



MD 4349 C1 2015.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4349** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07C 337/08* (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01)
C07C 49/543 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2014 0062 (22) Data depozit: 2014.06.23	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.05.31, BOPI nr. 5/2015
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; LIPKOWSKI Andrzej, PL; GARBUZ Olga, MD; MATALINSKA Joanna, PL; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

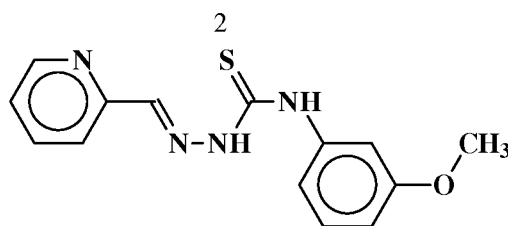
(54) Compusul N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamidă -
inhibitor al proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic din clasa tioamidelor care poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat citostatic la profilaxia și tratamentul melanomului uman.

Esența invenției constă în sinteza compusului N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamidă cu formula:



care manifestă proprietatea de inhibare a
proliferării celulelor MeW-164 ale
melanomului uman.

Revendicări: 2

Figuri: 6

MD 4349 C1 2015.12.31

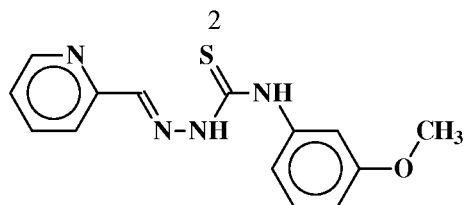
(54) N-(3-methoxyphenyl)-2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazinecarbothioamide compound - inhibitor of human melanoma MeW-164 cell proliferation

(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and medicine, namely to an organic compound from the class of thioamides, which may find application in medicine as a cytostatic agent for the prophylaxis and treatment of human melanoma.

Summary of the invention consists in the synthesis of N-(3-methoxyphenyl)-2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazinecarbothioamide compound of formula:



exhibiting the human melanoma MeW-164 cell proliferation inhibition property.

Claims: 2

Fig.: 6

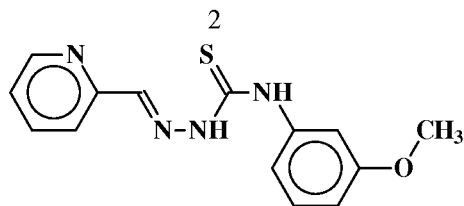
(54) Соединение N-(3-метоксифенил)-2-(пиридин-2-илметилден)-гидразинкарботиоамид - ингибитор пролиферации клеток MeW-164 меланомы человека

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к органическому соединению класса тиоамидов, который может найти применение в медицине в качестве цитостатика для профилактики и лечения меланомы человека.

Сущность изобретения заключается в синтезе соединения N-(3-метоксифенил)-2-(пиридин-2-илметилден)-гидразинкарботиоамида формулы:



который проявляет свойство ингибирования пролиферации клеток MeW-164 меланомы человека.

П. формулы: 2

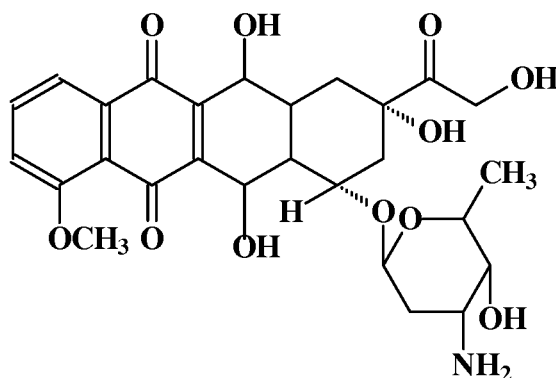
Фиг.: 6

Descriere:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic din clasa tioamidelor care poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat citostatic la profilaxia și tratamentul melanomului uman.

Melanomul uman – unul dintre cele mai periculoase tipuri de cancer uman, o tumoare malignă care se dezvoltă din melanocite, celule producătoare de pigment. Aceste celule sub acțiunea razelor ultraviolete produc colorantul – melanina. Acestea sunt, de asemenea, găsite în cantități mari în negi și alunițe. Degenerarea melanocitelor apare ca rezultat al mai multor factori: radiațiile ultraviolete, traume mecanice, arsuri termice sau chimice etc. Melanomul uman este mai periculos decât alte tipuri de cancer de piele, deoarece metastazează repede și se răspândește la alte organe prin vasele sanguine și ganglionii limfatici.

În practica medicală pentru profilaxia și tratamentul melanomului uman se folosește pe larg doxorubicina – unul din antibioticele din grupa antracicinelor [1], care are următoarea formulă:



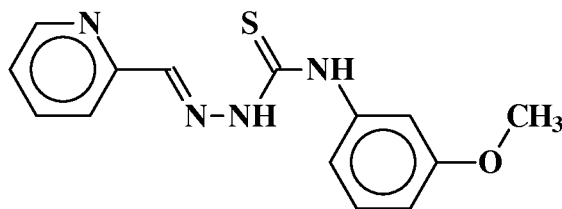
Mecanismul acțiunii doxorubicinei este bazat pe intercalarea celulelor ADN. Ea posedă un spectru larg de acțiune citostatică și se aplică în cazul cancerului glandei mamare, prostatei, sarcomului țesuturilor moi, sarcomului osteogen, tumorii lui Young, cancerului pulmonar, limfosarcomului, cancerului ovarian, cancerului pavimentos de diversă localizare, cancerului vezicii urinare, tumorii lui Williams, cancerului glandei tiroide, melanomului și diverselor leucoze.

Dezavantajele doxorubicinei constau în faptul că întrebuințarea ei este limitată, deoarece nu posedă o activitate anticancerigenă înaltă (concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50}) alcătuiește 4,4...7,5 $\mu\text{mol/L}$), precum și în efectele secundare, pe care le cauzează: în procesul tratamentului cu acest preparat se pot dezvolta cardiomiopatia, dureri în regiunea cardiacă, dereglarea ritmului inimii, insuficiența cardiacă, hipotensiunea.

Anterior, compușii organici din clasa tioamidelor sau derivații lor nu se foloseau în calitate de inhibitori ai melanomului uman (analogul structural lipsește).

Problema pe care o rezolvă invenția constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman cu activitate citostatică înaltă.

Esența invenției constă în sinteza compusului N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamidă cu formula:



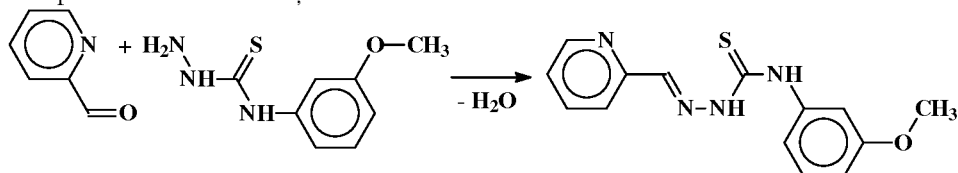
care manifestă proprietatea de inhibare a proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman.

Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de obținere nu sunt descrise în literatură.

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anticancerigene, care depășește de 8,8...15 ori concentrația de inhibare semimaximală (IC₅₀) a doxorubicinei.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitor al celulelor MeW-164 ale melanomului uman se propune N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidă, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Compusul revendicat se obține conform următoarei scheme :



10

Thiosemicarbazona revendică se sintetizează prin condensarea 3-metoxifeniltiosemicarbazidei cu 2-formilpiridina la încălzire într-un amestec de dimetilformamidă-etanol (1:3). Sinteza 3-metoxifeniltiosemicarbazidei inițiale a fost efectuată după metodele descrise în literatură (Kalinowski D.S., Sharpe P.C., Islam M., Liao Y.T., Lovejoy D.B., Kumar N., Bernhardt P.V., Richardson D. R. Design, synthesis and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. Journal of Medicinal Chemistry, 2007, v. 50, p.3716-3729). Puritatea compusului revendicat a fost confirmată cromatografic prin analiza elementală și spectrală (IR, ¹H-RMN și ¹³C-RMN).

Exemplu de obținere a N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidei

La soluția obținută din 0,22 g (2 mmol) 2-formilpiridină în 15 mL etanol se adaugă 0,39 g (2 mmol) 3-metoxifeniltiosemicarbazidă, dizolvată în 5 mL dimetilformamidă, apoi amestecul se încălzește pe baie de apă 1 oră. După răcire produsul final se filtrează, se spală pe filtru cu etanol și se usucă în aer. Se obțin 0,42 g (74%) de produs final. Compoziția substanței a fost stabilită în baza rezultatelor analizei elementelor.

Determinat, %: C – 28,59; H – 4,69; N – 19,31; S – 11,14.

Calculat pentru compusul C₁₄H₁₅N₄OS, %: C – 28,72; H – 4,93; N – 19,57; S – 11,20.

P. t. = 142...144°C.

Spectrul ¹H-RMN (DMSO, d₆), δ, ppm: 3,79 (-CH₃), 8,27 (-HC=N-), 6,83...8,55 (-C₆H₄-, -C₅H₄N),

Spectrul ¹³C-RMN (DMSO, d₆), δ, ppm: 177,20 (C=S); 141,53 (HC=N); 111,51...158,59 (-C₆H₄-, -C₅H₄N); 55,57 (CH₃).

Spectrul IR (fig. 1), cm⁻¹: ν(NH) 3246, 3139, 3006, 2986, 2832; ν(C=N) 1608; δ(C-N) 1198, 1153; ν(C=S) 1107; ν(C-N) 970, 948.

Invenția se explică cu ajutorul desenelor din fig. 1-6, care reprezintă:

– fig 1, spectrul IR N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidei (domeniul 4000...650 cm⁻¹),

– fig 2, microfotografia celulelor melanomului uman MeW-164 cu adaos de 10 μmol de N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidă, este inhibată proliferarea a 82% de celule,

– fig 3, microfotografia celulelor melanomului uman MeW-164 cu adaos de 1 μmol de N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidă, este inhibată proliferarea a 56% de celule,

– fig 4, microfotografia celulelor melanomului uman MeW-164 cu adaos de 0,1 μmol de N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidă, este inhibată proliferarea a 42% de celule,

– fig. 5, microfotografia celulelor melanomului uman MeW-164 fără N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidă (control),

– fig 6, IC₅₀ N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidei este egală cu 0,5 μmol, eroarea determinării alcătuiește ± 5,5%.

- Esența invenției poate fi confirmată prin studierea proprietăților anticancerigene ale N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamiei folosind metoda MTT. Această metodă este bazată pe capacitatea enzimelor mitocondriale de celule vii de a reduce sarea de tetrazoliu (MTT) (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) până la MTT-formazan. Numai celulele vii reduc substratul de MTT galben într-un formazan albastru închis. Celulele moarte și mediul de cultură nu posedă astfel de abilități. Numărul de celule viabile este direct proporțional cu cantitatea de formazan redus, care poate fi determinat spectrofotometric după dizolvarea într-un solvent organic. Pentru experiment au fost utilizate celulele de melanom uman MeW-164 (pasaj 45). Ele au fost derivate de la metastazele melanomului, pe cale chirurgicală de la pacienții Centrului Oncologic din Varșovia. Celule de melanom uman au fost puse în suspensie 90% EAGLE (MEM) (Biomed-Lublin), care conține L-glutamină și ser bovin 10% (FBS, Invitrogen), în baloane de cultură (Cellstar) și incubate la 37°C, 5% CO₂.
- Pentru a separa celulele se utilizează tripsină (EDTA 200 mg/L, Lonza, Belgia). Suspensia de celule a fost centrifugată (MPW 370 centrifugă) la 1000 rot/min timp de 5 min, apoi supernatantul a fost îndepărtat, fără a agita depozitul celular. Diluții suplimentare au fost preparate în mediul de cultură celulară (90% RPMI 1640, conținând 10% FBS ser bovin, Invitrogen) 5x10⁴ celule pe mL.
- Pe plăci cu 96 de godeuri pentru microtitrare s-a adăugat fracția de celule (5x10³ celule/100 pL) și s-a incubat (SANYO incubator cu CO₂) timp de 2 ore. După aceasta s-au adăugat 10 μL de probe experimentale în trei concentrații: 10, 1 și 0,1 μmol (fiecare concentrație a fost testată de trei ori). După incubare timp de 24 ore la 37°C, 5% CO₂, s-au adăugat 10 mL de reactiv MTT (ATCC) în fiecare godeu al plăcilor și din nou au fost întoarse în incubator pentru culturi celulare pentru alte 24 de ore. Celulele au fost examinate periodic sub un microscop inversat (Olympus CK40), pentru depistarea momentului apariției cristalelor violet de formazan. Pentru a dizolva cristalele în toate godeurile, inclusiv cel de control, a fost adăugat solvent organic (reactiv ATCC). Apoi probele cercetate au fost lăsate într-un loc întunecat, timp de 2...4 ore la temperatura camerei. Determinarea cantității de celule de melanom uman MeW-164 a fost efectuată spectrofotometric (spectrofotometru Hamilton HR 7000) cu maximum de absorbție la 540 nm.
- Datele experimentale obținute (fig. 2-5) sunt prezentate în tabel, din care se observă că N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamida inhibă proliferarea celulelor MeW-164 ale melanomului uman în limitele concentrațiilor 0,1...10 μmol/L. La concentrația 10 μmol/L ea inhibă 82%, la 1 μmol/L – 56% de celule MeW-164 ale melanomului uman, iar la concentrația de 0,1 μmol/L – 42%. Concentrația de inhibare semimaximală (IC₅₀), care caracterizează eficacitatea compusului, la N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidă alcătuiește 0,5 μmol/L (fig.6) și de 8,8...15 ori depășește IC₅₀ corespunzătoare a doxorubicinei.

Tabel

Partea celulelor MeW-164 ale melanomului uman inhibitate, %

Concentrație (μmol/L)	Proliferarea celulelor (%)				Partea celulelor inhibate (%)	Eroarea experimentului (%)	IC ₅₀ (μmol/L)
	Numărul experimentului			Rezul- tat mediu			
	I	II	III				
Controlul	71	67	65	68	32	2,8	0,5
0,1	48	63	61	58	42	8,0	
1	40	48	45	44	56	4,0	
10	11	25	18	18	82	7,0	

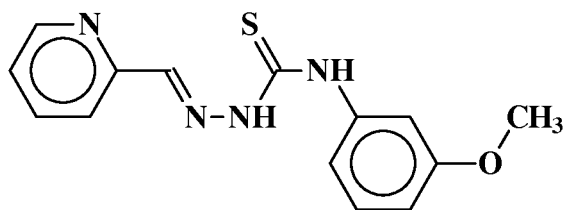
- Proprietățile depistate ale N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamiei prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Anuszevska E., Chlopkiewicz B., Gruber B., Marczevska J., Priebe W., Skurzak H. Estimation of DNA damage and cytotoxicity of anthracycline analogs in human melanoma cells on early and late passages. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2006, vol. 63, nr. 4, p. 321-324

(57) Revendicări:

1. Compusul N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamidă cu formula:



2. Compus, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** manifestă proprietatea de inhibare a proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman.

Șef adjunct Direcție Brevete :

IUSTIN Viorel

Șef Secție Examinare:

GROSU Petru

Examinator:

LEVIȚCHI Svetlana

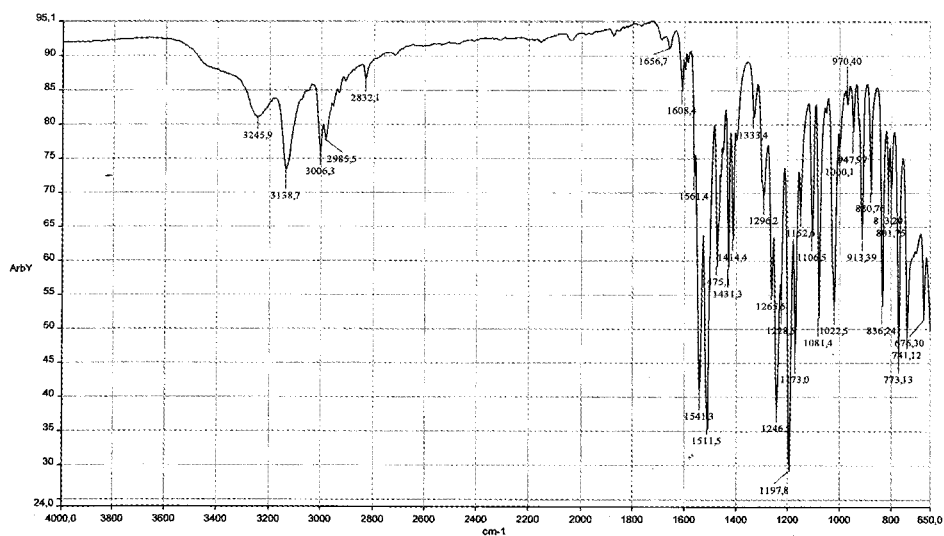


Fig. 1

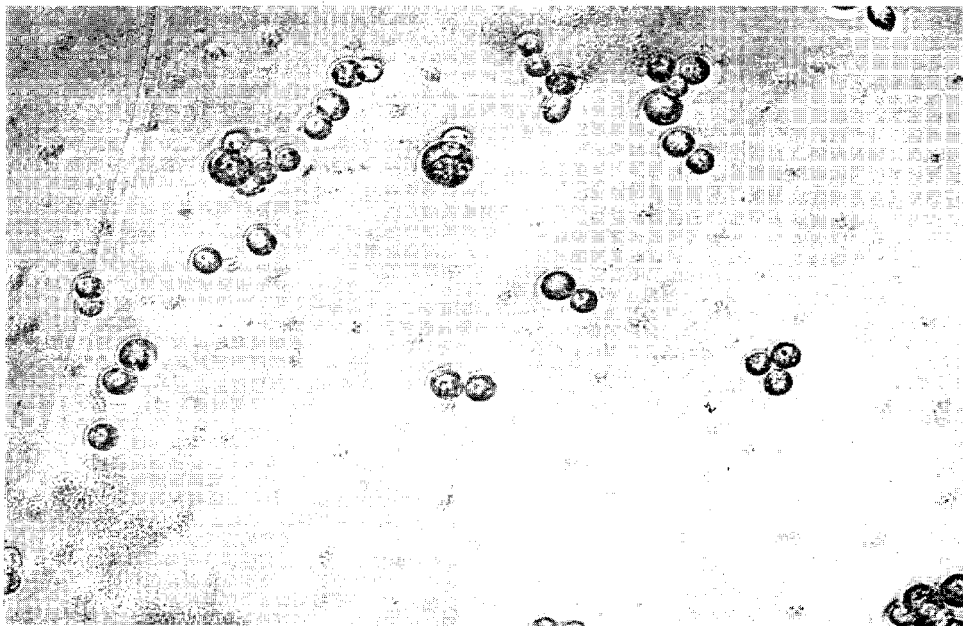


Fig. 2



Fig. 3

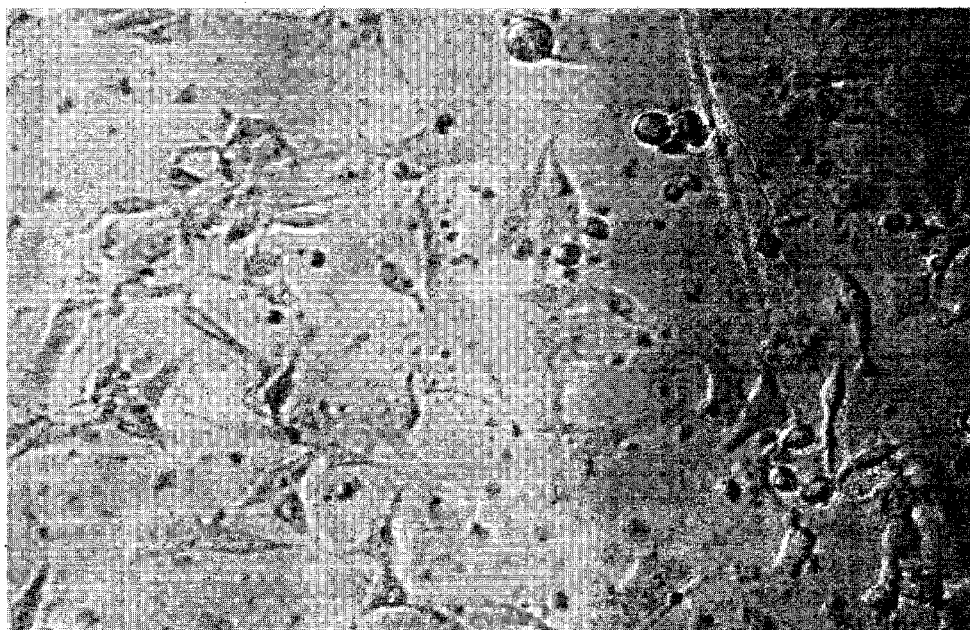


Fig. 4

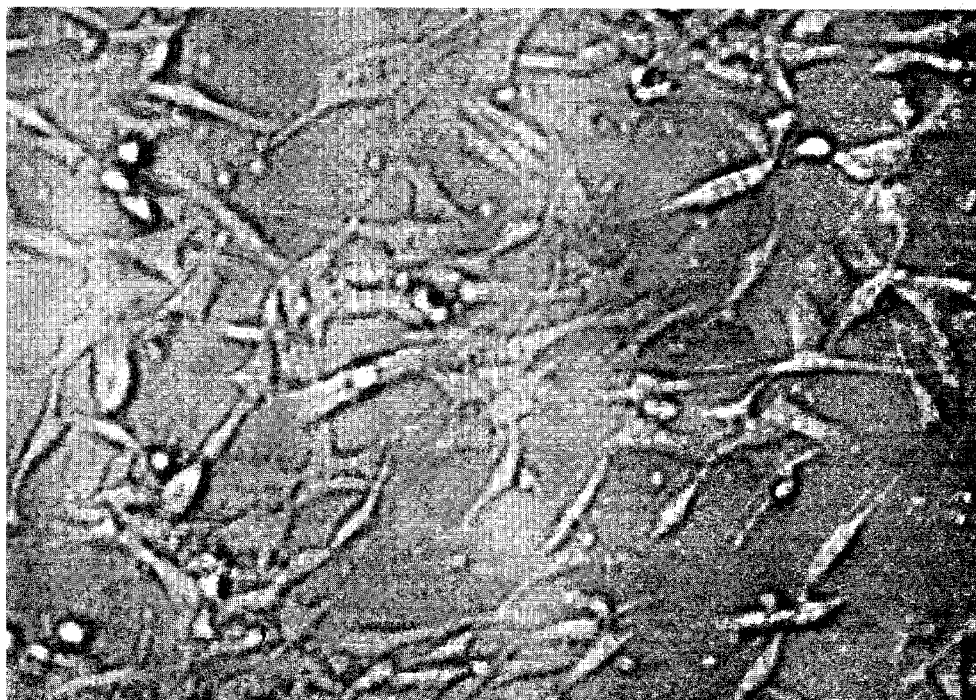


Fig. 5

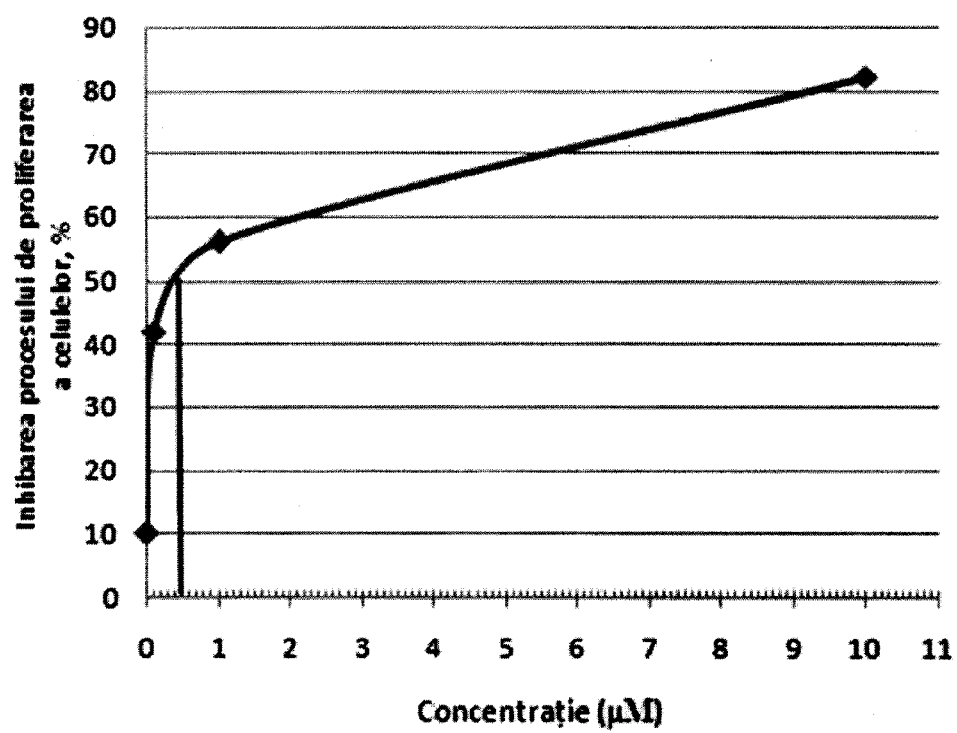


Fig. 6

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2014 0062 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2014.06.23 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (71) Solicitant: **UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD**
 (54) **Titlul: Compusul N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbonat - inhibitor al proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C07C 337/08* (2006.01) *A61K 31/175* (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07C 49/543 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

a) *C07C 337/08 C07D 213/48 C07C 49/543 A61P 35/00 A61K 31/175*
 b) termeni caracteristici în limba română: hidrazincarbonat, formilpiridină, metoxifeniltiosemicarbazidă, tiosemicarbazonă, tioamidă, melanom

"Worldwide" (Espacenet):

a) *C07C 337/08 C07D 213/48 C07C 49/543 A61P 35/00 A61K 31/175*
 b) termeni caracteristici în limba engleză: "methoxyphenyl thiosemicarbazide pyridine", "pyridinecarboxaldehyde thiosemicarbazone", "formylpyridine thiosemicarbazone", antitumour, melanoma

EA, CIS (Eapatis), FIPS(RU), SU:

a) *C07C 337/08 C07D 213/48 C07C 49/543 A61P 35/00 A61K 31/175*
 b) termeni caracteristici în limba rusă: «метоксифенил тиосемикарбазон», «пиридинкарбоксальдегид тиосемикарбазон», «тиосемикарбазон формилпиридин», меланома

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

1. Anuszevska E., Chlopkiewicz B., Gruber B., Marczevska J., Priebe W., Skurzak H. Estimation of DNA damage and cytotoxicity of anthracycline analogs in human melanoma cells on early and late passages. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2006, vol. 63, nr. 4, p. 321-324
 2. Giorgio Pelosi. Thiosemicarbazone Metal Complexes: from structure to activity. The Open Crystallography Journal, 2010, 3, pag. 16-28, (regăsit în Internet la 2015.02.10)
 3. Douglas X. West et al. Copper(II) complexes of 2- formyl-, 6-methyl-2-formyl- and 2-benzoylpyridine N(4)-(2-methylpyridinyl)-, N(4)- (2-ethylpyridinyl)- and N(4)-methyl(2-ethylpyridinyl)thiosemicarbazones. Transition Metal Chemistry, 1996, 21, 289-295; (regăsit în

Internet la 2015.02.11

4. Douglas West, Jack Ingram, Nicole Kozub, Gordon Bain, Anthony Liberta. Copper(II) complexes of 2-formyl-, 2-acetyl- and 2-benzoyl-pyridine N(4)-phenyl-, N(4)-o-methoxyphenyl-, N(4)-p-methoxy-phenyl- and N(4)-p-nitrophenylthiosemicarbazones. Transition Metal Chemistry, June 1996, vol. 21, issue 3, p. 213-218

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D, C	Anuszevska E., Chlopkiewicz B., Gruber B., Marczevska J., Priebe W., Skurzak H. Estimation of DNA damage and cytotoxicity of anthracycline analogs in human melanoma cells on early and late passages. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2006, vol. 63, nr. 4, p. 321-324	1, 2
A	MD 4215 B1 2013.04.30	1, 2
A	MD 3655 B1 2008.07.31	1, 2
A	MD 3771 B1 2008.12.31	1, 2
A	MD 3890 B1 2009.04.30	1, 2
A	MD 3996 B1 2009.12.31	1, 2
A	MD 3995 B1 2009.12.31	1, 2
A	MD 4190 B1 2012.12.31	1, 2
A	Giorgio Pelosi. Thiosemicarbazone Metal Complexes: from structure to activity. The Open Crystallography Journal, 2010, 3, pag. 16-28, (regăsit în Internet la 2015.02.10 URL: < < http://benthamopen.com/contents/pdf/TOCRYJ/TOCRYJ-3-16.pdf >>)	1, 2
A	Douglas X. West et al. Copper(II) complexes of 2- formyl-, 6-methyl-2-formyl- and 2-benzoylpyridine N(4)-(2-methylpyridinyl)-, N(4)- (2-ethylpyridinyl)- and N(4)-methyl(2-ethylpyridinyl)thiosemicarbazones. Transition Metal Chemistry, 1996, 21, 289-295; (regăsit în Internet la 2015.02.11 URL: < < http://www.springerlink.com/content/g90np851733v87lk/ >>)	1, 2
A	Douglas West, Jack Ingram, Nicole Kozub, Gordon Bain, Anthony Liberta. Copper(II) complexes of 2-formyl-, 2-acetyl- and 2-benzoyl-pyridine N(4)-phenyl-, N(4)-o-methoxyphenyl-, N(4)-p-methoxy-phenyl- and N(4)-p-nitrophenylthiosemicarbazones. Transition Metal Chemistry, June 1996, vol. 21, issue 3, p. 213-218 (regăsit in Internet la 2015.02.10 URL:< http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00165969.pdf >)	1, 2
A	CN 101260121 A 2008.09.10	1, 2
A	WO 2010006438 A1 2010.01.21	1, 2
A	US 5721259 A 1998.02.24	1, 2
A	CN 102210698 A 2011.10.12	1, 2
A	US 5281715 A 1994.01.25	1, 2

* categoriile speciale ale documentelor citate:	
A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2015.03.17	
Examinator	
LEVITCHI Svetlana	