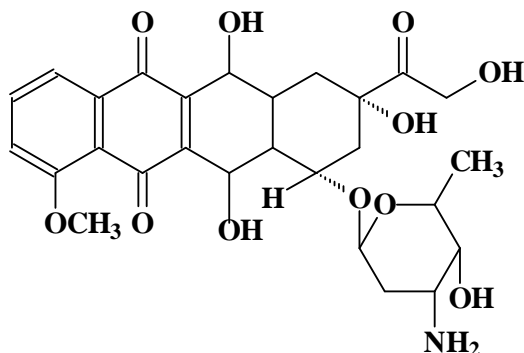


Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic din clasa tioamidelor care poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat citostatic la profilaxia și tratamentul melanomului uman.

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 antraciclinelor [1], care are următoarea formulă:



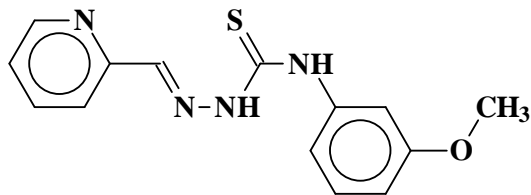
Mecanismul acțiunii doxorubicinei este bazat pe intercalarea celulelor ADN. Ea posedă un spectru larg de acțiune citostatică și se aplică în cazul cancerului glandei mamare, prostatei, sarcomului țesuturilor moi, sarcomului osteogen, tumorii lui Young, cancerului pulmonar, limfosarcomului, cancerului 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)-hidrazincarbotoamidă cu formula:



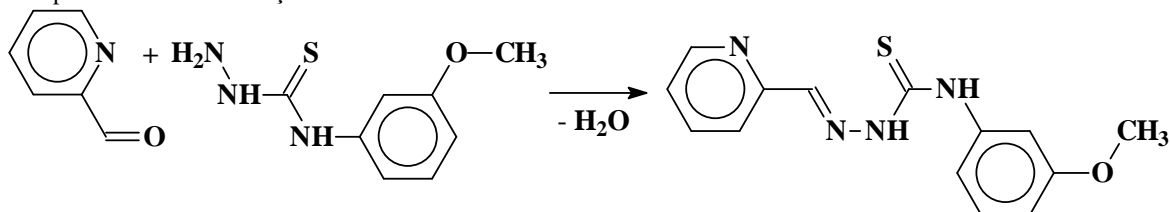
care manifestă proprietatea de inhibare a proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman.

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 (IC_{50}) 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 :



Tiosemicarbazona revendicată se sintetizează prin condensarea 3-metoxi-feniltiosemicarbazidei cu 2-formilpiridina la încălzire într-un amestec de dimetilformamidă-etanol (1:3). Sinteza 3-metoxifeniltiosemicarbazidei inițiale a fost

efectuată după metodicile 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, $^1\text{H-RMN}$ și $^{13}\text{C-RMN}$).

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

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 $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{OS}$, %: C – 28,72; H – 4,93; N – 19,57; S – 11,20.

P. t. = 142...144°C.

Spectrul $^1\text{H-RMN}$ (DMSO, d_6), δ , ppm: 3,79 (-CH₃), 8,27 (-HC=N-), 6,83...8,55 (-C₆H₄-, -C₅H₄N),

Spectrul $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO, d_6), 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} : $\nu(\text{NH})$ 3246, 3139, 3006, 2986, 2832; $\nu(\text{C}=\text{N})$ 1608; $\delta(\text{C}-\text{N})$ 1198, 1153; $\nu(\text{C}=\text{S})$ 1107; $\nu(\text{C}-\text{N})$ 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)-hidrazincarbotoamidinei (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, IC_{50} N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidinei este egală cu 0,5 μmol , eroarea determinării alcătuiește $\pm 5,5\%$.

Esența invenției poate fi confirmată prin studierea proprietăților anticancerigene ale N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidinei 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% CO_2 .

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) 5×10^4 celule pe mL.

Pe plăci cu 96 de godeuri pentru microtitrare s-a adăugat fracția de celule (5×10^3 celule/100 pL) și s-a incubat (SANYO incubator cu CO_2) 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% CO_2 , 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 violete 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 $\mu\text{mol/L}$. La concentrația 10 $\mu\text{mol/L}$ ea inhibă 82%, la 1 $\mu\text{mol/L}$ – 56% de celule MeW-164 ale melanomului uman, iar la concentrația de 0,1 $\mu\text{mol/L}$ – 42%. Concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50}), care caracterizează eficacitatea compusului, la N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamidă alcătuiește 0,5 $\mu\text{mol/L}$ (fig.6) și de 8,8...15 ori depășește IC_{50} corespunzătoare a doxorubicinei.

Tabel

Partea celulelor MeW-164 ale melanomului uman inhibate, %

Concentrație ($\mu\text{mol/L}$)	Proliferarea celulelor (%)			Rezultat mediu	Partea celulelor inhibate (%)	Eroarea experimentului (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
	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)-hidrazincarbotioamidei prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor MeW-164 ale melanomului uman.