



Unione europea
Fondo sociale europeo



*Ministero dell'Istruzione
dell'Università e della Ricerca*



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTÀ DI FARMACIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
(XV CICLO)**

**SINTESI ED ATTIVITÀ ANTINEOPLASTICA DI NUOVI
COMPOSTI ETEROCICLICI**

Tesi di dottorato di ricerca della
Dott.^{ssa} Maria Valeria Raimondi

Coordinatore del Dottorato di Ricerca
Ch.mo Prof. Gaetano Dattolo

Tutor
Ch.mo Prof. Giuseppe Daidone

**DIPARTIMENTO DI CHIMICA E TECNOLOGIE FARMACEUTICHE
Anno Accademico 2002-2003**

INDICE

Introduzione	pag. 2
Obiettivi della tesi di dottorato	pag. 10
Risultati ottenuti	pag. 12
Parte sperimentale chimica	pag. 39
Parte sperimentale biologica	pag. 68
Riferimenti bibliografici	pag. 70

Introduzione

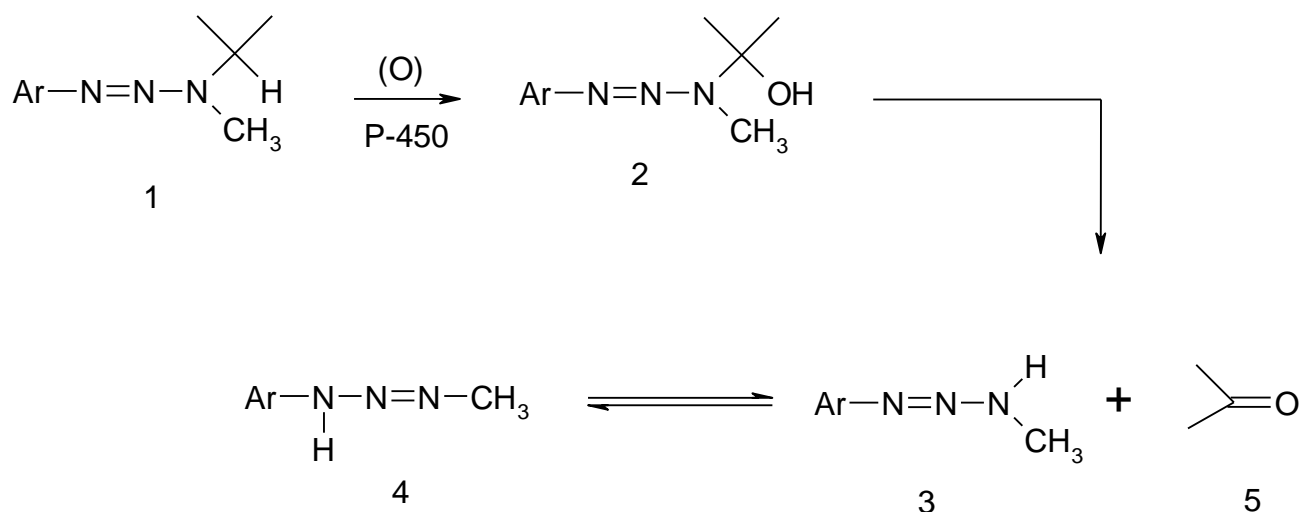
L'insorgenza della farmaco resistenza multipla, che rende molti farmaci inefficaci in seguito ad un primo trattamento chemioterapico, richiede in maniera pressante la disponibilità di nuovi agenti antitumorali che abbiano scarsa capacità di indurre farmaco resistenza.

L'attuale trattamento chemioterapico dei tumori è quasi sempre basato sull'uso combinato di farmaci che agiscono con diversi meccanismi d'azione, uno dei quali è spesso quello che porta all'alchilazione del DNA.

Una classe di composti alchilanti è rappresentata dai derivati triazenici il cui studio continua ad interessare diversi gruppi di ricerca [1, 2, 3]. Questi composti sono capaci di alchilare il DNA delle cellule tumorali, agendo principalmente a livello della guanina ed interessando l'atomo di azoto in posizione 7 e quello di ossigeno in posizione 6 [4, 5, 6, 7]. Questa azione sul DNA produce un danno per la cellula tumorale, sebbene in maniera poco selettiva rispetto alle cellule sane in rapida proliferazione come, ad esempio, quelle del midollo osseo.

Il principale meccanismo d'azione in vivo proposto per questi composti si basa sulla loro attivazione metabolica nel fegato per azione del citocromo P-450 [8, 9] che porta alla

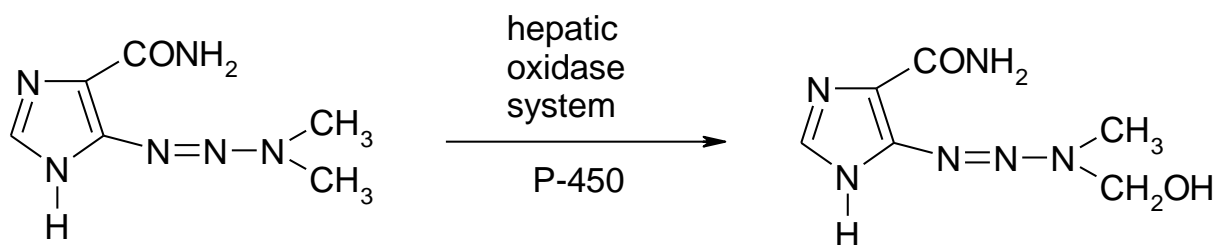
formazione di un 3-monoalchiltriazene instabile, che potrebbe agire direttamente o dare origine, per successive trasformazioni, alla specie alchilante [10]:



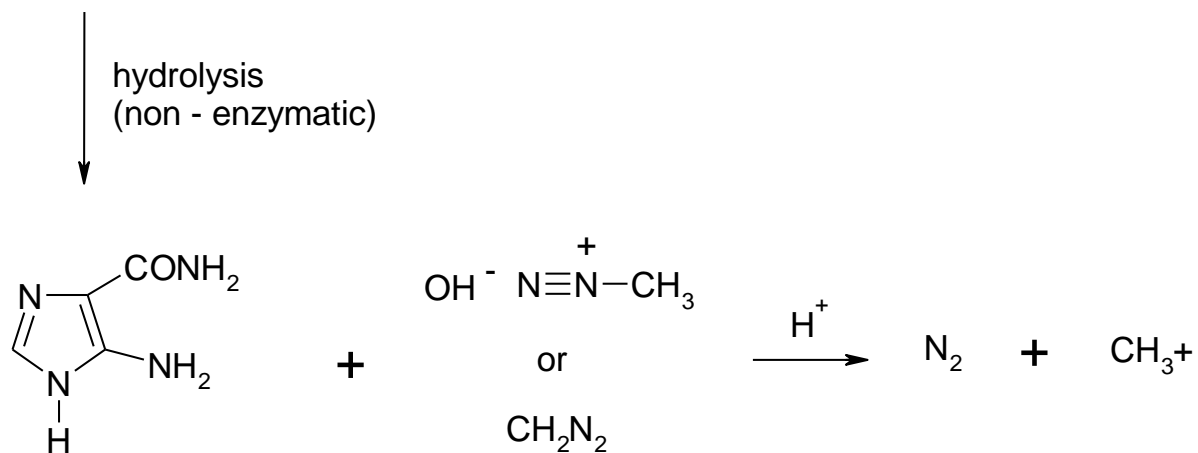
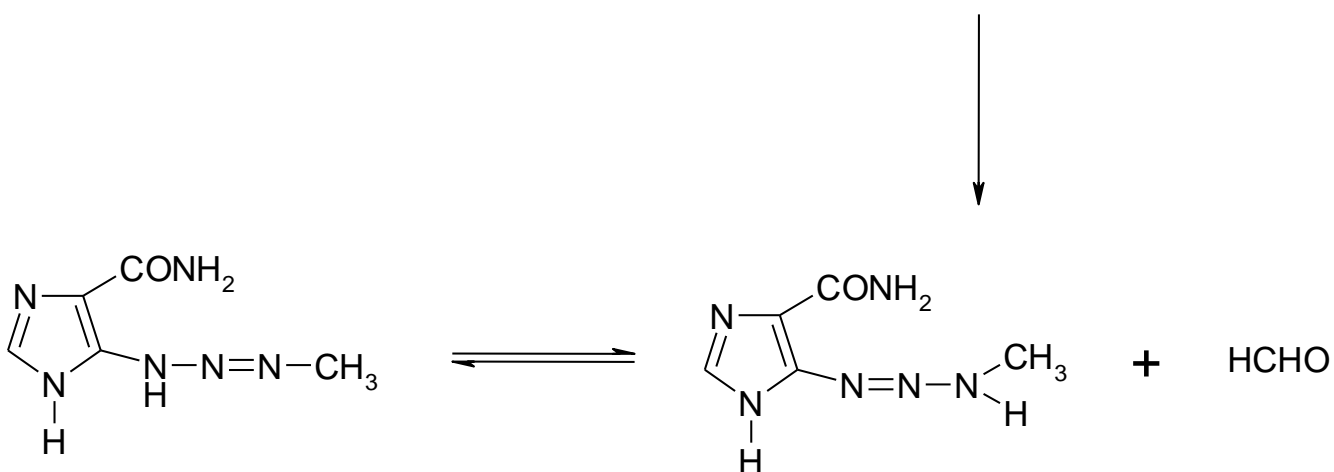
Oltre al meccanismo dell'attivazione metabolica sono stati proposti altri due possibili meccanismi d'azione. Il primo si basa sulla riformazione dei diazo-composti o sali di diazonio precursori del triazene, entrambi capaci di reagire con biomolecole [11, 12]. L'altro meccanismo è legato all'effetto antimetastatico di alcuni triazeni [13] tra i quali il DM-COOK, il sale di potassio dell'acido 4-(3,3-dimetiltriazeno-1-il)benzoico (DM-COOH), che viene demetilato in misura minima dai microsomi epatici. In questo caso il meccanismo è basato sull'inibizione delle proteasi neutre presenti sulla superficie delle cellule tumorali [14]. I vari meccanismi non sono incompatibili tra di loro e pertanto è possibile che i triazeni agiscano seguendo più meccanismi d'azione.

Tra i molti derivati triazenici, la **Dacarbazina**, il 5-(3,3-dimetil-1-triazenil)-imidazolo-4-carbossammide (**DTIC**) è il farmaco più rappresentativo di questa classe, essendo il farmaco più attivo contro il melanoma maligno [15].

Il meccanismo d'azione della Dacarbazina che viene generalmente accettato è esemplificato nello schema seguente:



Dacarbazine (DTIC)



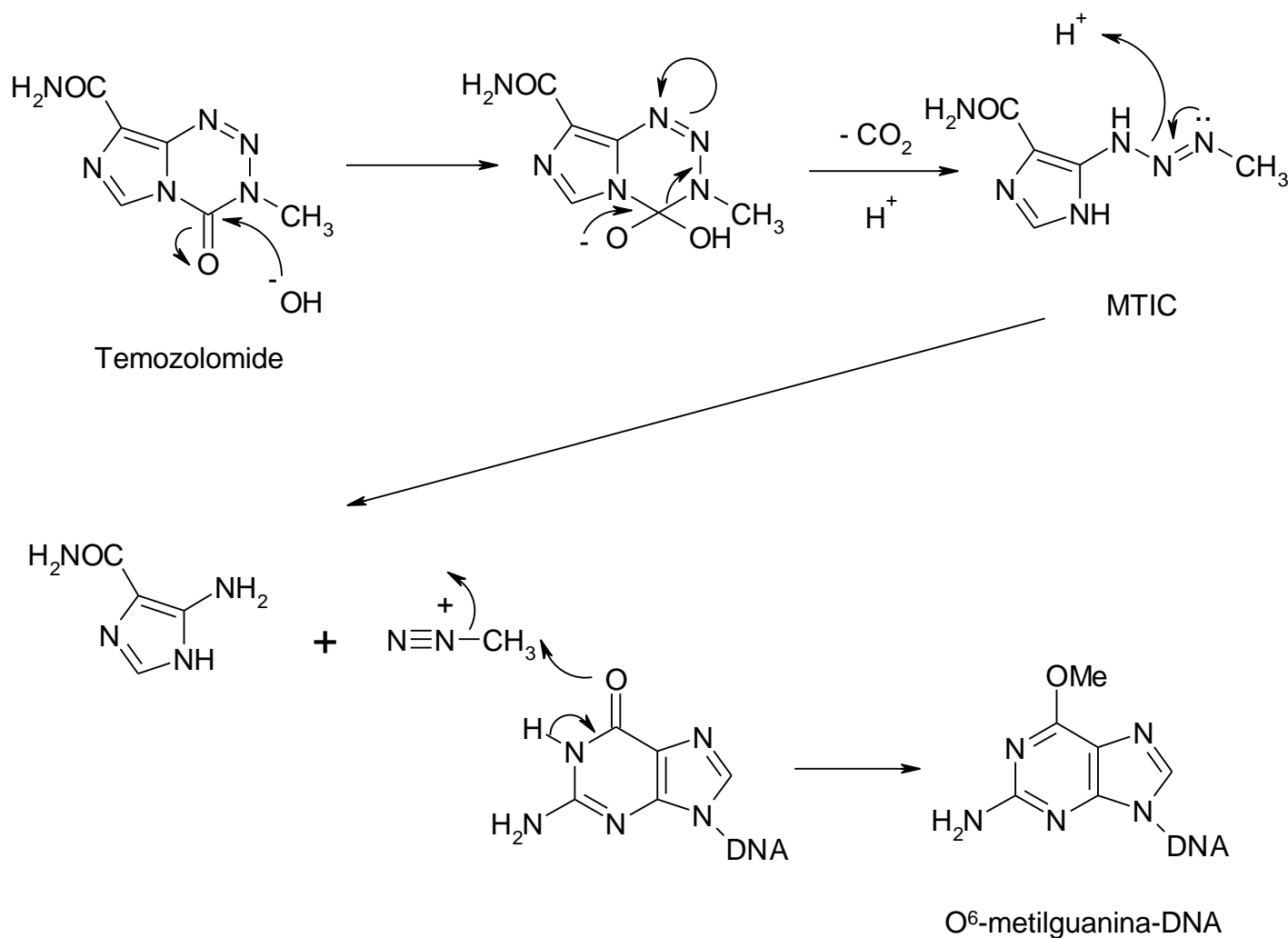
Nonostante sia ritenuto che la Dacarbazina possa agire solo dopo attivazione metabolica in vivo o attivazione microsomiale in vitro, in letteratura è riportato che essa ha mostrato attività in vitro contro le linee cellulari GM892A (IC_{50} 16 μ M) e Raji (IC_{50} 128 μ M) [16].

La Dacarbazina è usata in diverse associazioni con farmaci come il BCNU, CCNU, Vincristina, Procarbazine, Ciclofosfamide, Metotressato, 5-Fluorouracile, Prednisone, Actinomicina e Bleomicina. In particolare, la combinazione di Doxorubicina, Bleomicina, Vinblastina e Dacarbazina è efficace contro la malattia di Hodgkin resistente alla terapia MOPP, una combinazione di Mecloretamina, Vincristina, Procarbazine e Prednisone [17]. In uno studio clinico in fase I-II [18] la Dacarbazina è stata usata in associazione con nucleotidi antisenso (Augmerosen, Genasense, G3139)

Il gruppo arilico o eteroarilico legato nella posizione 1 del triazene ha funzione di carrier del gruppo farmacoforo e può influire sull'attività modulando le proprietà farmacocinetiche del farmaco e la sua stabilità. E' riportato, infatti, che i triazenopirazoli e i triazenotriazoli, pur essendo fotosensibili, si decompongono più lentamente dei triazenoimidazoli [19] e che i triazenoindoli sono alquanto più attivi dei triazenopirroli [20].

Nel passato decennio la ricerca per profarmaci stabili del monometiltriazene derivato dalla Dacarbazina ha portato all'ottenimento della **Temozolomide**, l'8-carbamoil-3-metil-

imidazo-[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, un farmaco che non richiede attivazione metabolica [21, 22]. Nell'agosto del 1999 è stata approvata negli U.S.A. dalla FDA una specialità medicinale denominata **Temodal** contenente Temozolomide, indicata per il trattamento del tumore refrattario del cervello [23]. La Temozolomide è sotto indagine clinica per la cura di altri tumori [24, 25].



Recentemente è stata riportata la sintesi di benzo-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-oni che presentano attività superiore alla **Temozolomide** nei confronti di cellule tumorali Mer+ resistenti agli agenti alchilanti, in alcuni casi con un rapporto di 10 a 1, come avviene per il MOPH (Figura 1).

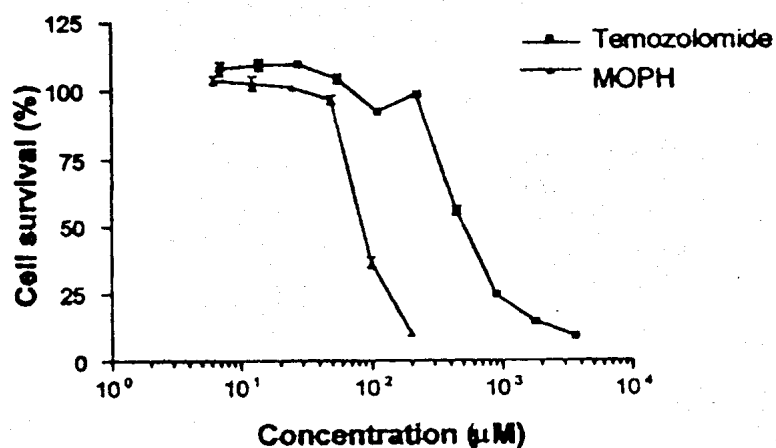
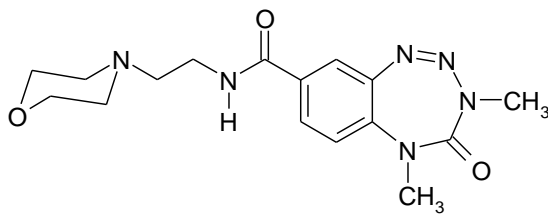


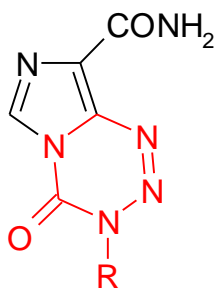
Figura 1. Curva dose-risposta delle cellule MCF7 esposte alla Temozolomide e al MOPH per 72h.



MOPH

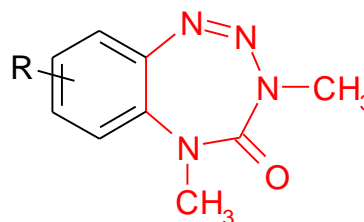
Sebbene sia presente nell'anello tetrazepinonico la sequenza atomica che si riscontra in quello tetrazinonico, questi derivati sono deboli agenti alchilanti, tuttavia provocano significativamente la rottura del filamento singolo di DNA che induce inibizione della sintesi di altro DNA e arresto del ciclo cellulare. I dati raccolti fino ad ora suggeriscono che questa nuova classe di agenti antitumorali danneggia il DNA con meccanismo d'azione del tutto differente da quello seguito dalla temozolomide e altri agenti alchilanti correlati.

Infatti, è stato dimostrato che i derivati benzetrazepinonici subiscono l'apertura dell'anello, senza tuttavia produrre un monometiltriazeno, formando derivati benzoimidazolinici e benzoossazolinici. Tali derivati, comunque, non sono i metaboliti attivi [26, 27] e pertanto il farmaco agisce come tale o mediante specie reattive intermedie. Tra i derivati tetrazepinonici condensati riportati in letteratura, soltanto alcuni portano un anello eterociclico.



R = CH₃, CH₂CH₂Cl

Imidazotetrazinone



R = H, Alg, NO₂, CONHR₁

Benzotetrazepinone

Obiettivi della tesi di Dottorato

1) In considerazione della diversa influenza che i vari eterocicli legati nella posizione 1 del sistema triazenico possono avere sulle proprietà farmacocinetiche, sulla stabilità e quindi sull'attività degli 1-eteroaril-3,3-dialchiltrialeni, e tenuto conto che i dati di letteratura indicano che gli eterocicli legati nei derivati triazenici sono principalmente monociclici, mi sono proposta di preparare nuovi derivati che portino il nucleo eterociclico condensato con quello benzenico, al fine di verificare se la benzocondensazione può portare all'aumento dell'attività. A tal fine è stata prevista la sintesi di trizenoindazoli e trizenopirazoli per effettuare la comparazione. Con questi nuovi dati si potranno estendere le conoscenze sulla SAR dei derivati triazenici.

2) I diazocomposti intermedi da cui derivano i triazeni sopra citati, che presentano gli opportuni requisiti strutturali, verranno fatti reagire con alchilisocianati con l'obiettivo di ottenere derivati contenenti il sistema 1,2,3,5-tetrazinonico, profarmaci dei monoalchiltrialeni ed analoghi della Temozolomide. L'ottenimento di questi derivati permetterebbe di verificare se essi possono offrire dei vantaggi rispetto alla Temozolomide, unico farmaco a struttura tetrazinonica attualmente in commercio.

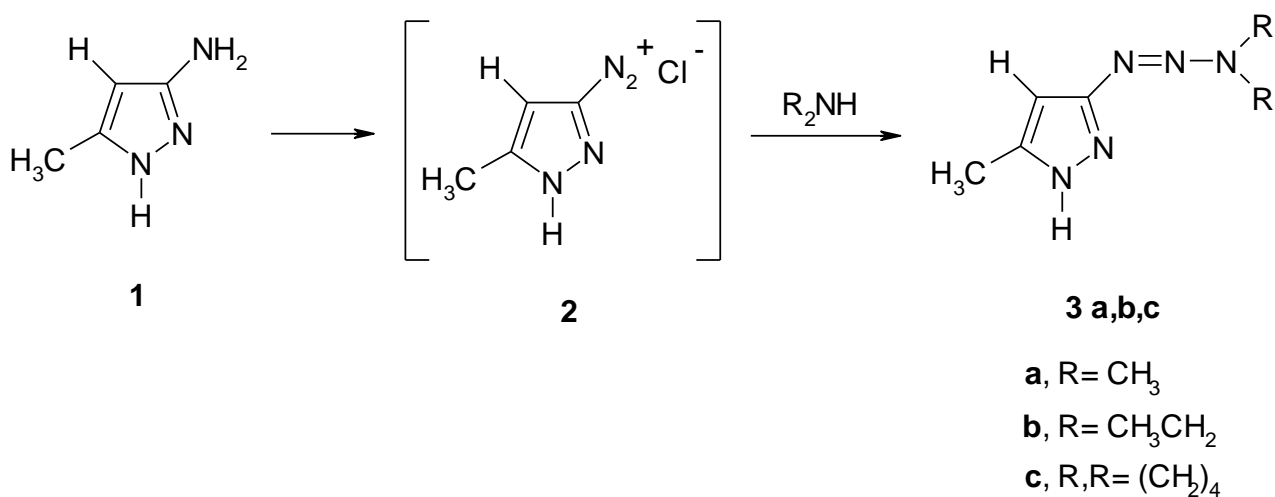
3) Infine, considerando che i derivati benzo tetrazepinonici mostrano attività su cellule resistenti agli agenti alchilanti, presentando così una notevole potenzialità terapeutica, e che poco si conosce sulla SAR di questa classe di derivati, verrà tentata la sintesi di derivati tetrazepinonici in cui l'anello tetrazepinonico è condensato con un nucleo eterociclico, verificando così se questa nuova classe di eterocicli condensati può portare a dei vantaggi per l'attività antitumorale rispetto ai benzo tetrazepinoni.

L'attività antiproliferativa dei composti sintetizzati verrà valutata su alcune linee cellulari leucemiche umane come K562 e HL60, leucemie murine come L1210 e su tumori solidi come MCF7.

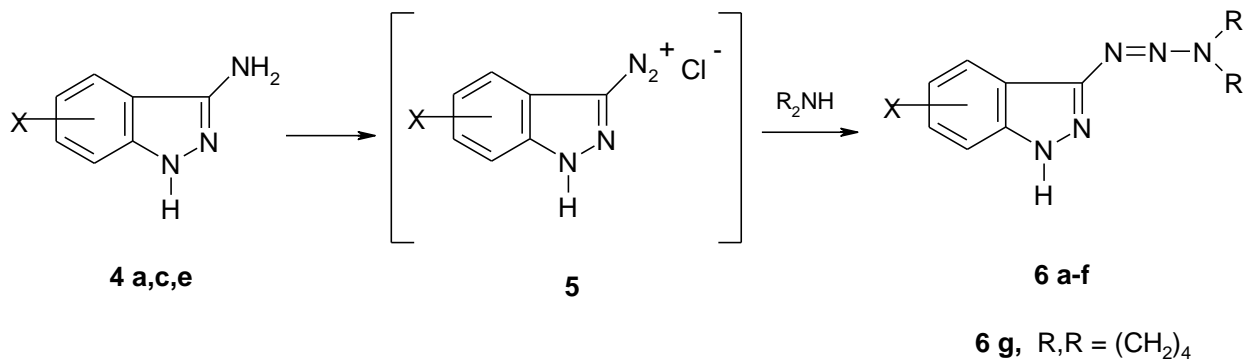
Risultati ottenuti

1. I triazeni **3a-c**, **6a-g**, **9c-f** sono stati preparati come mostrato negli schemi 1, 2 e 3, tramite reazione degli intermedi sali di diazonio **2**, **5** e **8** con dimetilammina, dietilammina e pirrolidina.

Schema 1

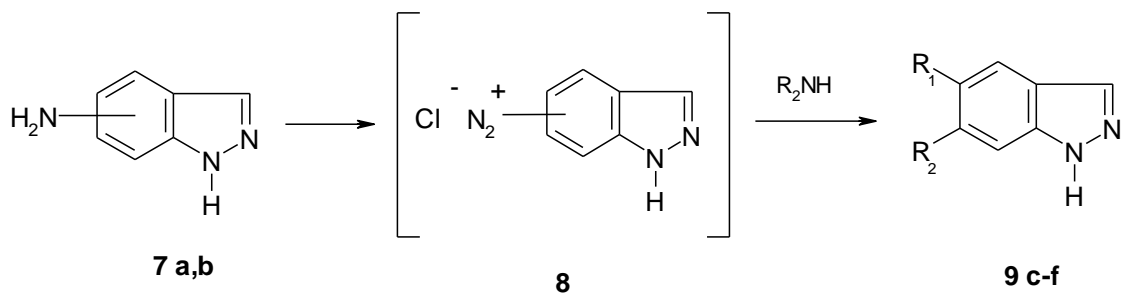


Schema 2



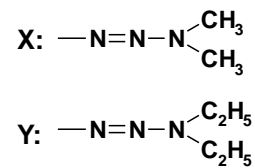
4,5,6	a	b	c	d	e	f
R	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅
X	H	H	5-Cl	5-Cl	6-Cl	6-Cl

Schema 3

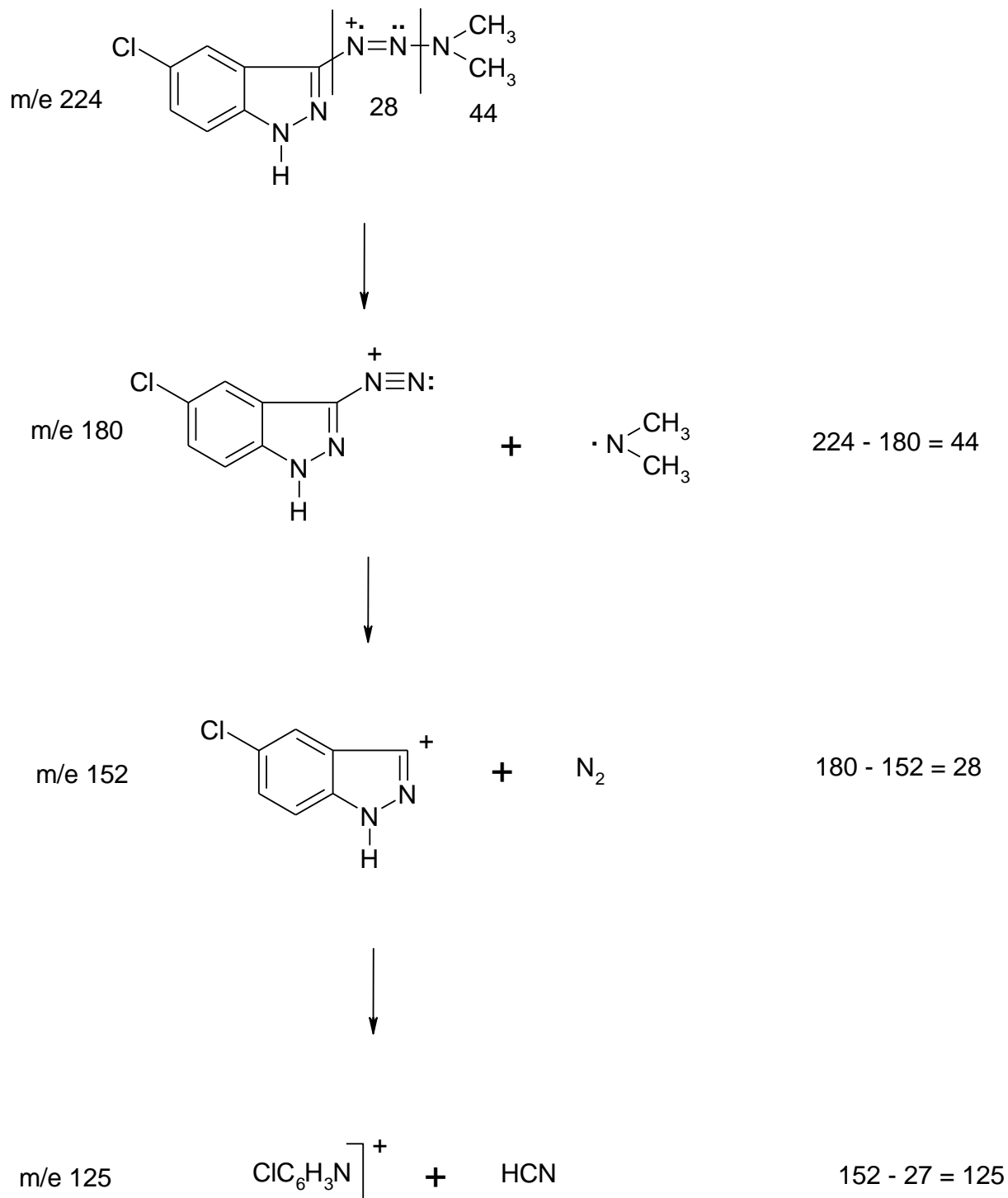


a: 5-NH₂
b: 6-NH₂

9	c	d	e	f
R₁	5-X	5-Y	H	H
R₂	H	H	6-X	6-Y



Gli spettri di massa dei derivati triazenici mostrano una frammentazione tipica che è esemplificata con il composto **6c**.



Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei dimetiltriazenoindazoli hanno mostrato che la barriera rotazionale intorno al legame $\text{N}_2\text{-N}_3$ nel gruppo triazenico può essere influenzata dalla posizione di tale gruppo nel nucleo indazolico, come pure dal modello di sostituzione nel nucleo benzenico condensato. Infatti, gli spettri in CDCl_3 o DMSO del 3-(3',3'-dimetiltriazeno)indazolo **6a** hanno mostrato per i gruppi metilici un unico segnale molto allargato e centrato a circa 3.4 δ , consistente con una parziale equivalenza magnetica degli idrogeni dei due gruppi metilici, mentre nel caso degli isomeri posizionali 5 e 6-(3',3'-dimetiltriazeno)indazoli **9c**, e gli spettri NMR hanno mostrato un singoletto netto per i due metili. La differenza osservata per questi isomeri posizionali è probabilmente dovuta al diverso contributo delle forme di risonanza **6_B** e **9_B** alla struttura degli isomeri **6a** e **9c,e** (fig. 2). Per i 3-dimetiltriazenoindazoli **6c,e** sostituiti nelle posizioni 5 o 6 con un atomo di cloro, gli spettri NMR presentano per i due gruppi metilici due singoletti allargati e centrati rispettivamente a 3.20 e 3.57 δ . I due distinti segnali sono dovuti ad un aumento della barriera rotazionale intorno al legame $\text{N}_2\text{-N}_3$ nei composti sostituiti **6c,e** rispetto al triazene non sostituito **6a**. La forma di risonanza **6_B** per i composti sostituiti è più stabilizzata per la presenza dell'atomo di cloro elettroneattrattore nelle posizioni 5 o 6. La maggiore separazione dei singoletti per i metili si ha nel caso

dell'isomero 6-cloro e pertanto è da invocare un effetto più intenso da quella posizione.

I dietiltriazeni presentano un profilo diverso dei dimetiltriazeni. Per tutti questi composti gli spettri mostrano segnali unici, un quadrupletto ben splittato, per la porzione metilenica dei due gruppi etilici ed un unico segnale per i rimanenti metili, che è un tripletto per i 5 o 6-dietiltriazenoindazoli **9d,f** oppure un singoletto più o meno allargato per il 3-dietiltriazenoindazolo **6b** e per i 5 e 6-cloro-3-dietiltriazenoindazoli **6d,f**.

In contrasto ai dietiltriazeni, il 3-(3',3'-tetrametilen triazeno)-6-cloroindazolo **6g** produce nello spettro NMR due distinti segnali a 3.59 e 3.95 δ per i due gruppi metilenici direttamente legati all'atomo di azoto 3'.

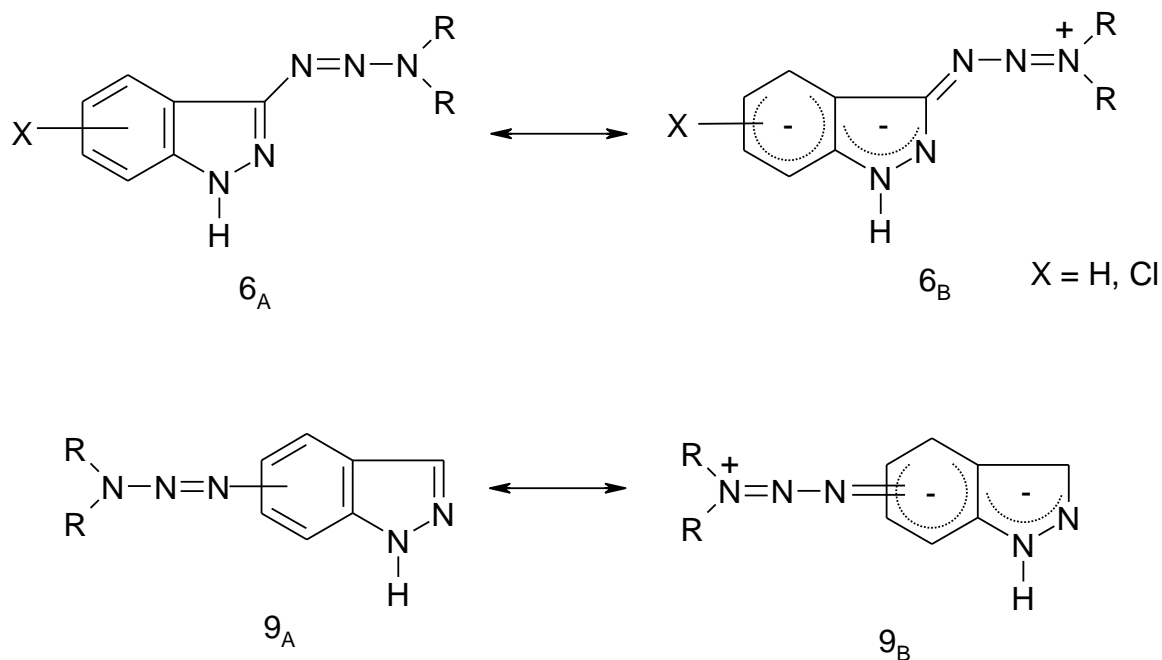


Figura 2.

Tra i triazenopirazoli, il derivato dietilico produce nello spettro NMR segnali unici per i due etili, ossia un tripletto e un quadrupletto ben splittati. Nel caso del dimetil- e del tetrametilenderivato, i due gruppi metilici, come pure i due gruppi metilenici legati all'atomo di azoto 3' del gruppo triazenico, mostrano un segnale molto allargato.

Per quanto riguarda la valutazione biologica, i composti **3**, **6** e **9** sono stati da me saggiati *in vitro* per l'attività antiproliferativa contro le linee cellulari K562 (leucemia mieloide cronica umana), HL60 (leucemia linfocitaria umana), MCF7 (adenocarcinoma mammario umano) e L1210 (leucemia murina). Le percentuali di inibizione della crescita registrate a 100 μ M per i composti testati sono riportate in Tabella 1. I composti sono stati saggiati in assenza di attivazione microsomiale poichè diversi triazenoindoli e triazenopirroli, bioisosteri dei derivati indazolici e pirazolici, sono risultati attivi in tale condizione sperimentale [20, 28].

I valori delle IC_{50} determinate per i composti che mostrano a 100 μ M una percentuale di inibizione della crescita uguale o maggiore al 50% sono riportate in Tabella 2.

Profili differenti di inibizione sono stati osservati per le diverse linee cellulari utilizzate.

I derivati dimetiltriazeno e dietiltriazenoindazoli **6a,b** sono più attivi dei corrispondenti derivati pirazolici **3a,b**. La presenza di un atomo di cloro nella posizione 5 o 6 dei 3-dimetiltriazenoindazoli **6c,e** comporta quasi sempre una diminuzione dell'attività antiproliferativa rispetto ai prodotti non sostituiti, mentre per gli analoghi etilici **6d,f** si ha un aumento dell'attività nei confronti delle K562 e HL60. Per le linee cellulari L1210 e MCF7 si ha, tranne in un caso, una lieve diminuzione dell'attività.

Per quanto riguarda la posizione del gruppo dimetiltriazenico legato al nucleo indazolico, sembra che le posizioni 3, 5 e 6 comportino complessivamente un'attività simile. Per i derivati etilici, la sostituzione in 3 sembra essere la più vantaggiosa. Infine, tra i tutti i composti saggiati, il composto risultato più attivo nei confronti delle quattro linee cellulari è il 3-dietiltriazeno-5-cloroindazolo **6d**.

Come si evince dalla Tabella 1, la Dacarbazina presenta in assenza di attivazione microsomiale una piccola attività antiproliferativa *in vitro*, nei confronti delle K562, HL60 e MCF7 suggerendo che i composti più attivi potrebbero agire mediante un meccanismo d'azione diverso da quello seguito dalla Dacarbazina, dopo che essa subisce attivazione metabolica o microsomiale, che porta alla metilazione del DNA.

Concludendo, questi dati confermano il ruolo positivo della benzocondensazione per l'attività antiproliferativa dei dialchiltriazeni già osservato in serie indolica [20].

I dati chimici e biologici relativi ai derivati triazenici sopra riportati sono oggetto di un lavoro dal titolo: "Synthesis and Antiproliferative Activity of Triazenoindazoles and Triazenopyrazoles: A Comparative Study" accettato per la pubblicazione in data 20 novembre 2003 sull'European Journal of Medicinal Chemistry.

Tabella 1. Percentuali di inibizione della crescita registrate sulle linee cellulari K562, HL60, L1210 e MCF7 alla concentrazione screening di 100 μ M.

	K562	HL60	L1210	MCF7
Composti	% Inibizione			
3a	28.7	33.8	41.7	23.7
3b	34.7	50.0	70.5	31.7
3c	19.4	30.9	41.4	na
6a	73.3	42.8	92.1	33.4
6b	56.1	75.0	100	59.1
6c	50.0	35.7	75.7	18.2
6d	100.0	100.0	87.5	91.2
6e	38.2	41.0	37.5	13.5
6f	79.3	94.6	96.5	46.7
6g	42.0	24.0	49.6	na
9c	73.0	59.2	100.0	13.6
9d	39.0	61.1	22.9	21.4
9e	70.3	75.3	99.1	44.7
9f	40.3	61.0	34.2	32.2
Dacarbazina	22.2	33.0	10.2	29.0

na = non attivo.

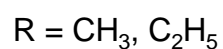
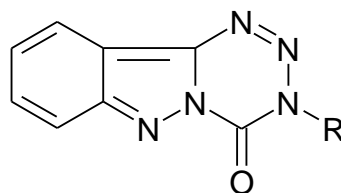
I valori sono la media di almeno tre indipendenti determinazioni; la variazione era meno del 15%.

Tabella 2. Determinazione della IC_{50} (μ M) dei composti più attivi registrata sulle linee cellulari K562, HL60, L1210 e MCF7.

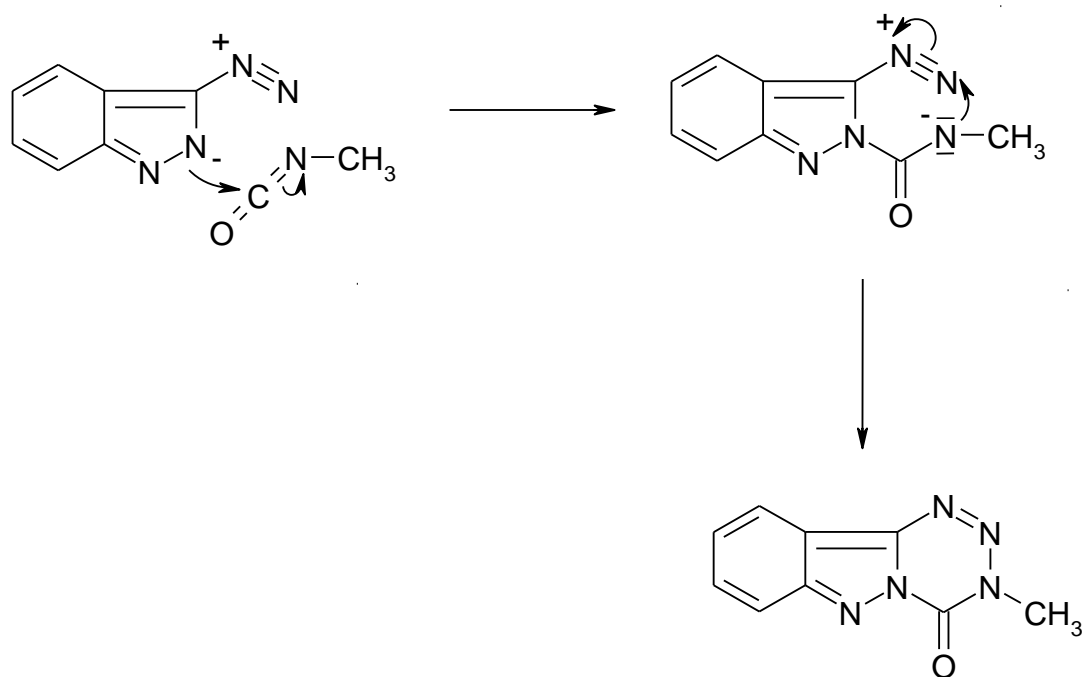
	K562	HL60	L1210	MCF7
Composti	IC_{50} (μM)			
3b	>100	>100	91.0	>100
6a	87.1	>100	20.0	>100
6b	71.0	41.7	17.0	90.1
6c	>100	>100	33.0	>100
6d	20.0	11.7	23.0	33.0
6f	44.5	35.5	18.0	>100
9c	75.9	91.3	17.0	>100
9d	>100	81.7	>100	>100
9e	60.0	39.2	20.0	>100
9f	>100	43,8	>100	>100

I valori sono la media di almeno tre indipendenti determinazioni; la variazione era meno del 15%.

2. Nell'ambito del secondo obiettivo sono stati fatti alcuni tentativi per l'ottenimento del sistema 1,2,3,5-tetrazino-[5,4-b]-indazolo-4(3H)-one:

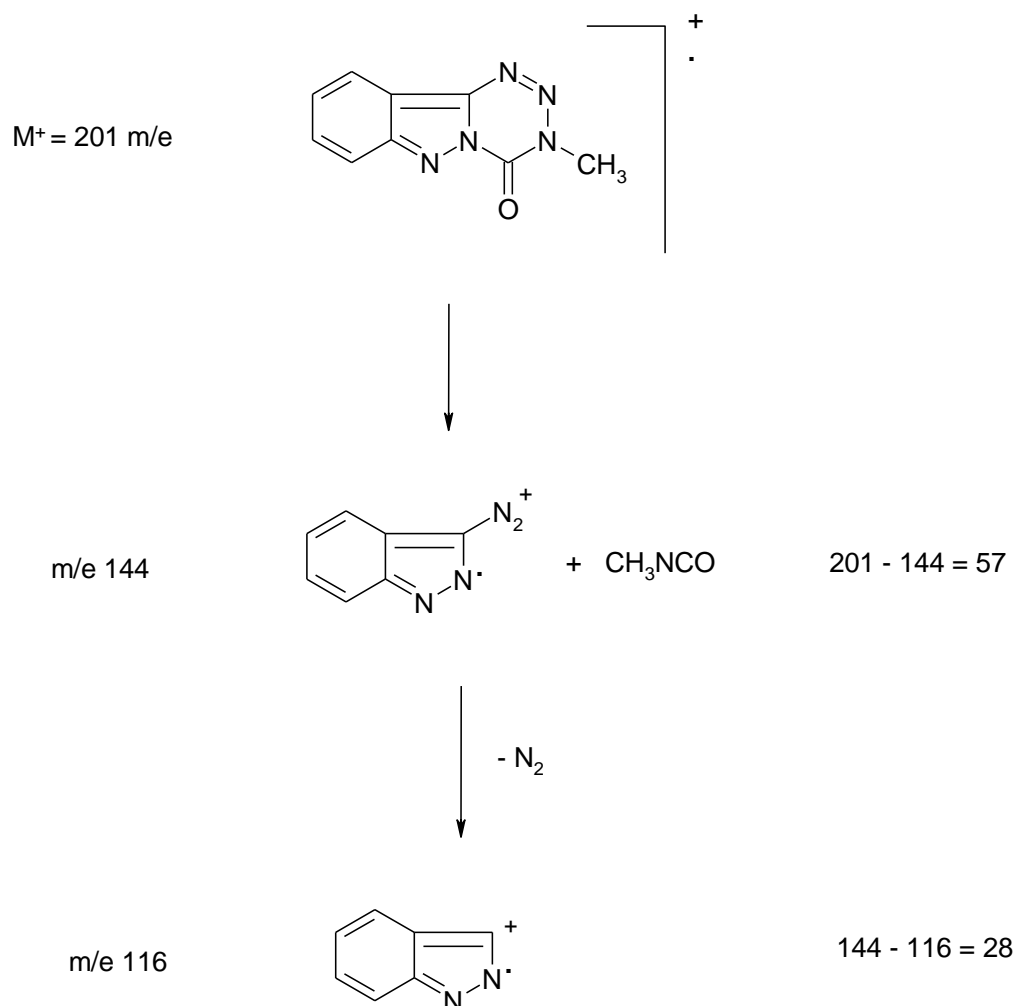


In analogia alla preparazione della **Temozolomide** è stata sfruttata la reazione tra il diazoindazolo e un isocianato alchilico. La reazione, rappresentata nello schema seguente, è classificabile come una cicloaddizione:

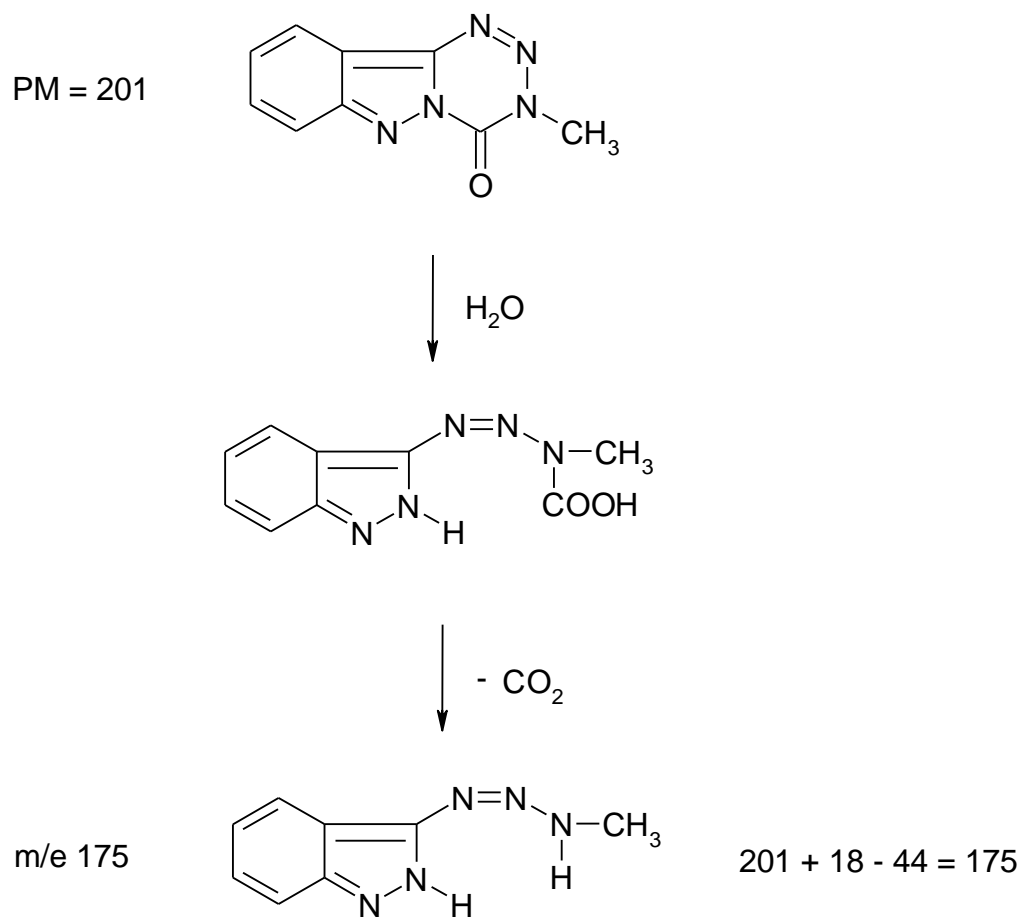


La reazione tra metilisocianato e diazoindazolo ha prodotto una miscela di reazione che è stata studiata in gas-massa. Dai dati ottenuti sembra che il tetrazinone cercato si formi in piccole tracce, mentre vi è l'indicazione di un prodotto principale corrispondente al monometiltriazeno.

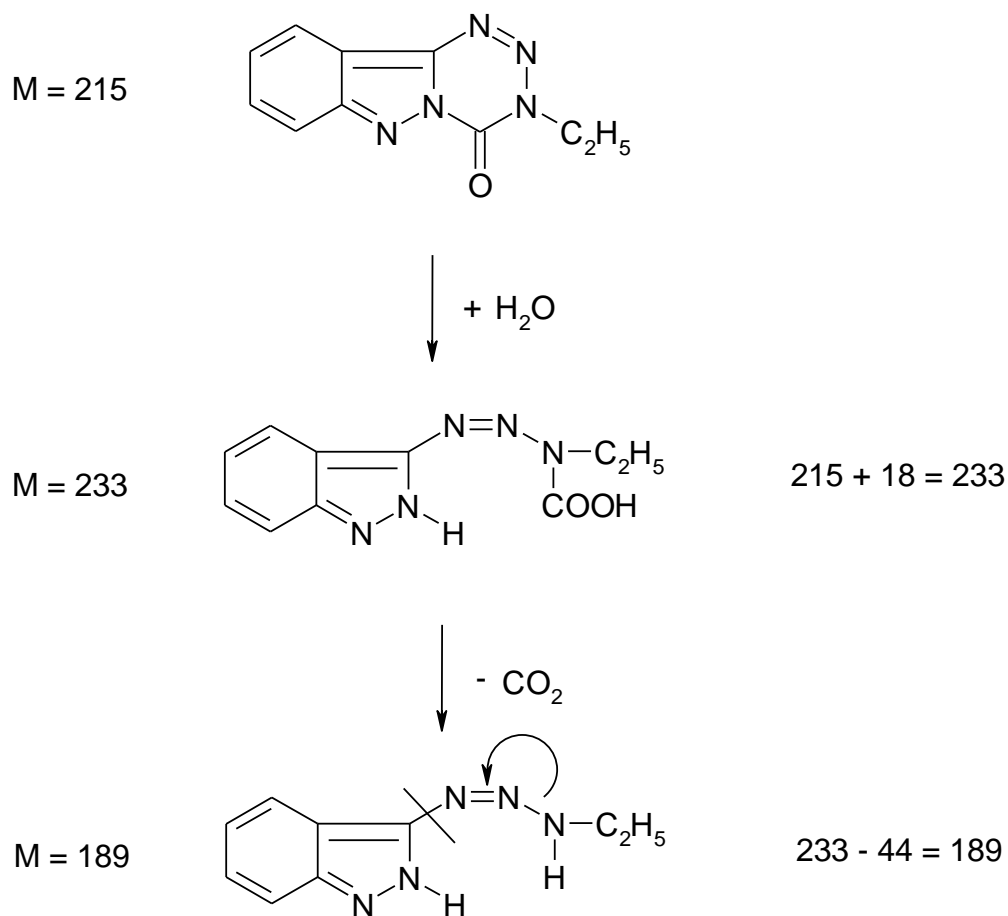
Infatti, lo spettro di massa relativo al picco cromatografico con tempo di ritenzione di circa 28 minuti, presenta il molecolare per il derivato tetrazinonico. La frammentazione accorda con la relativa formula di struttura:



Il componente più abbondante della miscela di reazione presenta un picco molecolare a 175 m/e che accorda per un monometiltriazeno proveniente dal tetrazinone:



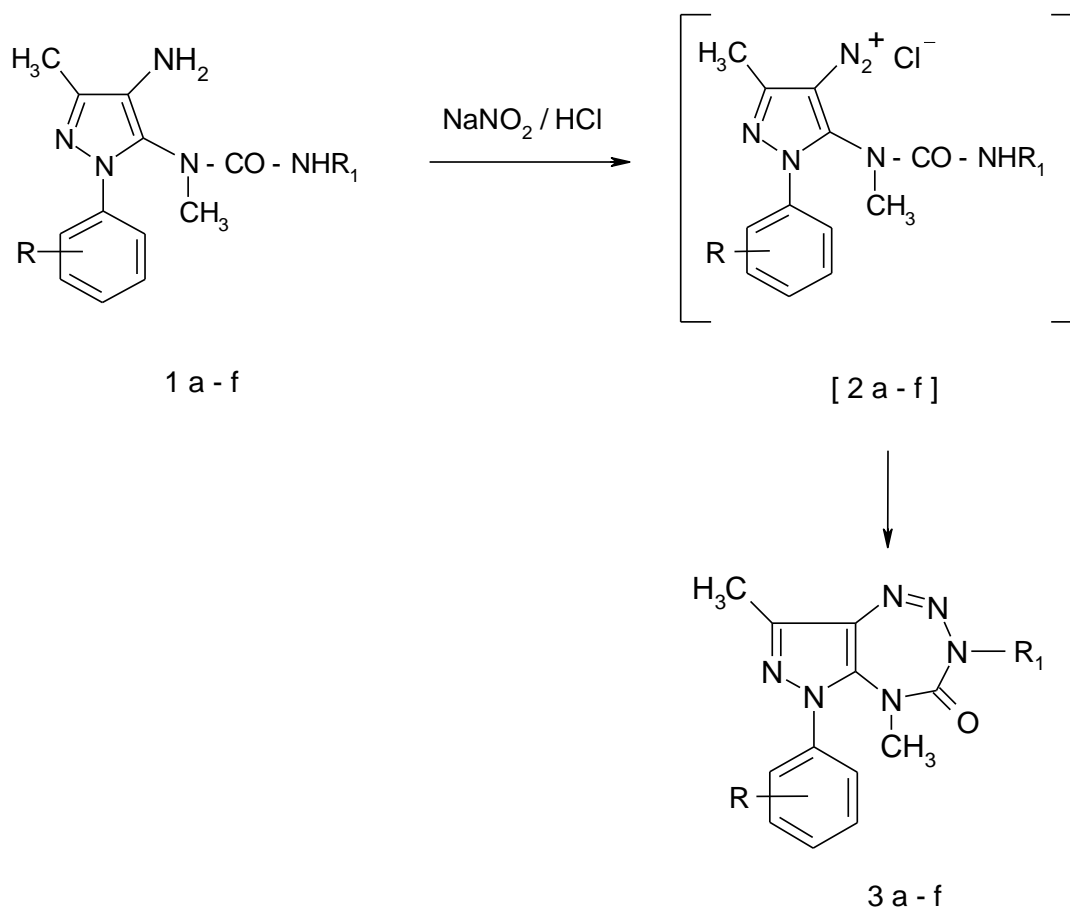
Il diazoindazolo è stato messo a reagire anche con l'etile isocianato, e la miscela di reazione è stata sottoposta a indagine gas-massa ottenendo l'indicazione della formazione di vari prodotti, tra i quali il più abbondante ha presentato nello spettro di massa un picco molecolare a 189 m/e, che accorderebbe per il monoetiltriazene formatosi per apertura idrolitica del tetrazinone e successiva decarbossilazione:



I dati ottenuti per i due termini mostrano un'elevata reattività degli indazolotetrazinoni alchil-sostituiti nei confronti dell'acqua. Poichè si è operato in condizioni anidre, è possibile che la trasformazione dei tetrazinoni possa essere avvenuta durante la procedura di ottenimento degli spettri. Poichè alcuni tentativi di cristallizzazione del grezzo di reazione non hanno portato ad alcun risultato, ho cromatografato la miscela proveniente dalla reazione dell'etile isocianato con il diazoindazolo, ottenendo soltanto il monoetiltriazene in basse rese. A questo punto, l'altra miscela di reazione non è stata cromatografata.

3. Parte del mio lavoro è stato dedicato alla sintesi dei pirazolo-[3,4-f]-1,2,3,5-tetrazepinoni **3** che prevede la chiusura dei derivati ureici **1** in seguito a diazotazione:

Schema 4



1, 2, 3	a	b	c	d	e	f
R	H	H	3-Cl	3-Cl	3,5-Cl ₂	3,5-Cl ₂
R₁	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅

Inizialmente è stata tentata la sintesi dei tetrazepinoni **3a,b** partendo dal 5-ammino-pirazolo **4a**. Questo è stato acetilato dando **5a** che in seguito a metilazione e desacetilazione ha prodotto il derivato metilamminico **7a** (Schema 5).

In seguito a nitrosazione e poi riduzione è stato ottenuto il derivato 4-amminopirazolico **9a**.

Per reazione di questo intermedio con metilisocianato non è stato ottenuto il prodotto desiderato **1a** ma quello **10a**, dovuto questo alla maggiore nucleofilia del gruppo 4-NH₂ rispetto a quello 5-NHCH₃ (Schema 6).

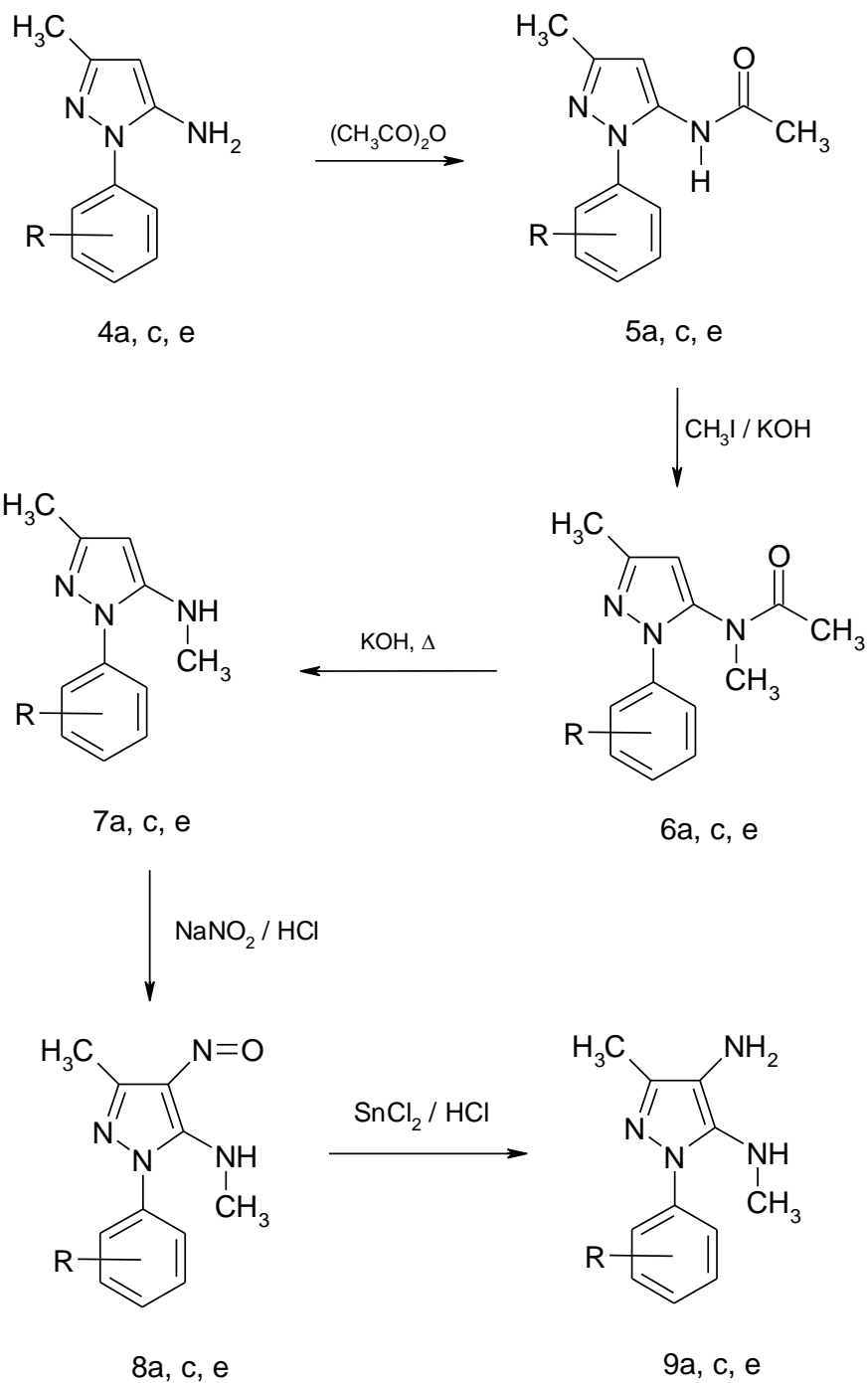
A questo punto è stato protetto il gruppo amminico in 4 facendo reagire il composto **9a** con cloroformiato di benzile, ottenendo così il derivato protetto **11a** che è stato messo a reagire con i due alchilisocianati, ottenendo i derivati **12a,b**, che sono stati deprotetti con idrogeno in presenza di C/Pd.

I nuovi composti sono stati identificati sulla base degli spettri MS, IR, NMR e analisi centesimale.

A questo punto l'ammina **1a** è stata diazotata tenendo la miscela di reazione a 0-5°C e dopo aggiustamento del pH, estrazione con solvente e purificazione cromatografica dell'estratto, è stato ottenuto un derivato pirazolotriazolico **13a** che è diverso dal prodotto atteso. Questo dato indica che il derivato tetrazepinonico **3a** è instabile a temperatura ambiente e pertanto perde metilisocianato per dare il derivato triazolico.

La reazione è stata ripetuta diazotando intorno a -5°C , e le operazioni di aggiustamento del pH, estrazione ed evaporazione del solvente sono state effettuate in modo tale da non superare 0°C . Questa volta lo spettro NMR ha dato indicazione della presenza del derivato tetrazepinonico **3a** in miscela con una piccola quantità del derivato triazolico. Dal rapporto dell'altezza delle linee di integrazione dei due segnali di riferimento si evince che il rapporto tetrazepinone/triazolo è di circa 11.8/1. La soluzione usata per la registrazione dello spettro NMR è stata allora lasciata per 24h a temperatura ambiente e quindi lo spettro è stato nuovamente registrato mostrando stavolta una situazione diversa da quella precedente. Infatti i segnali per il derivato pirazolotriazolo si sono intensificati mentre quelli per il tetrazepinone si sono indeboliti. Prendendo gli stessi segnali di riferimento, il rapporto tetrazepinone/triazolo è risultato di 1/3.6. Nello spettro compare il segnale per il metilisocianato a circa 3δ .

Schema 5

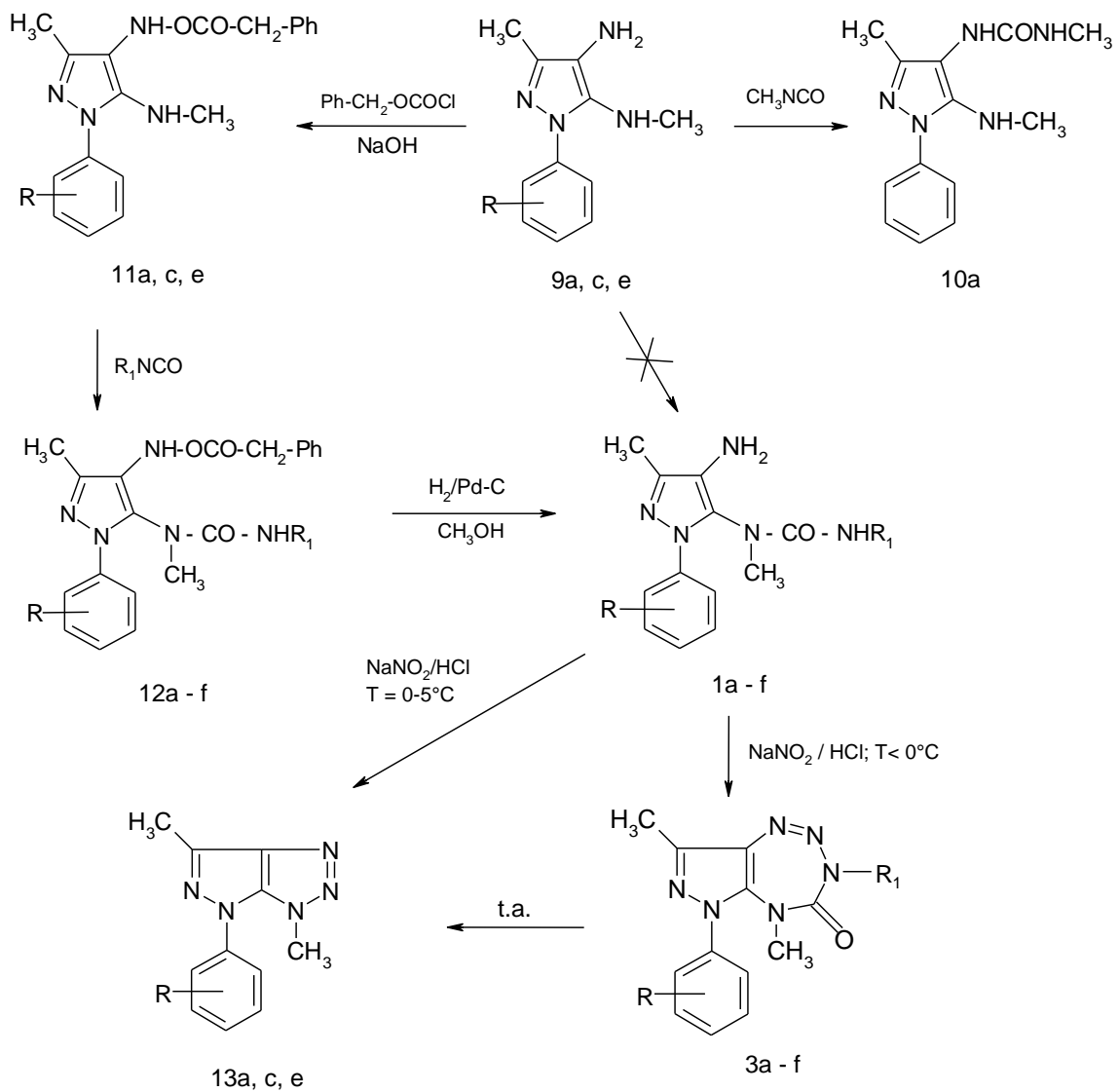


a: R = H

c: R = 3-Cl

e: R = 3,5-Cl₂

Schema 6



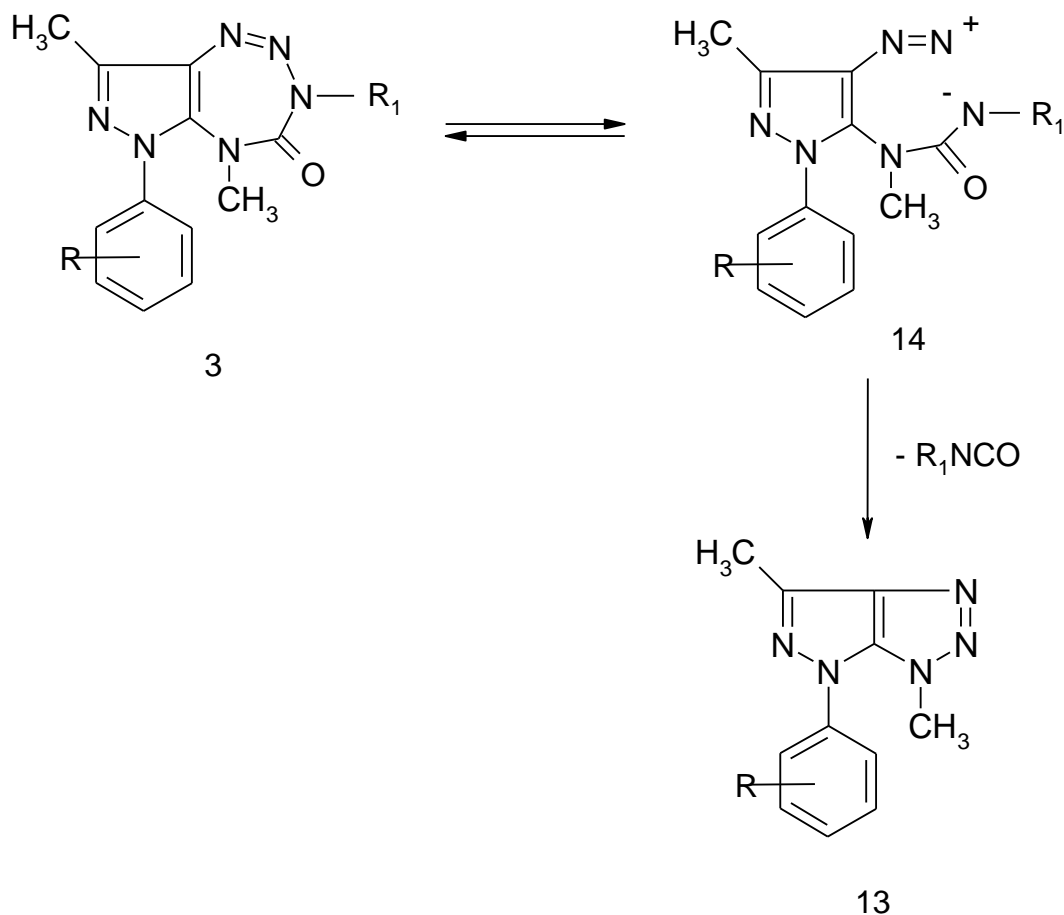
3, 9, 13	a	b	c	d	e	f
R	H	H	3-Cl	3-Cl	3,5-Cl ₂	3,5-Cl ₂
R₁	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅

La diazotazione è stata eseguita anche sull'ammina **1b** adottando tutti gli accorgimenti previsti per **1a**, allo scopo di ridurre la trasformazione del tetrazepinone. Anche in questo caso lo spettro NMR indica la presenza del tetrazepinone nel grezzo di reazione ottenuto, che è comunque accompagnato dal derivato pirazolotriazolico. Il rapporto tetrazepinone/triazolo risulta essere di circa 5/1. Lasciando la soluzione a temperatura ambiente per due giorni sono scomparsi del tutto i segnali per il tetrazepinone, mentre sono ben evidenti quelli per il pirazolotriazolo e per l'etilisocianato che si sono formati.

Considerando questi dati, è stato ritenuto inutile effettuare i saggi antiproliferativi, poichè in quelle condizioni i due composti si sarebbero trasformati, e pertanto si è tentato di preparare dei derivati tetrazepinonici che fossero stabili a temperatura ambiente.

La formazione del pirazolotriazolo per apertura del tetrazepinone può essere giustificata considerando un intermedio dipolare che può subire rapida ciclizzazione a pirazolotriazolo con perdita di alchilisocianato:

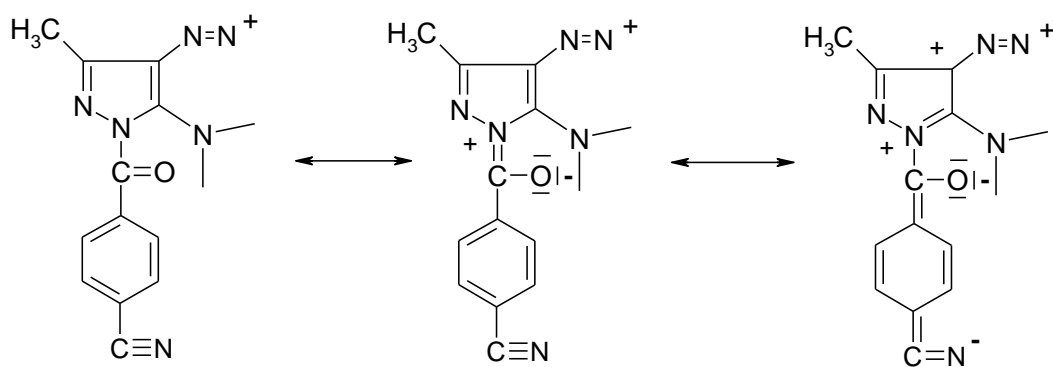
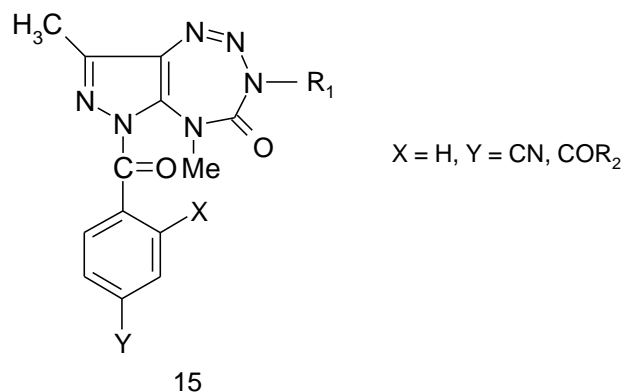
Schema 7



3, 13, 14	c	d	e	f
R	3-Cl	3,5-Cl ₂	3-Cl	3,5-Cl ₂
R₁	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅

La destabilizzazione della specie **14**, abbassando la densità elettronica del nucleo pirazolico, dovrebbe sfavorire la sua formazione e quindi rendere **3** più stabile. Sulla base di questa considerazione, abbiamo pensato di preparare derivati del tipo **3c-f** in cui l'anello fenilico legato al pirazolo porta uno o più atomi di cloro. L'anello fenilico è in grado di trasmettere l'effetto elettronattrattore degli atomi di cloro sull'anello pirazolico, infatti l'1-(3-cloro)-fenil-5-ammino pirazolo ($pK_a=2.79$) è meno basico dell'analogo non sostituito ($pK_a=3.23$). Con il derivato disostituito si dovrebbe avere un effetto maggiore.

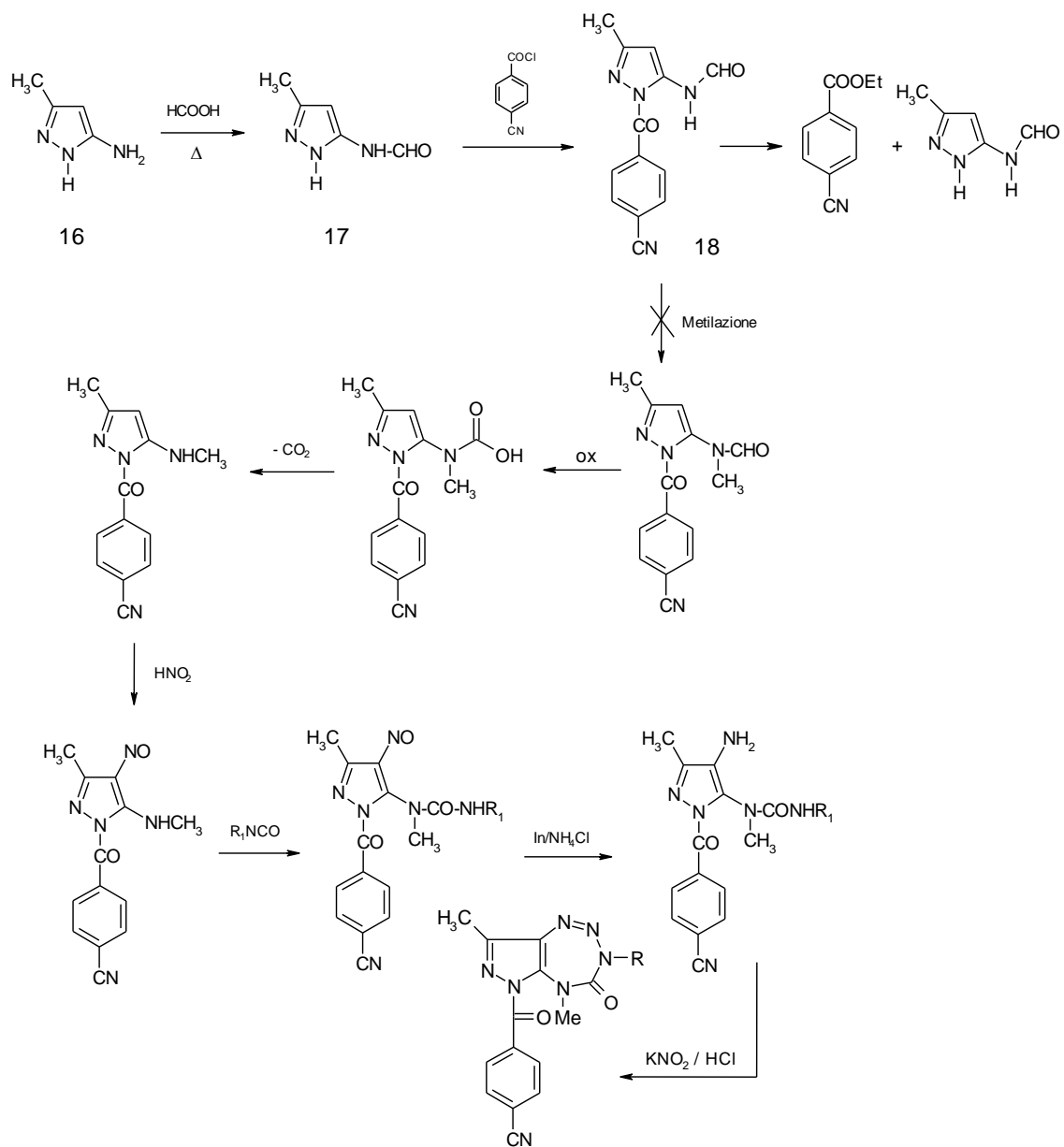
Sono stati considerati anche derivati del tipo **15** nei quali, sull'anello pirazolico, è legato un gruppo benzoilico sostituito con gruppi elettronattrattori. Anche in questo caso viene abbassata la densità elettronica dell'anello pirazolico.



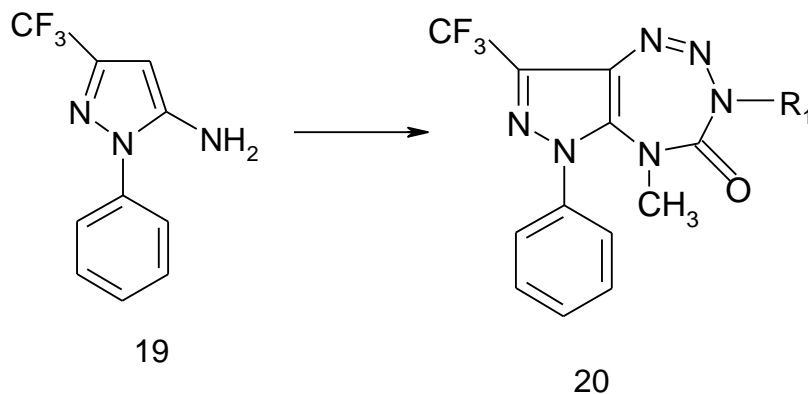
Partendo dai 5-amminopirazoli sostituiti **4c,e** abbiamo eseguito tutti i passaggi sintetici che ci hanno portato ai pirazolotetrazepinoni **1c-f** che, purtroppo, continuano ad essere instabili a temperatura ambiente e quindi non possono essere saggiati (Schemi 5 e 6).

A questo punto è stata tentata la sintesi dei derivati **15** seguendo lo Schema 8. Al momento della metilazione con ioduro di metile in presenza di etilato sodico, si è staccato il gruppo p-cianobenzoile producendo p-cianobenzoato di etile. Il tentativo di effettuare la metilazione con ioduro di metile e idrossido di potassio in acetone non ha portato ugualmente a risultato utile.

Schema 8



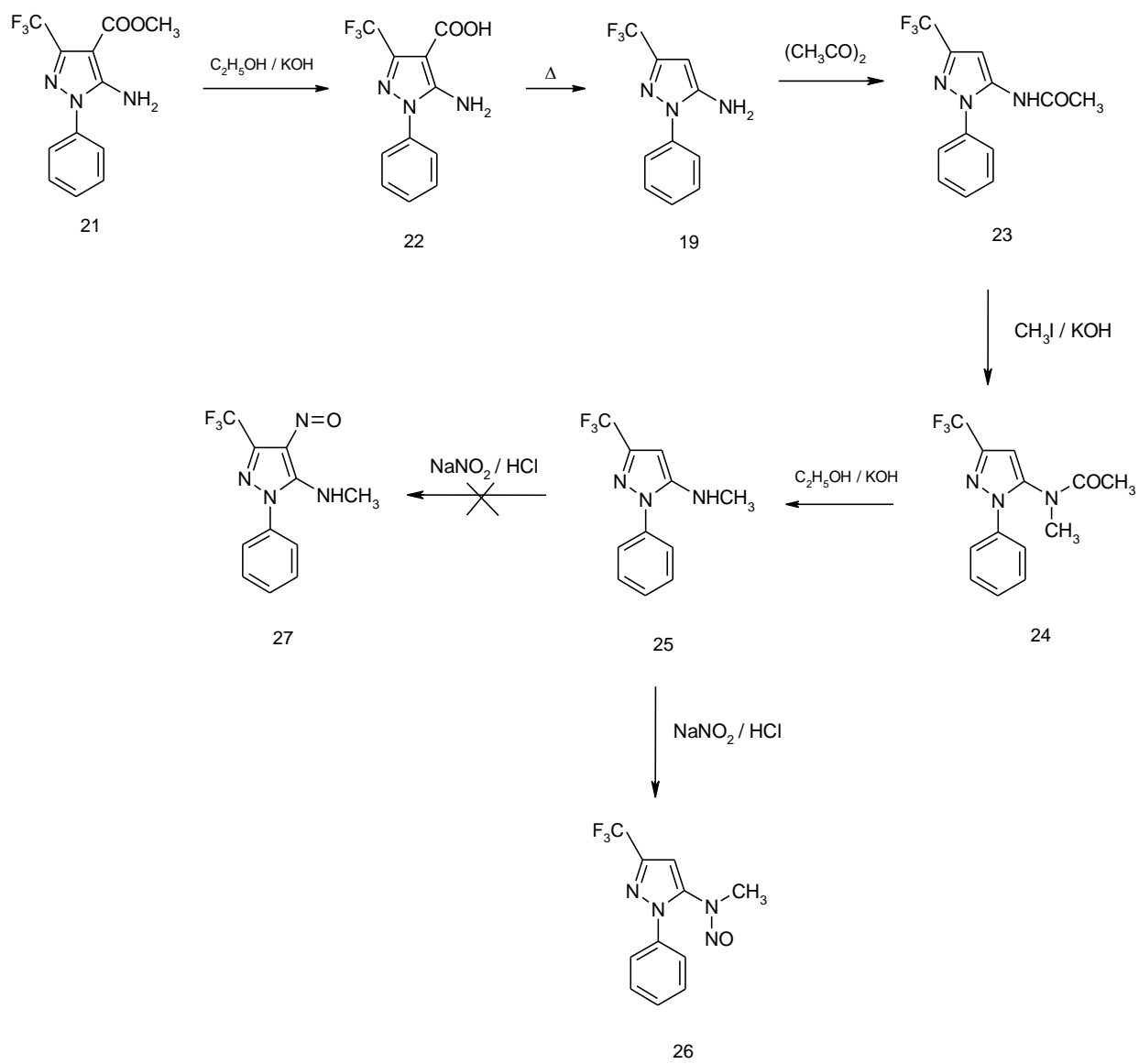
Visto questo risultato la sintesi è stata abbandonata e si è pensato, come ulteriore tentativo, di utilizzare un amminopirazolo che porti un gruppo elettron-attrattore, quale il trifluorometile, direttamente legato all'anello pirazolico:



L'amminopirazolo **19**, utile per questa sintesi, è stato preparato partendo dall'amminoestere **21**, noto in letteratura ma non commerciale [29], che è stato ad acido **22** (Schema 9). Per decarbossilazione è stato ottenuto il 5-amminopirazolo **19** che a sua volta è stato acetilato dando il derivato **23**. Mediante metilazione e successiva idrolisi è stato ottenuto il derivato 5-metilamminico che poi è stato sottoposto alla reazione di nitrosazione seguendo la procedura di sintesi usata per gli altri 5-metilammino pirazoli. In questo caso, la nitrosazione è avvenuta sull'azoto amminico e non sulla posizione 4 del nucleo pirazolico. Questo dato indica che il gruppo CF_3 esercita un effetto elettron-attrattore così elevato da fare disattivare la posizione 4 del nucleo pirazolico nei confronti

dello ione nitrosonio. Data la presenza del fenile, non è possibile effettuare una nitratura tramite la specie più reattiva nitronio poichè verrebbe nitrato anche l'anello fenilico, creando altri inconvenienti dopo la riduzione dei nitro gruppi [30]. Tutto questo suggerisce per un lavoro futuro, di utilizzare un 5-amminopirazolo che porta un gruppo alchilico nella posizione 1 del nucleo pirazolico in modo da potere operare la nitratura soltanto su questo nucleo.

Schema 9



Parte sperimentale chimica

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Büchi 530 e non sono corretti; gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin Elmer Spectrum RXI FT-IR System usando esaclorobutadiene o KBr; gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro Bruker AC-F (250 MHz) con tetrametilsilano come standard interno; gli spettri di massa a 70 eV sono stati ottenuti con uno spettrometro di massa Autospec Ultima Ortogonal T.O.F.T. (Micromass) o mediante un apparecchio gas-massa Varian Saturn.

I prodotti ottenuti sono stati analizzati per il C, H, N presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche–Università di Catania e i risultati sono in accordo con i valori teorici entro $\pm 0,4\%$.

1-H-5-metil-3-(3',3'-dialchiltriazeno)pirazoli 3a-c

Ad una soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio 0-5°C) del composto **1** [31] (10 mmoli) in acido cloridrico 6N (10 ml), è stata aggiunta a goccia a goccia una soluzione di nitrito di sodio (0.7g, 10 mmoli) in acqua (3 ml). L'agitazione è stata protratta per 1h a 0-5°C e quindi la miscela di reazione è stata trattata alla medesima temperatura

con una soluzione di dimetilammina acquosa al 40% (200 mmoli, 26 ml) per il composto **3a**, con dietilammina (200 mmoli, 21 ml) per il composto **3b**, e con pirrolidina (20 mmoli, 1.7 ml) nel caso del composto **3c**, aggiungendo anche idrossido di sodio (40%) fino a soluzione alcalina.

La miscela è stata lasciata ad agitare per tutta la notte a temperatura ambiente al buio e il solido separatosi dalla miscela alcalina è stato lavato con acqua fredda, filtrato e quindi cristallizzato.

*Procedura per la preparazione dei 3-(3'-3'-dialchil triazeno)indazoli **6a-g***

Ad una soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio 0-5°C) del composto **4a,c,e** [32, 33] (3 mmoli) in acido cloridrico 6N / acido acetico (1:1) (3 ml) [nel caso di **4c,e** è stato aggiunto acetone (1 ml)], è stata aggiunta a goccia a goccia una soluzione di nitrito di sodio (0.21g, 3 mmoli) in acqua (1 ml). L'agitazione è stata protratta per 1h a 0-5°C e quindi la miscela di reazione è stata trattata alla medesima temperatura con una soluzione di dimetilammina acquosa al 40% (90 mmoli, 9.31 ml) per i composti **6d,f**. Nel caso del composto **6g** la soluzione del sale di diazonio è stata trattata con pirrolidina (6 mmoli, 0.51 ml), ed in seguito resa alcalina con una soluzione di idrossido di sodio al 40% a 0-5°C.

La miscela di reazione è stata lasciata ad agitare per tutta la notte a temperatura ambiente al buio. Per i composti **6a,c,e,g** il solido separatosi è stato lavato con acqua fredda, filtrato e quindi cristallizzato. Invece, riguardo i composti **6b,d,f**, la soluzione alcalina è stata estratta con diclorometano (3x30 ml), e gli estratti sono stati seccati (Na_2SO_4) ed evaporati sotto pressione ridotta. Il residuo oleoso è stato lavato con acqua fredda fino a solidificazione e il solido è stato filtrato e quindi cristallizzato.

*Procedura per la preparazione dei 5-(o 6-)-(3',3'-dialchil triazeno)indazoli **9c-f***

Ad una soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio 0-5°C) dei composti **7a,b** (3 mmoli) in acido cloridrico 6N (2.5 ml) e acetone (2 ml), è stata aggiunta a goccia a goccia una soluzione di nitrito di sodio (0.21g, 3 mmoli) in acqua (1 ml). L'agitazione è stata protratta per 1h a 0-5°C. Per ottenere i composti **9c,e** la soluzione è stata trattata alla medesima temperatura con una soluzione di dimetilammina acquosa al 40% (30 mmoli, 3.8 ml), e la miscela è stata lasciata ad agitare per tutta la notte a temperatura ambiente al buio. Il solido separatosi dalla miscela alcalina è stato lavato con acqua fredda, filtrato e quindi cristallizzato.

Per i composti **9d,f** la soluzione è stata trattata a 0-5°C con dietilammina (30 mmoli, 3.1 ml). Nel caso del composto

9d, la miscela è stata lasciata ad agitare per 15' ottenendo un solido che è stato filtrato, lavato con acqua fredda, e quindi cristallizzato. Invece, nel caso del composto **9f**, la miscela è stata lasciata ad agitare per tutta la notte a temperatura ambiente al buio e quindi estratta con diclorometano (3x30 ml). Gli estratti sono stati seccati (Na_2SO_4) ed evaporati sotto pressione ridotta per dare un residuo oleoso marrone che è stato trattato con una miscela di etere dietilico / etere di petrolio (40-70°C) (8:2 V/V) (5 ml). Il residuo insolubile è stato filtrato, e la soluzione cromatografata seguendo la procedura della Cromatografia Flash [34]: diametro esterno della colonna 4 cm, silica gel (32-63 μm), eluente etere dietilico / etere di petrolio (8:2 V/V). Sono state raccolte le frazioni 8-20 (ognuna di 50 ml) ed evaporate per dare il composto **9f** come un olio.

5-metil-3-(3',3'-dimetiltriazeno)pirazolo **3a**.

Resa 76%; p.f.: 152-155°C (acetato di etile). MS (m/e): 153 (M^+), 109, ($\text{M}^+ - \text{N}(\text{CH}_3)_2$), 81 (109- N_2), 54 (81-HCN). I.R.(cm^{-1}): 3191-3100 (bande multiple, NH), 1592 (N=N). ^1H -NMR (DMSO- d_6) (δ): 2.17 (3H, singoletto, CH_3); 3.21 (6H, allargati, 2 CH_3); 5.85 (1H, singoletto, pirazolo H-4); 12.16 (1H, allargati, scambiabile con D_2O , NH).

5-metil-3-(3',3'-diethyltriazeno)pirazolo **3b**.

Resa 42%; p.f.: 86-88°C (acetato di etile/etere di petrolio). MS (m/e): 181 (M^+), 109 ($M^+ - N(C_2H_5)_2$), 81 (109- N_2), 54 (81-HCN). I.R.(cm^{-1}): 3196-3105 (bande multiple, NH), 1593 (N=N). 1H -NMR (DMSO- d_6) (δ): 1,16 (6H, tripletto, 2 CH_3 , $J=6.80$ Hz); 2.17 (3H, singoletto, CH_3); 3.66 (4H, quadrupletto, 2 CH_2 , $J=6.92$ Hz); 5.85 (1H, singoletto, pirazolo H-4); 12.12 (1H, allargati, scambiabile con D_2O , NH)

5-metil-3-(3',3'-tetrametilentriazeno)pirazolo **3c**.

Resa 87%; p.f.: 209-210°C (etanolo). MS (m/e): 179 (M^+), 109 ($M^+ - N(CH_2)_4$), 70 (109- N_2). I.R.(cm^{-1}): 3190-3106 (bande multiple, NH), 1593 (N=N). 1H -NMR (DMSO- d_6) (δ): 1.93 (4H, singoletto, 2 CH_2); 2.15 (3H, singoletto, CH_3); 3.65 (4H, molto allargati, N-(CH_2)); 5.81 (1H, singoletto, H-4); 12.08 (1H, allargati, scambiabile con D_2O , NH).

3-(3',3'-dimetiltriazeno)indazolo **6a**.

Resa 85%; p.f.: 200-203°C (etanolo). MS (m/e): 189 (M^+), 145($M^+ - N(CH_3)_2$), 117 (145- N_2), 90 (117-HCN). I.R. (cm^{-1}): 3218 (allargato, NH), 1616 (N=N). 1H -NMR ($CDCl_3$) (δ): 3.4 (6H, molto allargato, 2 CH_3), 7.11-8.17 (4H, un set di segnali, C_6H_4), 8.86 (1H, allargato, scambiabile con D_2O , NH).

3-(3',3'-diethyltriazeno)indazolo **6b** [35].

Resa 52%; p.f.: 140-141°C (acetato di etile) [Let. 139-140°C (etanolo)]. MS (m/e): 217 (M⁺), 145(M⁺-N(C₂H₅)₂), 117 (145-N₂), 90 (117-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3143 (molto allargato, NH), 1618 (N=N). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ): 1.34 (6H, allargati, 2 CH₃); 3.88 (4H, quadrupletto, 2 CH₂, J=7.14); 7.10-8.18 (4H, un set di segnali, C₆H₄); 9.09 (1H, allargato, scambiabile con D₂O, NH).

3-(3',3'-dimetiltriazeno)-5-cloroindazolo **6c**.

Resa 40%; p.f.: 207-209°C (acetato di etile). MS (m/e): 223 (M⁺), 179 (223-N(CH₃)₂), 151 (179-N₂), 124 (151-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3208-3107 (bande multiple, NH), 1622 (N=N). ¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ): 3.23 (3H, allargati, CH₃); 3.57 (3H, allargati, CH₃); 7.37 (1H, doppietto, H-7, J=8.53 Hz); 7.51 (1H, doppietto, H-6, J=8.53 Hz); 8.08 (1H, singoletto, H-4); 12,90 (1H, singoletto, NH).

3-(3',3'-diethyltriazeno)-5-cloroindazolo **6d**.

Resa 38%; p.f.: 137-140°C (etere dietilico). MS (m/e): 251 (M⁺), 179 (M⁺-N(C₂H₅)₂), 151 (179-N₂), 124 (151-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3210-3100 (bande multiple, NH), 1623 (N=N). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ): 1.35 (6H, allargati, 2 CH₃); 3.88 (4H, quadrupletto, 2 CH₂, J=7.25 Hz); 7.28 (1H, doppietto, H₇, J=8.75 Hz); 7.46 (1H, doppietto, H₆, J=8.75 Hz); 8.13 (1H,

singoletto, H-4); 11,71 (1H, allargati, scambiabile con D₂O, NH).

3-(3',3'-dimetiltriazeno)-6-cloroindazolo **6e**.

Resa 30%; p.f.: 221-223°C (etanolo). MS (m/e): 223 (M⁺), 179 (M⁺-N(CH₃)₂), 151 (179-N₂), 124 (151-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3205-3110 (bande multiple, NH), 1619 (N=N). ¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ): 3.20 (3H, allargati, CH₃); 3.57 (3H, allargati, CH₃); 7.11 (1H, doppietto, H-4, J=8,61 Hz); 7.52 (1H, singoletto, H-7); 8.08 (1H, doppietto, H-5, J=8,61 Hz); 12,81 (1H, allargati, NH).

3-(3',3'-diethyltriazeno)-6-cloroindazolo **6f**

Resa 60%; p.f.: 150-153°C (etanolo). MS (m/e): 215 (M⁺-N(C₂H₅)₂), 151 (179-N₂), 124 (151-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3210-3110 (bande multiple, NH). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ): 1.36 (6H, allargati, 2 CH₃); 3.92 (4H, quadrupletto, 2 CH₂, J=7,32Hz); 7.11 (1H, doppietto, H-4, J=8.62 Hz); 7.60 (1H, singoletto, H-7); 8.06 (1H, doppietto, H-5, J=8.62 Hz); 11.85 (1H, allargati, scambiabile con D₂O, NH).

3-(3',3'-tetrametilentriazeno)-6-cloroindazolo **6g**.

Resa 48%; p.f.: 220-221°C (acetato di etile/etere di petrolio). I.R.(cm⁻¹): 3200-3111 (bande multiple, NH), 1620 (N=N). ¹H-NMR (DMSO-d₆) (δ): 2.00 (4H, singoletto, 2 CH₂); 3.59 (2H,

allargati, N-CH₂-); 3.95 (2H, allargati, N-CH₂-); 7.10 (1H, doppietto, H-4 o H-5, J=8.42 Hz); 7.49 (1H, singoletto, H-7); 8.02 (1H, doppietto, H-5 o H-4, J=8.42 Hz); 12.75 (1H, singoletto, NH).

5-(3',3'-dimetiltriazeno)indazolo **9c** [36].

Resa 90%; p.f.: 140-141°C (benzene/etere di petrolio) [Let. 144-145°C]. MS (m/e): 189 (M⁺), 145 (M⁺-N(CH₃)₂), 117 (145-N₂), 90 (117-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3200-3100 (bande multiple, NH), 1616 (N=N). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ): 3.35, (6H, singoletto, 2 CH₃); 7.43 (1H, doppietto, H-7, J=8.33 Hz); 7.64 (1H, doppietto, H-6, J=8.33 Hz); 7.74 (1H, singoletto, H-4); 8.07 (1H, singoletto, H-3); 10.70 (molto allargato, scambiabile con D₂O, NH).

5-(3',3'-dietiltriazeno)indazolo **9d**.

Resa 90%; p.f.: 78-80°C (acetato di etile). MS (m/e): 217 (M⁺), 145 (M⁺-N(C₂H₅)₂), 117 (145-N₂), 90 (117-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3210-3100 (bande multiple, NH), 1627 (N=N). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ): 1.28 (6H, tripletto, 2 CH₃, J=7.14 Hz); 3.75 (4H, quadrupletto, 2 CH₂, J=7.14 Hz); 7.43 (1H, doppietto, H-7, J=8.87 Hz); 7.64 (1H, doppietto, H-6, J=8.87 Hz, 1.92 Hz); 7.72 (1H, doppietto, H-4, J=1.92 Hz); 8.06 (1H, singoletto, H-3).

6-(3',3'-dimetiltriazeno)indazolo **9e**.

Resa 95%; p.f.: 140-141°C (etanolo/acqua). MS (m/e): 189 (M⁺), 145 (M⁺-N(CH₃)₂), 117 (145-N₂), 90 (117-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3200-3120 (bande multiple, NH), 1623 (N=N). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ): 3.36 (6H, allargati, 2 CH₃); 7.39 (1H, doppietto, H-5, J=8.83 Hz); 7.47 (1H, singoletto, H-7); 7.68 (1H, doppietto, H-4, J=8.83 Hz); 8.06 (1H, singoletto, H-3); 9.99 (1H, allargati, NH).

6-(3',3'-dietiltriazeno)indazolo **9f**.

Resa 43%. MS (m/e): 217 (M⁺), 145 (M⁺-N(CH₃)₂), 117 (145-N₂), 90 (117-HCN). I.R.(cm⁻¹): 3200-3100 (bande multiple, NH). ¹H-NMR (CDCl₃) (δ): 1.28 (6H, tripetto, 2 CH₃, J=7,14 Hz); 3.78 (4H, quadrupetto, 2 CH₂, J=7.14 Hz); 7.38(1H, doppietto, H-5, J=8.74 Hz, 1.36 Hz); 7.46 (1H, singoletto, H-7); 7.67 (1H, doppietto, indazolo H-4, J=8.74 Hz); 8.04 (singoletto, 1H, H-3).

Reazione degli alchilisocianati con 3-diazoindazolo

Ad un soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio 0-5°C) del composto **4a** [32] (5 mmoli, 0.67g) in acido cloridrico 4N (4.5 ml), è stata aggiunta nell'arco di 20 minuti una soluzione di nitrito di sodio (5 mmoli, 0.35g). L'agitazione è stata protratta per 30 minuti e quindi sono stati aggiunti 20 ml di diclorometano. L'emulsione è stata basificata fino a pH=8 con una soluzione satura di carbonato di sodio fredda. Le due fasi sono state separate e la fase organica, contenente il 3-diazoindazolo, è stata resa anidra con cloruro di calcio, filtrata ed evaporata sotto pressione ridotta. Il residuo è stato sciolto in diclorometano anidro (5 ml), quindi è stato insufflato azoto secco nel pallone e poi sono stati aggiunti 30 mmoli di isocianato di metile (1.95 ml) o di isocianato di etile (2.4 ml). La soluzione è stata lasciata ad agitare al buio ed a temperatura ambiente per 20 h e quindi è stata portata a secco, utilizzando una pompa ad olio, lasciando un residuo semisolido. Nel caso della reazione con etilisocianato il residuo è stato cromatografato seguendo la procedura della Cromatografia Flash [34]: diametro esterno della colonna 3 cm, silica gel (32-63 µm), eluente acetato di etile / etere di petrolio (1:9 V/V). Sono state raccolte le frazioni 14-16 (ognuna di 50 ml) che evaporate hanno lasciato un residuo quasi unitario di 60mg di 3-(3'-etiltriazeno) indazolo, identificato mediante punto di fusione, spettri NMR e MS [35].

*Procedura per la preparazione degli 1-(3 o 3,5-diclorofenil)-3-metil-5-acetammidopirazoli **5c,e***

Ad una soluzione, agitata magneticamente, del composto **4c,e** (0.13 moli), sono stati aggiunti 47 ml di anidride acetica. L'agitazione è stata protratta per 24h e la sospensione ottenuta si filtra ottenendo i composti **5c,e** unitari.

Il filtrato è stato trattato con acqua fino a completa precipitazione dei composti **5c,e**.

*Procedura per la preparazione degli 1-(3 o 3,5-diclorofenil)-3-metil-5-metilacetammidopirazoli **6c,e***

0.03 moli dei composti **5c,e** sono stati sciolti in acetone (109.6 ml) e messi a riflusso con idrossido di potassio (0.12 moli, 6.6 g) per 10'. Una soluzione di ioduro di metile (0.03 moli, 2.8 ml) in acetone (16.1 ml) è stata aggiunta e dopo 1h di riflusso la soluzione è stata filtrata ed evaporata sotto pressione ridotta. La miscela ottenuta è stata trattata con acqua fredda fino a solidificazione e filtrata ottenendo i composti **6c,e**.

*Procedura per la preparazione degli 1-(3 o 3,5-diclorofenil)-3-metil-5-metilamminopirazoli **7c,e***

0.11 moli dei composti **6c,e** sono stati sciolti in etanolo (181.3 ml) e messi a riflusso con una soluzione di idrossido di potassio 5N (103.5 ml) per 10h. La soluzione è stata filtrata ed evaporata a pressione ridotta. Nel caso del composto **7c**, si

è ottenuto un olio che è stato cromatografato seguendo la procedura della Cromatografia Flash [34]: diametro esterno della colonna 4 cm, silica gel (32-63 μm), eluente acetato di etile / etere di petrolio (3:7 V/V) (600 ml) ed acetato di etile / etere di petrolio (3:7 V/V) (2 L). Sono state raccolte le frazioni 17-25 (ognuna di 50 ml) che dopo evaporazione hanno dato il composto **7c**. Nel caso del composto **7e**, è stato ottenuto un solido che è stato filtrato.

*Procedura per la preparazione degli 1-(3 o 3,5-diclorofenil)-3-metil-4-nitroso-5-metilamminopirazoli **8c,e***

Ad una soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio 0-5°C) dei composti **7c,e** (5 mmoli) in acido cloridrico 5N (15 ml), è stata aggiunta a goccia a goccia una soluzione di nitrito di sodio (0.35g, 5 mmoli) in acqua (5 ml). L'agitazione è stata protratta per 1h a 0-5°C e quindi alla miscela di reazione sono stati aggiunti 12g di acetato di sodio. Precipita un solido che si filtra.

*Procedura per la preparazione degli 1-fenil-3-metil-4-ammino-5-metilamminopirazoli **9a,c,e***

Ad una soluzione fredda agitata magneticamente (bagno di ghiaccio 0-5°C) di cloruro stannoso (2.63g) in acido cloridrico al 37%, sono stati aggiunti i composti **8a** [37],**c,e** (5 mmoli) nell'arco di 1h. L'agitazione è stata protratta per 24h a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata diluita

con 54 ml di acqua fredda e resa alcalina con una soluzione di idrossido di sodio al 40%. Dopo estrazione della miscela con acetato di etile (3x100 ml), gli estratti sono stati seccati (Na_2SO_4) ed evaporati sotto pressione ridotta ottenendo un olio che è stato utilizzato subito per la reazione successiva.

*Trasformazione dell'1-fenil-3-metil-4-ammino-5-metilamminopirazolo **9a** in 1-fenil-3-metil-4- N_3 -metilureido-5-metilamminopirazolo **10a***

Ad una soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio 0-5°C) del composto **9a** (1 mmole) in CHCl_3 assoluto (10 ml) è stato aggiunto CH_3NCO (10 mmoli, 0.62 ml). L'agitazione è stata protratta per tutta la notte a temperatura ambiente e quindi la soluzione è stata evaporata sotto pressione ridotta per dare l'1-fenil-3-metil-4- N_3 -metilureido-5-metilamminopirazolo **10a**.

*Procedura per la protezione degli 1-fenil-3-metil-4-ammino-5-metilamminopirazoli **9a,c,e** con benzilcloroformiato*

Ad una soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio 0-5°C) dei composti **9a,c,e** (1 mmole) in idrossido di sodio 2M / diossano (1:1) (2 ml), è stato aggiunto benzilcloroformiato (1.1 mmoli, 0.157 ml). L'agitazione è stata protratta per 1h durante la quale si sono separati i composti **11a,c,e** che sono stati filtrati e cristallizzati.

*Procedura per la preparazione degli 1-fenil-3-metil-4-benzilossicarbonilammino-5-(N₁-metil-N₃-R₁-ureido)-pirazoli **12a-f***

2 mmoli dei composti **11a,c,e** in CHCl₃ assoluto (20 ml) sono stati messi a riflusso con CH₃NCO (20 mmoli, 1.3 ml) [15h nel caso del composto **11a**, 60h per **11c** e 70h per **11e**] e con C₂H₅NCO (30 mmoli, 2.4 ml) [40h nel caso del composto **11a**, 140h per **11c** e 140h per **11e**]. Le soluzioni sono state evaporate sotto pressione ridotta ottenendo degli olii che solidificavano tranne che per il composto **12e**. In questo caso l'olio è stato cromatografato seguendo la procedura della Cromatografia Flash [34]: diametro esterno della colonna 4 cm, silica gel (32-63 µm), eluente acetato di etile / etere di petrolio (3:7 V/V) (600 ml) ed acetato di etile / etere di petrolio (1:1 V/V) (2 L). Sono state raccolte le frazioni 31-40 (ognuna di 50 ml) che evaporate hanno dato un residuo oleoso.

*Procedura per la preparazione degli 1-fenil-3-metil-4-ammino-5-(N₁-metil-N₃-R₁-ureido)-pirazoli **1a-f***

0.76 mmoli dei composti **12a-f** e 30 mg di catalizzatore Pd-C (10:1) sono stati sciolti in metanolo (35 ml) ed idrogenati per 24h usando un apparecchio Parr. Le soluzioni sono state filtrate ed evaporate sotto pressione ridotta dando un residuo solido tranne che per il composto **1e**. In questo caso l'olio è stato cromatografato seguendo la procedura della

Cromatografia Flash [34]: diametro esterno della colonna 4 cm, silica gel (32-63 μm), eluente acetato di etile / etanolo (1:1 V/V) (600 ml). Sono state raccolte le frazioni 6-8 (ognuna di 50 ml) ed evaporate per dare il composto **1e** unitario come un olio.

*Trasformazione del 1-fenil-3-metil-4-ammino-5-(N₁,N₃-dimetilureido)pirazolo **1a** in 1-fenil-3-metil-6,7-dimetilpirazolo[3,4-d]-triazolo **13a***

Ad una soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio tra -5 e 0°C) del composto **1a** (0.8 mmoli) in acido cloridrico 2N (2.5 ml), è stata aggiunta a goccia a goccia una soluzione di nitrito di sodio al 20% (0.28 ml). L'agitazione è stata protratta per 1h e la sospensione è stata estratta con diclorometano (3×5 ml). La fase acquosa è stata basificata fino a pH 8 con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e quindi riestratta con diclorometano (5×7 ml). Gli estratti organici sono stati seccati (Na₂SO₄) ed evaporati sotto pressione ridotta. E' stato ottenuto un residuo che è stato cromatografato seguendo la procedura della Cromatografia Flash [34]: diametro esterno della colonna 4 cm, silica gel (32-63 μm), eluente acetato di etile / etere di petrolio (6:4 V/V). Sono state raccolte le frazioni 7-9 (ognuna di 50 ml) che evaporate hanno lasciato un residuo di 150 mg di 1-fenil-

3-metil-6,7-dimetil-pirazolo-[3,4-d]-triazolo, identificato mediante punto di fusione, spettri NMR e MS [35].

*Procedura per la preparazione degli 1-fenil-3-metil-pirazolo[3,4-f]-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-oni **3a-f***

Ad una soluzione fredda, agitata magneticamente, (bagno di ghiaccio tra -5 e 0°C) dei composti **1a-f** (0.8 mmoli) in acido cloridrico 2N (2.5 ml), è stata aggiunta a goccia a goccia una soluzione di nitrito di sodio al 20% (0.28 ml). L'agitazione è stata protratta per 1h e la sospensione è stata estratta con diclorometano freddo (3×5 ml). La fase acquosa mantenuta a circa -5°C è stata basificata fino a pH 8 con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e quindi riestratta con diclorometano freddo (5×7 ml). Gli estratti organici sono stati seccati (Na₂SO₄) ed evaporati usando una pompa ad olio e mantenendo la temperatura della miscela al di sotto di zero gradi centigradi. Sono stati ottenuti dei residui solidi che sono stati sottoposti ad indagine NMR.

*Procedura per la preparazione dell'1-(4-ciano-benzoil)-3-metil-5-formilamminopirazolo **18***

8 mmoli del composto **17** [38] in CHCl₃ assoluto (20 ml) sono stati messi a riflusso per 5h con il cloruro dell'acido 4-cianobenzoico (8 mmoli) aggiungendo le seguenti quantità di trietilammina dopo la prima ora e ad intervalli di un'ora: 0.5ml, 0.3ml, 0.2ml, 0.1ml. La soluzione è stata evaporata

sotto pressione ridotta e, dopo aggiunta di acqua, è stato ottenuto il residuo **18**.

*Procedura per la preparazione dell'acido 1-fenile-3-trifluorometile-5-amminopirazolo **19***

8.7 mmoli (2.47 g) del composto **21** [38] sono stati sciolti in etanolo (3.37 ml) e messi a riflusso per 30 minuti con una soluzione di idrossido di potassio (0.56 ml di acqua e 0.78 g di idrossido di potassio). Dopo tale tempo, la soluzione è stata concentrata sotto pressione ridotta per allontanare l'etanolo. Il residuo è stato sciolto in acqua ed è stato aggiunto acido cloridrico (37%) fino a precipitazione completa di un prodotto solido che è stato filtrato e cristallizzato da acetato/etere di petrolio (p.f.: 215-216°C). L'acido carbossilico ottenuto è stato fuso alla temperatura di 215°C per 1h ottenendo il composto **19**.

I derivati **23,24,25** e l'1-fenile-3-trifluorometile-5-N-metile-N-nitrosoammino pirazolo **26** sono stati preparati seguendo le procedure di sintesi riportate per i composti non fluorurati.

1-(3-clorofenil)-3-metil-5-acetamidopirazolo **5c**.

Resa 41%; p.f.: 103-104°C (acetato di etile/etere di petrolio). MS (m/e): 249 (M⁺). I.R.(nujol, cm⁻¹): 3240-3160 (bande multiple, NH), 1665 (CO). ¹H-NMR (DMSO, ppm): 1.97 (3H, singoletto, CH₃); 2.19 (3H, singoletto, CH₃); 6.21 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.43-7.53 (4H, un set di segnali, C₆H₄); 9.94 (1H, singoletto, scambiabile con D₂O, NH).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-5-acetamidopirazolo **5e**.

Resa 86%; p.f.: 166-169°C (etanolo). MS (m/e): 283 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3234-3196 (bande multiple, NH), 1669 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.01 (3H, singoletto, CH₃); 2.22 (3H, singoletto, CH₃); 6.18 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.26 (3H, singoletto, C₆H₃); 8.28 (1H, singoletto, scambiabile con D₂O, NH).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-5-metilacetamidopirazolo **6e**.

Resa 95%; p.f.: 92-95°C (etere di petrolio). MS (m/e) 297 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 1680 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 1.64 (3H, singoletto, CH₃); 2.33 (3H, singoletto, CH₃); 3.15 (3H, singoletto, CH₃); 6.13 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.36-7.37 (3H, un set di segnali, C₆H₃).

1-(3-clorofenil)-3-metil-5-metilamminopirazolo **7c**.

Resa 80%. MS (m/e): 221 (M^+). I.R.(nujol, cm^{-1}): 3400-3170 (bande multiple, NH). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, ppm): 2.11 (3H, singoletto, CH_3); 2.65 (3H, doppietto, CH_3); 5.33 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 5.62-5.64 (1H, un set di segnali, NH); 7.26-7.64 (4H, un set di segnali, C_6H_4).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-5-metilamminopirazolo **7e**.

Resa 85%; p.f.: 108-110°C (etanolo). MS (m/e): 255 (M^+). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 2.20 (3H, singoletto, CH_3); 2.80 (3H, doppietto, CH_3); 3.85 (1H, segnale allargato, scambiabile con D_2O , NH); 5.35 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.19-7.47 (3H, un set di segnali, C_6H_3).

1-(3-clorofenil)-3-metil-4-nitroso-5-metilammino
pirazolo **8c**.

Resa 72%; p.f.: 132-134°C (etanolo). MS (m/e): 250 (M^+). I.R.(KBr, cm^{-1}): 3194 (banda allargata, NH). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 2.60 (3H, singoletto, CH_3); 2.70 (3H, doppietto, CH_3); 7.28-7.48 (4H, un set di segnali, C_6H_4); 10.15 (1H, segnale allargato, scambiabile con D_2O , NH).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-4-nitroso-5-metilammino
pirazolo **8e**.

Resa 52%; p.f.: 180-181°C (etanolo). MS (m/e): 284 (M^+). I.R.(KBr, cm^{-1}): 3178 (segnale allargato, NH). $^1\text{H-NMR}$

(CDCl₃, ppm): 2.67 (3H, singoletto, CH₃); 2.70 (3H, doppietto, CH₃); 7.37-7.50 (3H, un set di segnali, C₆H₃); 10.19 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH).

1-fenil-3-metil-4-N₃-metilureido-5-metilamminopirazolo
10a

Resa 65%. p.f.: 149-151°C (acetato di etile). MS (m/e): 259 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3203-3387 (bande multiple, NH), 1672 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.16 (3H, singoletto, CH₃); 2.80-2.83 (6H, segnali sovrapposti, 2 x N-CH₃); 3.53 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 5.00 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 6.00 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 7.36-7.39 (5H, un set di segnali, C₆H₅).

1-fenil-3-metil-4-benzilossicarbonilammino-5-metil
amminopirazoli **11a**

Resa 87%; p.f.: 93-98°C (acetato di etile/etere di petrolio). MS (m/e): 336 (M⁺). I.R.(nujol, cm⁻¹): 3521-3246 (bande multiple, NH), 1697 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.15 (3H, singoletto, CH₃); 2.71 (3H, singoletto, CH₃); 5.19 (2H, singoletto, CH₂); 6.13 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 7.39-7.50 (10H, un set di segnali, 2 per C₆H₅).

1-(3-clorofenil)-3-metil-4-benzilossicarbonilammino-5-metilamminopirazoli **11c**

Resa 77%; p.f.: 91-93°C (etere dietilico/etere di petrolio). MS (m/e): 370 (M^+). I.R.(KBr, cm^{-1}): 3300-3200 (bande multiple, NH), 1703 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 2.09 (3H, singoletto, CH_3); 2.54 (3H, singoletto, CH_3); 3.57 (1H, segnale allargato, scambiabile con D_2O , NH); 5.16 (2H, singoletto, CH_2); 6.41 (1H, singoletto, NH); 7.60-7.21 (9H, un set di segnali, C_6H_4 e C_6H_5).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-4-benzilossicarbonilammino 5-metilamminopirazoli **11e**

Resa 81%; p.f.: 138-139°C (etere dietilico/etere di petrolio). MS (m/e): 404 (M^+). I.R.(KBr, cm^{-1}): 3357 e 3270 (NH), 1678 (CO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): 2.12 (3H, singoletto, CH_3); 2.65 (3H, singoletto, CH_3); 3.70 (1H, segnale allargato, scambiabile con D_2O , NH); 5.19 (2H, singoletto, CH_2); 6.05 (1H, segnale allargato, scambiabile con D_2O , NH); 7.62-7.24 (8H, un set di segnali, C_6H_3 e C_6H_5).

1-fenil-3-metil-4-benzilossicarbonilammino-5-(N_1, N_3 -dimetilureido)-pirazolo **12a**

Resa 82%; p.f.: 140-141°C (acetato di etile/etere di petrolio). MS (m/e): 393 (M^+).

1-fenil-3-metil-4-benzilossicarbonilammino-5-(N_1 -metil- N_3 -etil-ureido)pirazolo **12b**

Resa 78%; p.f.: 130-131°C (acetato di etile). MS (m/e): 407 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3396-3211 (bande multiple, NH), 1728 e 1651 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 0.95-1.01 (3H, singoletto, CH₃); 2.25 (3H, singoletto, CH₃); 2.84 (3H, singoletto, CH₃); 3.12 (2H, segnale non risolto, CH₂); 5.16 (2H, singoletto, CH₂); 6.25 (1H, singoletto, NH); 7.36-7.43 (10H, un set di segnali, 2 per C₆H₅).

1-(3-clorofenil)-3-metil-4-benzilossicarbonilammino-5-(N₁,N₃-dimetilureido)pirazolo **12c**

Resa 72%; p.f.: 177-179°C (acetato di etile/etere di petrolio). MS (m/e): 427 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3417-3217 (NH), 1723 e 1660 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.23 (3H, singoletto, CH₃); 2.55 (3H, singoletto, CH₃); 2.85 (3H, singoletto, CH₃); 5.16 (2H, singoletto, CH₂); 6.35 (1H, singoletto, NH); 7.28-7.53 (9H, un set di segnali, C₆H₄ e C₆H₅).

1-(3-clorofenil)-3-metil-4-benzilossicarbonilammino-5-(N₁-metil-N₃-etilureido)pirazolo **12d**

Resa 70%; p.f.: 154-157°C (acetato di etile/etere di petrolio). MS (m/e): 441 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3407 e 3208 (NH), 1723 e 1637 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 0.91-1.00 (3H, singoletto, CH₃); 2.23 (3H, singoletto, CH₃); 2.85 (3H, singoletto, CH₃); 3.13 (2H, segnale non risolto, CH₂); 5.15

(3H, singoletto, CH₂ e NH); 6.35 (1H, singoletto, NH); 7.23-7.52 (9H, un set di segnali, C₆H₄ e C₆H₅).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-4-benzilossicarbonilammino
5-(N₁,N₃-dimetilureido)pirazolo **12e**

Resa 74%. MS (m/e): 461 (M⁺). I.R.(esaclorobutadiene, cm⁻¹): 3400-3200 (NH), 1734 e 1694 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.11 (3H, singoletto, CH₃); 2.62 (3H, singoletto, CH₃); 2.90 (3H, singoletto, CH₃); 5.16 (2H, doppietto, CH₂); 5.70 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 7.21-7.38 (8H, un set di segnali, C₆H₃ e C₆H₅); 8.55 (1H, segnale allargato, NH).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-4-benzilossicarbonilammino
5-(N₁-metil-N₃-etilureido)pirazolo **12f**

Resa 70%; p.f.: 140-141°C (acetato di etile/etere di petrolio). MS (m/e): 475 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3414-3224 (NH), 1723 e 1665 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 0.99-1.05 (3H, singoletto, CH₃); 2.24 (3H, singoletto, CH₃); 2.95 (3H, singoletto, CH₃); 3.15 (2H, segnale non risolto, CH₂); 5.16 (3H, singoletto, CH₂ e NH); 6.02 (1H, singoletto, NH); 7.28-7.39 (8H, un set di segnali, C₆H₃ e C₆H₅).

1-fenil-3-metil-6,7-dimetil-pirazolo [3,4-d]triazolo **13a**

Resa 40%; p.f.: 159-160°C (etanolo) (Let. 160-162°C [37]). MS (m/e): 213 (M⁺ -CH₃NCO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm):

2.57 (3H, singoletto, C-CH₃); 4.15 (3H singoletto, N-CH₃); 7.51-7.30 (5H, un set di segnali, C₆H₅).

1-fenil-3-metil-4-ammino-5-(N₁,N₃-dimetilureido)
pirazolo **1a**

Resa 62%; p.f.: 183-186°C (acetato di etile). MS (m/e): 259 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3399 e 3324 (NH₂ e NH), 1654 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.28 (3H, singoletto, CH₃); 2.81 (3H, doppietto, CH₃); 2.95 (3H, singoletto, CH₃); 3.60 (2H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 4.97 (1H, segnale non risolto, scambiabile con D₂O, NH); 7.27-7.43 (5H, un set di segnali, C₆H₅).

1-fenil-3-metil-4-ammino-5-(N₁-metil-N₃-etil-ureido)
pirazolo **1b**

Resa 58%; p.f.: 138-140°C (acetato di etile). MS (m/e): 273 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3412-3200 (bande multiple, NH₂ e NH), 1661 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 1.01-1.07 (3H, tripletto, CH₃); 2.27 (3H, doppietto, CH₃); 2.94 (2H, singoletto, scambiabile con D₂O, NH₂); 2.96 (3H, singoletto, CH₃); 3.25 (2H, quadrupletto, CH₂); 4.86 (1H, segnale non risolto, NH); 7.24-7.41 (5H, un set di segnali, C₆H₅).

1-(3-clorofenil)-3-metil-4-ammino-5-(N₁,N₃-dimetil ureido)pirazolo **1c**

Resa 58%; p.f.: 248-250°C (metanolo). MS (m/e): 293 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 3304 (NH₂ e NH), 1653 (CO). ¹H-NMR (DMSO, ppm) 2.55 (3H, singoletto, CH₃); 2.57 (3H, singoletto, CH₃); 2.87 (3H, singoletto, CH₃); 3.4 (2H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH₂); 6.64 (1H, singoletto allargato, scambiabile con D₂O, NH); 7.37-7.54 (4H, un set di segnali, C₆H₄).

1-(3-clorofenil)-3-metil-4-ammino-5-(N₁-metil-N₃-etil-ureido)pirazolo **1d**

Resa 58%; p.f.: 250-253°C (metanolo). MS (m/e): 307 (M-35). I.R. (KBr, cm⁻¹): 3318 e 3100 (NH₂ e NH), 1649 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 0.87-0.93 (3H, tripletto, CH₃); 2.30 (3H, singoletto, CH₃); 2.89 (3H, singoletto, CH₃); 3.00 (2H, segnale non risolto, CH₂); 3.46 (2H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH₂); 6.64 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 7.37-7.53 (4H, un set di segnali, C₆H₄).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-4-ammino-5-(N₁,N₃-dimetil ureido)pirazolo **1e**

Resa 87%. MS (m/e): 327 (M⁺). I.R. (KBr, cm⁻¹): 3400-3200 (NH₂ e NH), 1690-1654 (CO). ¹H-NMR (DMSO, ppm): 2.10 (3H, singoletto, CH₃); 2.59 (3H, singoletto, CH₃); 2.82

(3H, singoletto, CH₃); 3.49 (2H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH₂); 6.40 (1H, singoletto, scambiabile con D₂O, NH); 7.39-7.48 (3H, un set di segnali, C₆H₃).

1-(3,5-diclorofenil)-3-metil-4-ammino-5-(N₁-metil-N₃-etilureido)pirazolo **1f**

Resa 58%; p.f.: 246-250°C (metanolo). MS (m/e): 341 (M⁺). I.R. (KBr, cm⁻¹): 3323 (NH₂ e NH), 1648 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 0.91 (3H, tripetto, J=7.2 Hz, CH₂-CH₃); 2.30 (3H, singoletto, C-CH₃); 2.89 (3H, singoletto, N-CH₃); 2.96 (2H, multipetto, CH₂-CH₃); 3.42 (2H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH₂); 6.66 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 7.37-7.54 (3H, un set di segnali, C₆H₃).

1-fenil-3-metil-pirazolo[3,4-f]-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-one **3a**

¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.42 (3H, singoletto, C-CH₃); 2.81 (3H, doppietto, N-CH₃); 3.44 (3H, singoletto, N-CH₃); 7.48 (singoletto allargato, C₆H₅).

1-fenil-3-metil-pirazolo[3,4-f]-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-one **3b**

¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 1.34 (3H, tripetto, J=7.17 Hz, CH₂-CH₃); 2.43 (3H, singoletto, C-CH₃); 2.81 (3H, singoletto,

N-CH₃); 3.94 (3H, quadrupletto, J=7.17 Hz, CH₂-CH₃); 7.42-7.53 (un set di segnali, C₆H₅).

1-fenil-3-metil-pirazolo[3,4-f]-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-one **3c**

¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.42 (3H, singoletto, C-CH₃); 2.85 (3H, doppietto, N-CH₃); 3.45 (3H, singoletto, N-CH₃); 7.44-7.51 (5H, un set di segnali, C₆H₄).

1-fenil-3-metil-pirazolo[3,4-f]-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-one **3d**

¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 1.32 (3H, tripletto, J=7.25 Hz, CH₂-CH₃); 2.43 (3H, singoletto, C-CH₃); 2.80 (3H, singoletto, N-CH₃); 3.93 (3H, quadrupletto, J=7.25 Hz, CH₂-CH₃); 7.42-7.55 (un set di segnali, C₆H₄).

1-fenil-3-metil-pirazolo[3,4-f]-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-one **3e**

¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.40 (3H, singoletto, C-CH₃); 2.87 (3H, doppietto, N-CH₃); 3.47 (3H, singoletto, N-CH₃); 7.42-7.50 (5H, un set di segnali, C₆H₃).

1-fenil-3-metil-pirazolo[3,4-f]-1,2,3,5-tetrazepin-4(3H)-one **3f**

¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 1.32 (3H, tripletto, J=7.25 Hz, CH₂-CH₃); 2.42 (3H, singoletto, C-CH₃); 2.81 (3H, singoletto,

N-CH₃); 3.93 (3H, quadrupletto, J=7.25 Hz, CH₂-CH₃); 7.36-7.54 (un set di segnali, C₆H₃).

1-(4-ciano-benzoil)-3-metil-5-formilamminopirazolo **18**

Resa 42%. p.f.: 170-176°C. (acetato di etile). MS (m/e): 254 (M⁺). I.R.(KBr, cm⁻¹): 2230 (CN) 1718 (CO aldeidico). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.60 (3H, singoletto, CH₃); 6.42 6.83 (1H, singoletti, H-4 pirazolico, per isomeri E/Z); 7.95 (4H, singoletto, C₆H₄); 8.23 e 8.73 (1H, singoletto, CH aldeidico, per isomeri E/Z); 10.63-10.95 (1H, doppietto e singoletto per NH, isomeri E/Z, scambiabile con D₂O).

1-fenile-3-trifluorometile-5-amminopirazolo **19**.

Resa 98%; p.f.: 101-102°C (etanolo). MS (m/e): 227 (M⁺). I.R.(nujol, cm⁻¹): 3452-3200 (bande multiple, NH₂). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 3.96 (2H, singoletto, scambiabile con D₂O, NH₂); 5.81 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.40-7.54 (5H, un set di segnali, C₆H₅).

1-fenile-3-trifluorometile-5-acetammidopirazolo **23**

Resa 64%; p.f.: 146-148°C (acetato di etile). MS (m/e): 269 (M⁺). I.R.(nujol, cm⁻¹): 3240-3200 (NH), 1673 (CO). ¹H-NMR (CDCl₃, ppm): 2.01 (3H, singoletto, CH₃); 6.79 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.35-7.48 (5H, un set di segnali, C₆H₅); 7.82 (1H, singoletto, scambiabile con D₂O, NH).

1-fenile-3-trifluorometile-5-metilacetamminopirazolo

24.

Resa MS (m/e): 283 (M^+). I.R.(esaclorobutadiene, cm^{-1}): 1690 (CO). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 1.85 (3H, singoletto, C-CH₃); 3.12 (3H, singoletto, N-CH₃); 6.61 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.43-7.52 (5H, un set di segnali, C₆H₅).

1-fenile-3-trifluorometile-5-metilamminopirazolo **25.**

Resa 76%. MS (m/e): 241 (M^+). I.R.(esaclorobutadiene, cm^{-1}): 3300-3415 (NH). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm})$: 2.81 (3H, doppietto, CH₃); 3.89 (1H, segnale allargato, scambiabile con D₂O, NH); 5.73 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.36-7.46 (5H, un set di segnali, C₆H₅).

1-fenile-3-trifluorometile-5-N-metile-N-nitrosoammino
pirazolo **26**

Resa 42%. MS (m/e): 271 ($M^+ + 1$). $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \text{ppm})$: 3.08 (3H, singoletto, CH₃); 6.83 (1H, singoletto, H-4 pirazolico); 7.40-7.54 (5H, un set di segnali, C₆H₅).

Parte sperimentale biologica

I composti **3a-c**, **6a-g** e **9c-f** sono stati saggiati *in vitro* per l'attività antiproliferativa contro le linee cellulari K562 (leucemia mieloide cronica umana), HL60 (leucemia linfocitaria umana), MCF7 (adenocarcinoma mammario umano) e L1210 (leucemia murina). Queste linee cellulari sono state fatte crescere a 37°C in un atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂, in RPMI-1640 medium (Sigma), addizionato con il 10% di siero di vitello fetale e antibiotici.

Le cellule furono sospese alla densità di 2 x 10⁵ cellule per ml in terreno di crescita per la linea cellulare HL60 e 1 x 10⁵ cellule per ml le linee cellulari K562 e L1210, trasferiti in una piastra a 24 pozzetti (1 ml per pozzetto), coltivate con o senza composti da testare e incubate a 37°C per 48h per le linee cellulari K562 e HL60 e per 72h per la linea cellulare L1210. I numeri delle cellule vive furono determinati tramite la conta in ematocitometro dopo esclusione delle cellule morte con tripan blue.

L'attività antiproliferativa contro le MCF7 fu determinata tramite saggio con MTT. In questo caso le cellule furono sospese alla densità di 4 x 10⁵ cellule per ml in RPMI-1640 senza rosso fenolo, addizionato con il 10% di siero di vitello fetale, lo 0.025% di glutamina e antibiotici, trasferiti (50 µl per pozzetto) in una piastra a 96 pozzetti contenente

50µl del terreno descritto, coltivate con o senza composti da testare e incubate a 37°C per 4 giorni. Gli effetti antiproliferativi dei composti furono valutati in termini di percento di inibizione della crescita. L'attività di questi composti in cui i valori di inibizione della crescita erano più grandi del 15% alla concentrazione screening di 100 µM sono stati riportati in tabella II. I valori delle IC₅₀ (concentrazione testata alla quale la proliferazione cellulare venne inibita del 50% rispetto alla crescita del controllo non trattato) per i composti che mostrarono a 100 µM un percento di inibizione della crescita maggiore del 50% sono stati riportati in tabella II.

Riferimenti bibliografici

1. L. Fernandes, A.P. Francisco, J. Iley, E. Rosa, J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2, 2313 (1994).
2. A.Tontini, G. Gatti, G. Diamantini, G. Tarzia, J. Chem. Soc. Perkin, 2, 2361-2363 (1998).
3. P. Diana, P. Barraja, A. Lauria, A.M. Almerico, G. Cirrincione, A. Loi, C. Musiu, A. Pani, P. La Colla, M. Marongiu, Eur. J. Med. Chem., 34, 353-360 (1999).
4. J.L. Skiba, G.T. Bryan, Toxicol. Appl. Pharmacol., 18, 707-719 (1971)
5. N.S. Mizuno, E.W. Humphrey, Cancer Chemoth. Rep., Part 1 56, 465-472 (1972).
6. C.V. Catapano, M. Broggin, E. Erba, M. Ponti, L. Mariani, L. Citti, M. D'Incalci, Cancer Res., 47, 4884-4889 (1987).
7. J.H.M. Van Delft, A. Luiten-Schuite, V.L. Souliotis, S.A. Kyrtopoulos, J. Ouwerkerk, H.J. Keizer, R.A. Baan, Biomarkers, 1, 94-98 (1996).
8. G.E. Housholder, T.L. Loo, Life Sci., 8, 533-536 (1969).
9. G.E. Housholder, T.L. Loo, J. Pharmacol. Exp. Ther., 179, 386-395 (1971).
10. K. Vaughan, in E.Y. Wilman (Ed.), Chemistry of antitumor agents, Chapman and Hall, N.Y., 1990, pp.159-164.

11.A.H. Gerulatth, T.L. Loo, *Biochem. Pharmacol.*, 21, 2335-2343 (1972).

12.P.P. Saunders, L.Y. Chao, *Canc. Res.* 34, 2464-2469 (1974).

13.G. Sava, T. Giraldi, L. Lassiani, C. Nisi, *Cancer Treat. Rep.*, 66, 1751-1755 (1982).

14.F.S. Stevens, B.S. Brown, T.P. Hulley, S. Itzhaki, T. Giraldi, L.B. Lassiani, *Biochem. Intern.*, 11, 153-160 (1985).

15.U.S. Lucas, A.T. Huang, in H.F. Siegler (Ed.), *Development in Oncology*, Martinus Nijhoff, the Hague, The Netherlands, 1982, Vol. 5, p. 382.

16.A.S. Clark, B. Deans, M.G. Stevens, M.J. Tisdale, R.T. Wheelhouse, B.J. Denny, J.A. Hartley, *J. Med. Chem.*, 38, 1493-1504 (1995).

17.S. Viviani, G. Bonadonna, A. Santoro, V. Bonfante, M. Zanini, L. Devizzi, F. Soncini, P. Valagussa, *J. Clin. Oncology*, 14, 1421-1430 (1996).

18.B. Jansen, V. Wacheck, E. Heere-Ress, H. Schlagbauer-Wadl, C. Hoeller, T. Lucas, M. Hoermann, U. Hollestein, K. Wolff, H. Pehamberger, *The Lancet*, 356, 1728-1733 (2000).

19.Y.F. Shealy, C.A. O'Dell, *J. Pharm.Sci.*, 60, 554-560 (1971).

20.G. Cirrincione, A.M. Almerico, G. Dattolo, E. Aiello, P. Diana, S. Grimaudo, F. Mingoia, P. Barraja,

Gancitano, *Eur. J. Med. Chem.*, 29, 889-891 (1994).

21.S.M. Reilly, E.S. Newlands, M.G. Glaser, M. Brampton, J.M. riceedwards, R.D. Illingwort, P.G. Richards, C. Colquhoun, P. Lewis, M.F.G. Stevens, *Eur. J. Cancer*, 29A, 940-942 (1993).

22.H.S. Friedman, T. Kerby, H. Calvert, *Clin. Cancer Res.*, 6, 2585 (2000).

23.T. Batchelor, *The Lancet*, 335, 1115-1116 (2000).

24.M. Brada et al., *Br. J. Cancer*, 81, 1022-30 (1999).

25.M.R. Middleton et al., *J. Clin. Oncol.*, 18, 158-66 (2000).

26.B.Dumont-Hornebeck, Y.N. Strube, D. Vasilescu, B.J. Jean Claude, *Biorg. Med. Chem. Let.*, 10, 2325-2327 (2000).

27.B.J. Jean-Claud, A. Mustafa, Z. Damion, J. De Marte, D.E. Vasilescu, R. Yen, T.H. Chan, B. Leyland-Jones, *Biochemical Pharmacology*, 57, 753-762 (1999).

28.P. Diana, P. Barraja, A. Lauria, A.M. Almerico, G. Cirrincione , A. Loi, C. Musiu, A. Pani, P. La Colla, M. Marongiu, *Eur. J. Med. Chem.*, 34, 353-360 (1999).

29.K. Tanaka, T. Suzuki, S. Maeno, K. Mitsuhashi, *J. Heterocyclic Chem.*, 23, 1535-1538 (1986).

30.R. Fusco in *Pyrazoles, Pyrazolines, Pyrazolidines, Indazoles and Condensed Rings*, R.H. Wiley Ed., Interscience Publishers, N.Y. 1967, pp. 91-97.

31.E. Alcade, J. De Mendoza, J.M. Garcia-Marquina,

C. Almera, J. Elguero, *J. Heterocyclic Chem.*, 11, 423-429 (1974).

32. Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc, *Jpn Kokai Tokkio* 88, 147, 279 (1994) (C.A. 94, 121596y).

33. J.J. Lafferty, H.D. Tedeschi, C.L. Zirkle, *U.S. Reissue*, 28, 939, (24 Aug 1976) (C.A. 86, 29826k).

34. W.C. Still, M. Khan, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, 43, 2923-2925 (1978).

35. M. Kocevar, D. Colman, H. Krajnc, S. Polanc, B. Porovne, B. Stanovnik, M. Tisler, *Tetrahedron*, 32, 725-729 (1976).

36. A.J. Shusterman, A. Kumar Debnath, C. Hansch, G.W. Horn, F.A. Fronczek, A.C. Green, S.F. Watkins *Molecular Pharmacology*, 36, 939-944 (1989).

37. E. Gonzales, R. Sarlin, J. Elguero, *J. Heterocyclic Chem.*, 12, 279-285 (1975).

38. E. Alcade, J. De Mendoza, J. Elguero, *Organic Magnetic Resonance*, 4, 733-735 (1972).