola) w 100  $\text{cm}^3$  bezwodnego metanolu dodano kroplami bromooctan etylu (4.5  $\text{cm}^3$ , 41mmola) w ciągu 0.5 h. Całość mieszano w ciągu 2.5 h w temperaturze pokojowej. Wytrącony osad odsączono, przemyto metanolem. Uzyskane produkty **34** – **36** przekrystalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika (Tabela 4).

#### **5.2.8. 2-Amino-4-morfolino-6-bromometylo-1,3,5-triazyna (37)**

Do roztworu biguanidu **9** (10 g, 58.4 mmola) w 100  $\text{cm}^3$  bezwodnego metanolu dodano kroplami 6.5  $\text{cm}^3$  (9.75 g, 58.4 mmola) bromooctanu etylu w ciągu 0.5 h. Całość mieszano w ciągu 2.5 h w temperaturze pokojowej. Następnie wytrącony osad produktu **37** odsączono, przemyto metanolem i przekrystalizowano z etanolu.

### 5.2.9. 2-Amino-4-(*N*-metyloanilino)-6-bromometylo-1,3,5-triazyna (38)

Do roztworu 11.83 g (62 mmola) biguanidu **10** w 118 cm<sup>3</sup> bezwodnego metanolu dodano kroplami 6.85 cm<sup>3</sup> (10.3 g, 62 mmola) bromooctanu etylu w ciągu 0.5 h. Otrzymany roztwór mieszano przez 2.5 h, następnie rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem do połowy objętości i mieszano dalsze 0.5 h. Otrzymany osad związku **38** odsączono, przemyto metanolem i poddano krystalizacji z metanolu.

Dane dotyczące temperatur topnienia, wydajności i wyników analizy widmowej związków **34** – **38** przedstawiono w Tabeli 4.

### 5.2.10. Synteza bromków [(4,6-diamino-triazyn-2-yl)-metylo]trifenylfosfoniowych (39, 41 i 42)

Roztwór trifenylfosfiny (1.4 mmola) i odpowiedniej triazyny **34**, **36** i **37** (1.4 mmola) w 6 cm<sup>3</sup> bezwodnego dioksanu utrzymywano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Po ochłodzeniu roztworu do temperatury pokojowej wypadł osad, który odsączono, przemyto zimnym dioksanem i wysuszono. W ten sposób otrzymano bromki fosfoniowe **39**, **41** i **42**.

Dane dotyczące temperatur topnienia, wydajności i analizy spektroskopowej IR dla związków **39**, **41**, **42** podano w Tabeli 5.

### 5.2.11. Bromek[(4-amino-6-pirolidyno-triazyn-2-yl)-metylo]trifenylfosfoniowy (40)

Do zawiesiny 0.36 g (14 mmola) triazyny **35** w 6 cm<sup>3</sup> bezwodnego dioksanu dodano 0.38 g (14 mmola) trifenylfosfiny i całość mieszając ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1 h. Następnie oddestylowano dioksan pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany osad przemyto kilkakrotnie bezwodnym eterem dietylowym (Tabela 5).

### 5.2.12. Synteza 2-alkenylo-4,6-diamino-1,3,5-triazyn (43–51)

Do zawiesiny soli fosfoniowej **34** – **39** (1 mmola) i odpowiedniego aldehydu (1mmola) w suchym metanolu (5 cm<sup>3</sup>) dodano kroplami w temperaturze 25 – 65°C metanolowy roztwór metanolanu sodu (1 mmola) w ciągu 3 minut (Schemat 8). Po upływie 30 minut zaczął wypadać osad odpowiedniego produktu. Roztwór ochłodzono a wytrącony osad odsączono i przemyto zimnym metanolem, po czym krystalizowano z DMF lub acetonitrylu.

Dane dotyczące temperatur topnienia, wydajności oraz wyniki analizy widmowej związków **43** – **51** zamieszczono w Tabeli 6.

### 5.2.13. Synteza kwasów 4-[[[(2,4-diamino-1,3,5-triazyn-6-ylo)metylo]amino]benzoesowych (52–59)

Roztwór odpowiedniej triazyny **34** – **38** (5.2 mmola) i kwasu 4-aminbenzoesowego lub 4-(metyloamino)benzoesowego (stosunek molowy substratów podany na Schemacie 9) w DMF (16 cm<sup>3</sup>) mieszano w temperaturze pokojowej 12 godzin. Powstałą zawiesinę zadano eterem dietylowym (80 cm<sup>3</sup>). Warstwę eterową odrzucono, a do oleistej pozostałości dodano wodę (20 cm<sup>3</sup>) lub aceton (związki **53**, **55**, **58**, **59** wytrącono wodą, a związki **52**, **54**, **56**, **57** wytrącono acetonem). Powstały osad produktu w postaci bromowodorku odsączono i wysuszono. Następnie osad zawieszono w CHCl<sub>3</sub> (35 cm<sup>3</sup>), dodano trietyloaminę (16.9 mmola) i całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 h. Produkty **52** - **59** odsączono, przemyto wodą i wysuszono. Otrzymane związki krystalizowano z odpowiedniego rozpuszczalnika.

Dane dotyczące temperatur topnienia, wydajności oraz analizy widm IR i NMR dla związków **52** – **59** podano w Tabeli 7.

#### 5.2.14. Reakcja kondensacji kwasów 52-59 z estrami aminokwasów. Synteza estrów (60–69)

Do roztworu odpowiedniego kwasu **52 – 59** (2.8 mmola) i chlorowodoru estru odpowiedniego aminokwasu (3.1 mmola) w 8 cm<sup>3</sup> bezwodnego DMF dodano ester dietylowy kwasu cyjanofosforowego (4 cm<sup>3</sup>) i trietyloaminę (9.36 mmola). Całość mieszano 12 h w temperaturze pokojowej, po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie przeprowadzono rozdział mieszaniny reakcyjnej na kolumnie chromatograficznej w celu wyizolowania czystego produktu. Dane dotyczące użytej fazy zamieszczono w Tabeli 8.

Dane dotyczące temperatur topnienia, wydajności, rozpuszczalników użytych do chromatografii oraz analizy widmowej dla związków **60 - 69** zamieszczono w Tabeli 8.

#### 5.2.15. Otrzymywanie kwasów (70–79)

Do roztworu odpowiedniego estru **60 - 69** (0.12 mmola) w THF-H<sub>2</sub>O (2 : 1, 0.72 cm<sup>3</sup>) dodano wodny roztwór 1M NaOH (0.36 cm<sup>3</sup>) i całość mieszano w ciągu 4 h w temperaturze pokojowej. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem a do pozostałości dodano kwas octowy (związki **70 – 76** i **79**) lub 10% HCl (związki **77** i **78**). Wytrącony osad odsączono, przemyto dużą ilością wody i wysuszono.

Dane dotyczące temperatur topnienia, wydajności oraz analizy widmowej związków **70 – 79** podano w Tabeli 9.

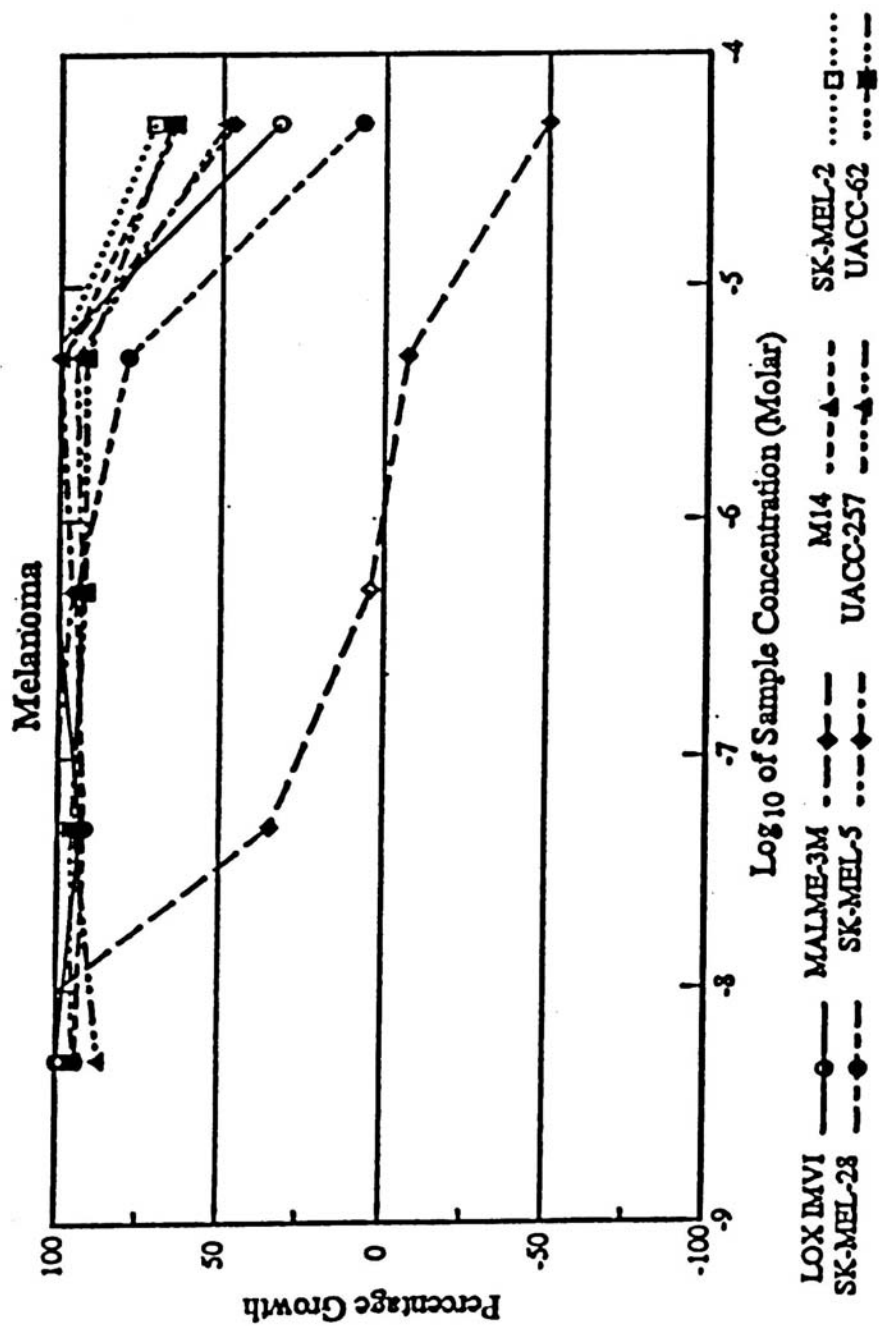
## 6. WYNIKI BADAŃ BIOLOGICZNYCH

Podejmując prace nad syntezą nowych związków heterocyklicznych o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej kierowano się możliwością przeprowadzenia badań biologicznych w National Cancer Institute (NCI) w Bethesda, USA w ramach „*Development Therapeutic Program*” oraz w zespole kierowanym przez prof. Patricka Bednarskiego z Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu w Greifswaldzie, Niemcy.

Badania właściwości cytostatycznych i cytotoksycznych otrzymanych związków nie zostały do czasu złożenia niniejszej rozprawy zakończone. Tym niemniej wyniki wstępnych oznaczeń wymagają omówienia.

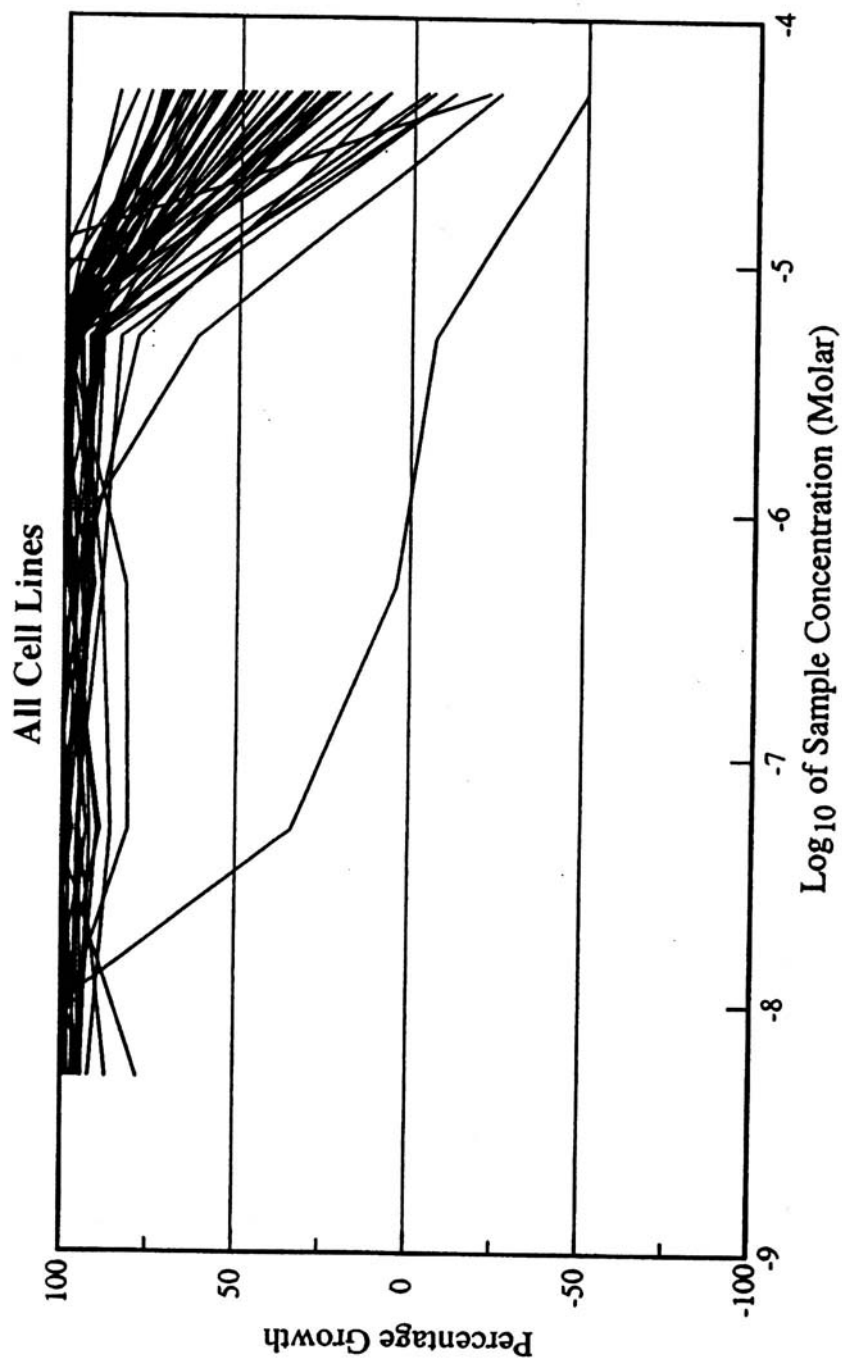
1. Analogi *Metotreksatu* **70** – **79** w badaniach prowadzonych w Greifswaldzie z użyciem linii komórkowych nowotworów piersi (MCF-7), trzustki (DAN-G) oraz płuca (LCLC-104) wykazały niską aktywność cytostatyczną bowiem wartości  $IC_{50}$  przekraczały wartość  $20 \mu\text{M}$ .
2. W NCI przeprowadzono badania *in vitro* produktów reakcji triazyn-2-ylo-acetonitrylu ze związkami nitrozowymi: pochodnych iminoacetonitrylu **20** – **28** oraz amidów **29** – **33**. Związki o strukturze amidowej okazały się nieaktywne, natomiast w grupie iminoacetonitryli interesującym okazał się związek **20** (NSC 729113). Badania z użyciem 60 linii komórkowych wywodzących się z 9 typów nowotworów ludzkich wykazały selektywny wpływ hamujący wzrost komórek nowotworu czerniaka MALME-3M (Rysunek 12 i 13). W stężeniu  $3.3 \times 10^{-8}$  M związek ten powodował zahamowanie wzrostu komórek czerniaka o 50% ( $GI_{50}$ ), natomiast w stężeniu  $1.1 \times 10^{-6}$  M obserwowano całkowite zahamowanie wzrostu (TGI).

Aktywność biologiczna iminoacetonitryli jest także przedmiotem badań prowadzonych w Greifswaldzie. Wstępne oznaczenia z użyciem linii komórkowych DAN-G, LCLC-104 i MCF-7 potwierdziły działanie cytotoksyczne związków **20**, **21**, **22**, **23**, **24**, **26** i **28** ( $IC_{50} < 20 \mu\text{M}$ ). Na uwagę zasługuje fakt, iż w tej klasie związków nieaktywne są pochodne **25** i **27**, zawierające w położeniu 6 triazyny pierścień pirazoliny, co odróżnia je od pochodnych akrylonitrylu, które wykazywały najwyższą aktywność przeciwnowotworową [74]. Wskazuje to, iż mechanizm działania pochodnych iminoacetonitrylu i akrylonitryli jest różny.



Rysunek 12. Krzywe zależności dawka-efekt biologiczny dla związku **20** (NSC 729113). Selektywny wpływ hamujący wzrost linii komórkowej MALME-3M czerniaka (źródło: National Cancer Institute, Bethesda, USA).





Rysunek 13. Krzywe zależności dawka-efekt biologiczny dla związku **20** (NSC 729113). Selektywny wpływ hamujący wzrost linii komórkowej MALME-3M czerniaka w odniesieniu do 60 linii komórkowych nowotworów ludzkich badanych w National Cancer Institute.

3. Pochodne 2-alkenylo-triazyny **43** – **51** zostały przyjęte do badań przeciwnowotworowych w NCI. Po ich zakończeniu będą przedmiotem publikacji wraz z wynikami badań chemicznych.

## 7. STRESZCZENIE

W „Części Teoretycznej” pracy, na podstawie danych z piśmiennictwa, przedstawiono krótką charakterystykę dotychczasowego stanu wiedzy na temat leków stosowanych w chemioterapii oraz przegląd właściwości biologicznych analogów *Metotreksatu*, a także pochodnych 1,3,5-triazyny, *tyrfostyn* i zasad Schiffa.

W kolejnym rozdziale „Badania Własne” omówiono wyniki przeprowadzonych doświadczeń w zakresie syntezy, badań strukturalnych i właściwości chemicznych następujących klas związków:

- pochodnych 2-(2,4-diaminotriazyn-6-ylo)-2-iminoacetonitrylu;
- pochodnych 2-alkenylo-4,6-diamino-1,3,5-triazyny;
- analogów *Metotreksatu*.

Dokumentację przeprowadzonych syntez przedstawiono w rozdziale zatytułowanym „Część Eksperymentalna”.

Typowymi metodami otrzymano niezbędne dla zamierzonych syntez chlorowodorki biguanidów **1 – 6**, wolne zasady biguanidów **7 - 10** oraz pochodne triazyn-2-ylo-acetonitrylu **11 – 19**, pochodne bromometylowe triazyny **34 – 38** i sole fosfoniowe **39 – 42**.

Triazyn-2-ylo-acetonitryle **11 - 19** w reakcjach kondensacji z *N,N*-dimetylo-4-nitrozoaniliną przeprowadzono w zamierzone pochodne iminoacetonitrylu **20 – 28**. Natomiast analogiczne reakcje triazyn-2-ylo-acetonitryli **11, 15, 16, 18, 19** z nitrozobenzenem prowadziły do powstawania produktów o strukturze amidów **29 – 33**. Różnice pomiędzy reaktywnością *N,N*-dimetylnitrozoaniliny i nitrozobenzenu wyjaśniono w oparciu o efekty elektronowe podstawników (lub ich brak) w pierścieniu aromatycznym tych substratów.

Zmierzając do otrzymania pochodnych 2-alkenylo-4,6-diamino-1,3,5-triazyny **43 – 51**, w pierwszym etapie otrzymano sole fosfoniowe **39 – 42**, które następnie posłużyły do reakcji Wittiga przy zastosowaniu odpowiednich aldehydów. Otrzymane

związki alkenylowe posiadają konfigurację *E*, która jest konsekwencją budowy stereochemicznej związków pośrednich o strukturze *trans*-fosfetanów.

Kolejnym etapem pracy była synteza analogów *Metotreksatu* zawierających ugrupowanie 2,4-diamino-1,3,5-triazyny w miejscu pierścienia aminopteryny. Zamierzone związki otrzymano na drodze 3-etapowej syntezy:

1. kwas *p*-aminobenzoesowy i jego pochodną *N*-metylową poddano reakcji *N*-alkilowania przy użyciu 2-bromometylo-1,3,5-triazyn **34** – **38** otrzymując kwasy **52** – **59**;
2. kwasy **52** – **59** na drodze kondensacji z estrami odpowiednich aminokwasów prowadzonej w obecności cyjonofosforanu dietylowego umożliwiły otrzymanie pochodnych estrowych **60** – **69**;
3. hydroliza alkaliczna estrów **60** - **69** prowadziła do wytworzenia pożądaných analogów *Metotreksatu* **70** – **79**.

Ogółem otrzymano 71 nowych połączeń 1,3,5-triazyny, których strukturę potwierdzono wynikami analizy elementarnej oraz spektroskopowej: IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, 2D NMR i MS.

Iminoacetonitryle **20** – **28** oraz związki amidowe **29** – **33** przekazano do National Cancer Institute (Bethesda, USA) w celu oceny ich działania przeciwnowotworowego. W testach *in vitro* pochodna iminoacetonitrylu **20** (NSC 729113) wyróżniła się selektywnością i wysoką aktywnością względem linii komórkowej MALME-3M nowotworu skóry ( $GI_{50} = 3.3 \times 10^{-8}$  M). Natomiast amidy **29** – **33** nie wykazały działania w tym kierunku.

Pochodne 2-alkenylo-triazyny **43** – **51** zostały przyjęte i przekazane do badań w NCI w celu zbadania ich aktywności przeciwnowotworowej z użyciem 60 linii komórkowych wywodzących się z 9 typów nowotworów ludzkich.

## 8. PIŚMIENNICTWO

1. „Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych” pod redakcją Orzechowskiej-Juzwenko K., Wydawnictwo VOLUMED, Wrocław (2000).
2. „Chemia Leków” pod redakcją Zejca A., Gorczycy M., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa (1998).
3. Furst D.E., Erikson N., Clute N.: *Arthritis J. Rheumatol.* **17**, 1628 (1990).
4. Galivan J.: *Mol. Pharmacol.* **17**, 105 (1980).
5. Domin B.A., Grill S.P., Bastow K.F., Cheng Y-Ch.: *Mol. Pharmacol.* **21**, 478 (1984).
6. Rosowsky A., Forsch R., Uren J., Wick M.: *J. Med. Chem.* **24**, 1450 (1981).
7. McGuire J.J., Rusell C.A., Bolanowska W.E.: *Cancer Res.* **50**, 1726 (1990).
8. Rosowsky A., Solan V.C., Forsch R.A.: *J. Med. Chem.* **30**, 1463 (1987).
9. Rosowsky A., Forsch R.A., Uren J., Wick M.: *J. Med. Chem.* **26**, 1719 (1983).
10. Miwa T., Hitaka T., Akimoto H., Nomura H.: *J. Med. Chem.* **34**, 555 (1991).
11. Miwa T., Hitaka T., Akimoto H.: *J. Org. Chem.* **58**, 1696 (1993).
12. Piper J.R., Rawamurthy B., Johnson C.A., Maddry J.A.: *J. Heterocyclic Chem.* **32**, 1205 (1995).
13. Kuyper L.F., Baccanari D.P., Jones M.L.: *J. Med. Chem.* **39**, 892 (1996).
14. Matsuoka H., Ohi N., Mihara M., Suzuki H.: *J. Med. Chem.* **40**, 105 (1997).
15. Loriga M., Vitalle G., Paglietti G.: *Farmaco* **53**, 139 (1998).
16. Vitalle G., Corona P., Loriga M., Paglietti G.: *Farmaco* **53**, 150 (1998).
17. Corona P., Vitalle G., Loriga M., Paglietti G., Costi M.P.: *Farmaco* **53**, 480 (1998).
18. Rosowsky A., Bader H., Moran R.G., Freisheim J.H.: *J. Heterocyclic Chem.* **26**, 509 (1989).
19. Rosowsky A., Wright J.E., Vaidya C.M., Forsch A., Bader H.: *J. Med. Chem.* **43**, 1620 (2000).
20. Gangjee A., Zeng Y., McGuire J.J., Kisliuk R.L.: *J. Med. Chem.* **43**, 3125 (2000).
21. Taylor W.C., Kuhnt D.: *J. Med. Chem.* **35**, 4450 (1992).
22. Webber S.E., Bleckman T.M., Attard J.: *J. Med. Chem.* **36**, 733 (1993).
23. Gangjee A., Mavandadi F., Kisliuk R.L., Queener S.F.: *J. Med. Chem.* **42**, 2272 (1999).

24. Marsham P.R.: *J. Heterocyclic Chem.* **31**, 603 (1994).
25. Jackman A.L., Farrugia D.C., Gibson W.: *Eur. J. Cancer*, Vol **31A**, Nos 7/8, 1277 (1995).
26. Marsham P.R., Jackman A.L., Barker A.J.: *J. Med. Chem.* **38**, 994 (1995).
27. Gangjee A., Devraj R., McGuire J.J., Kisliuk R.L.: *J. Med. Chem.* **38**, 4495 (1995).
28. Gangjee A., Mavandadi F., Kisliuk R.L., McGuire J.J., Queener S.F.: *J. Med. Chem.* **39**, 4563 (1996).
29. Bevetsias V., Jackman A.L., Kimbell R., Gibson W.: *J. Med. Chem.* **39**, 73 (1996).
30. Jones T.R., Varney M.D., Webber S.E., Appelt K.: *J. Med. Chem.* **39**, 904 (1996).
31. Gangjee A., Vidwans A., Elzein E., McGuire J.J., Queener S.F., Kisliuk R.L.: *J. Med. Chem.* **44**, 1993 (2001).
32. Taylor E.C., Harrington P.J., Fletcher S.R., Beardaley G.P., Moran R.G.: *J. Med. Chem.* **28**, 914 (1985).
33. Borell J.I., Teixidó J., Matallana J.L.: *J. Med. Chem.* **44**, 2366 (2001).
34. Taylor E.C., Harrington P.M., Shih C.: *Heterocycles* **28**, 1169 (1989).
35. Taylor E.C., Hamby J.M., Shih C., Grindey G.B.: *J. Med. Chem.* **32**, 1517 (1989).
36. Taylor E.C., Gillespie P., Patel M.: *J. Org. Chem.* **57**, 3218 (1992).
37. Borell J.I., Teixidó J., Martinez-Teipel B.: *J. Med. Chem.* **41**, 3539 (1998).
38. „*Chemioterapia nowotworów. Leki cytotoksyczne*” pod redakcją Boesen E., Davis W., PZWN, Warszawa (1972).
39. „*Organic chemical drugs and their synonyms*”, Negwer M., Akademie Verlag, Berlin (1994).
40. Foster B.J., Harding B., Leyland-Jones B., Hoth D.: *Cancer Treat. Rev.* **13** (4), 1997 (1986); Chem. Abstr. Vol. 107 R17025n (1987).
41. Tanino H., Kubota T., Naito Y., Sakurai T.: *Wakayama Igaku* **43** (4), 623 (1992); Chem. Abstr. Vol. 119 173744z (1993).
42. Jarman M., Coley H.M., Judson I.R., Thornton T.J., Wilman D.E.V., Abel G., Ruddy Ch.J.: *J. Med. Chem.* **36**, 4195 (1993).
43. Paramelle B., Leverage X., Regnier G., Dhainaut A., Atassi G., Pierre A.: *Eur. Pat. Appl.* EP 478, 416 (1992); Chem. Abstr. Vol. 117, 899j (1992).
44. Tassin I.P., Dubois J., Hancoq M., Atassi G.: *Talanta* **42**, 747 (1995).

45. Hansch C., Hathaway B.A., Guo Z., Selassie C.D.: *J. Med. Chem.* **27**, 129 (1984).
46. Hathaway B.A., Guo Z., Hansch C.: *J. Med. Chem.* **27**, 144 (1984).
47. Sun G., Li R., Wang J.: *Beijing Yike Daxue Xuebao* **23**, 227 (1991); *Chem. Abstr.* Vol.117, 251325p (1992).
48. Li R., Sun G., Dai H., Yin J.: *Chem. Res.* **7**, 197 (1991).
49. Hiotoshi M., Fusao 4. (Nippon Shinyaku Co Ltd.): *PCT int. Appl. WO* 1992 111, 247; *Chem. Abstr.* 118, 38951d (1993).
50. Atassi G., Dumont P., Fisher U., Zeidler M., Budnowsky M.: *Cancer Treat. Rev.* **11**, 99 (1984).
51. Leftheris K., Ahmed G., Chan R., Dyckman A.J., Hussain Z., Ho K., Hynes J. I inni: *J. Med. Chem.* **47**, 6283 (2004).
52. Limonta M., Colombo T., Damia G., Catapano C.V., Couter V., Gervasoni M., Masera G., Liso V., Specchia G.: *Leuk. Res.* **17**, 977 (1993).
53. Cote S., Momparler R.L.: *Anti-Cancer Drugs* **4** (3), 327 (1993).
54. Vachalkowa Z.A., Novotny L., Pikala A.: *Neoplasma* **40**, 289 (1993); *Chem. Abstr.* Vol 120, 208058d (1993).
55. Stopper H., Koerber C., Schiffmann D., Caspary W.J.: *Mutat. Res.* **30**, 165 (1993).
56. Laurence J., Grimison B., Rodriguez- Alfageme C., Astrin S.M.: *Virology* **196**, 433 (1993).
57. Rusch V., Mandelsohn J., Dmiotrovsky E.: *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**, 133 (1996).
58. Fry D., Kraker A.J., McMichael: *Science* **265**, 1093 (1994).
59. Warol W.H., Cook P.M.: *Biochem. Pharmacol.* **48**, 659 (1994).
60. Gazit A., Oshero N., Giton G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 1383 (1998).
61. Law N.M., Lydon N.B.: *Emerging Drug* 241 (1996).
62. Gazit A., Oshero N., Griton G., Levitzki A.: *J. Med. Chem.* **39**, 4905 (1996).
63. Young Ch. W., Schochetman G., Karnofsky D.A.: *Cancer Res.* **27**, 526 (1967).
64. Scozzafava A., Supuran C.T.: *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 2241 (2003).
65. Ren S., Wang R., Komatsu K., Bonaz-Krause P., Zyrianov Y., McKenna Ch.E., Csipke C., Tokes Z.A., Lien E.J.: *J. Med. Chem.* **45**, 410 (2002).
66. Adamson R.H.: *Nature* **236**, 400 (1972).

67. Tai A.W., Lien E.J., Collen Moore E., Chun Y, Roberts J.D.: *J. Med. Chem.* **26**, 1326 (1983).
68. Tai A.W., Lien E.J., Lai M.M.C., Khwaja T.A.: *J. Med. Chem.* **27**, 236 (1984).
69. Weckbecker G., Lie E.J., Cory J.G.: *Biochem. Pharmac.* **37**, 529 (1988).
70. Huang S.S.C., Ren S., Tokes Z.A., Csipke C., Guan Y., Chou T., Bonaz-Krause P., Zyrinov Y., Mc Kenna Ch.E., Lien E.J.: *Med. Chem. Res.* **11:3**, 168 (2002).
71. Machoń Z., Giełdanowski J., Wieczorek Z., Raberger G., Kowalczyk-Bronisz S.H., Błaszczak B., Zimecki M., Mordarski M., Fiszer-Maliszewska Ł., Wieczorek J.: *Arch. Immund. Ther. Exp.* **31**, 769 (1983).
72. Machoń Z., Wieczorek J., Mordarski M.: *Arch. Immund. Ther. Exp.* **35**, 599 (1987).
73. Brzozowski Z., Sączewski F., Gdaniec M.: *Eur. J. Med. Chem.* **35**, 1053 (2000).
74. Brzozowski Z., Sączewski F.: *Eur. J. Med. Chem.* **37**, 709 (2002).
75. Broom A.D.: *J. Med. Chem.* **32**, 2 (1989).
76. Gangjee A., Yu J., McGuire J.J., Cody V., Galitsky N., Kisliuk R.L., Queener S.F.: *J. Med. Chem.* **43**, 3837 (2000).
77. Barrow F., Thorneycroft F.J.: *J. Chem. Soc.* 769 (1939).
78. Overberger C.G., Michelbaf F.W., Corabateas P.M.: *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 942 (1957).
79. Brzozowski Z., Kamiński Z., Kozakiewicz I., Angielski S., Rogulski J.: *Acta Pol. Pharm.* **36**, 401 (1979).
80. Ehrlich P., Sachs F.: *Ber.* **32**, 2341 (1899).
81. Barrow F., Thorneycroft F.: *J. Chem. Soc.* 722 (1934).
82. Johnstone R.A.W.: „*Spektrometria masowa w Chemii Organicznej*”, PWN, Warszawa, 109 (1975).
83. Wittig G.: *Liebigs Ann.* **562**, 187 (1949).
84. Maryanoff B.E.: *Chem Rev.* **89**, 863 (1989).
85. Prousek J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **56**, 1358 (1991).
86. Piper J.R., Montgomery J.A.: *J. Org. Chem.* **42** (2), 208 (1977).
87. Rosowsky A., Chen K.K.N., Papathanasopoulos N.: *J. Heterocyclic Chem.* **13**, 727 (1976).
88. Graffner- Nordberg M., Fyfe M., Brattsand R., Mellgard B., Hallberg A.: *J. Med. Chem.* **46**, 3455 (2003).



89. Shiari T., Ninomiya K., Yamada S.: *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 6203 (1972).
90. Shioiri T., Yokoyama Y., Kasai Y., Yamada S.: *Tetrahedron* **32**, 2211 (1976).
91. Hamada Y., Shioiri T., Yamada S.: *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 221 (1977).
92. Pignatello R., Jansen G., Kathman J., Puglisi G., Toth J.: *J. Pharm. Sci.* **87**, 367 (1998).
93. Pignatello R., Spampinato G., Sorrenti V., Di Giacomo C., Vicari L., McGuire J.J., Russell C.A., Puglisi G., Toth I.: *Eur. J. Pharm. Sci.* **10**, 237 (2000).
94. Pignatello R., Guccione S., Forte S., Di Giacomo C., Sorrenti V., Vicari L., Baretta G.U., Balzano F., Puglisi G.: *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 2951 (2004).
95. DeGraw J.J., Christie P.H., Brown E.G., Kelly L.F.: *J. Med. Chem.* **27**, 376 (1984).
96. Struktury form protonowych **77A** i **77B** o najniższej energii wewnętrznej znaleziono na podstawie obliczeń kwantowo-chemicznych przy zastosowaniu metody semiempirycznej AM1. Do celów obliczeń używano program SPARTAN v. 5.0 zainstalowany na stacji roboczej Silicon Graphics 02.
97. Friebolin H.: „*Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*”, Wydanie 2, VCH Verlag, Weinheim, 293 (1993).
98. Eliel E.L., Wilen S.H.: „*Stereochemistry in Organic Compounds*”, John Wiley, New York, 502 – 505 (1994).
99. Das P.C., Patra B.B., Bose A.N., Basu U.P.: *Indian J. Chem.* **6**(12), 691 (1968).
100. Detweiler W.K., Amstutz E.D.: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 1483 (1952).
101. Brzozowski Z.: *Acta Pol. Pharm.* **55** (1), 49 (1998).
102. Shapiro S.L., Pavrino V.A., Freedman L.: *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 3728 (1959).