



MD 4520 B1 2017.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4520** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07C 337/08* (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

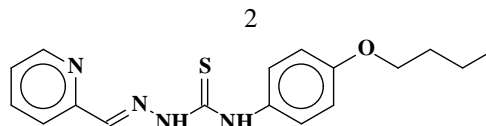
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2016 0141 (22) Data depozit: 2016.12.16	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.10.31, BOPI nr. 10/2017
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; MITKEVICH Natalia, RU; ȚAPCOV Victor, MD; GUDUMAC Valentin, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) **N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbotioamida in calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa tiosemicarbazidelor și poate găsi implementare în medicină ca preparat citostatic pentru profilaxia și tratarea cancerului mamar.

Esența invenției constă în utilizarea compusului nou N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbotioamidei cu formula:



în calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar, care la concentrația de 10^{-7} mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 44,2% de celule T-47D ale cancerului mamar.

Revendicări: 2

Figuri: 1

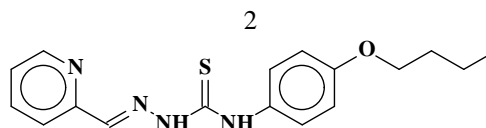
MD 4520 B1 2017.10.31

(54) N-(4-butoxyphenyl)-2-(pyridin-2-ylmethylidene)hydrazinecarbothioamide as T-47D breast cancer cells growth inhibitor

(57) Abstract:

1
The invention relates to chemistry and medicine, namely to a biologically active organic compound of the thiosemicarbazide class and can be used in medicine as a cytotoxic drug in the prevention and treatment of breast cancer.

Summary of the invention consists in the use of a novel compound N-(4-butoxyphenyl)-2-(pyridin-2-ylmethylidene)hydrazinecarbothioamide of formula:



as T-47D breast cancer cells growth and reproduction inhibitor, which at a concentration of 10^{-7} mol/l inhibits the growth and multiplication of 44.2% of T-47D breast cancer cells.

Claims: 2

Fig.: 1

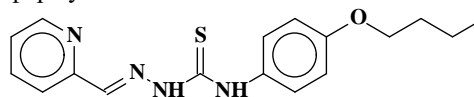
(54) N-(4-бутоксифенил)-2-(пиридин-2-илметилен)гидразинкарботиоамид в качестве ингибитора роста клеток T-47D рака молочной железы

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активному органическому соединению класса тиосемикарбазидов и может найти применение в медицине в качестве цитостатического препарата при профилактике и лечении рака молочной железы.

Сущность изобретения заключается в применении нового соединения N-(4-бутоксифенил)-2-(пиридин-2-

2
илметилен)гидразинкарботиоамид формулы:



в качестве ингибитора роста и размножения клеток T-47D рака молочной железы, который при концентрации 10^{-7} моль/л ингибирует рост и размножение 44,2% клеток T-47D рака молочной железы.

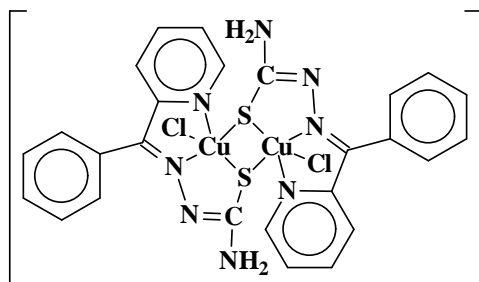
П. формулы: 2

Фиг.: 1

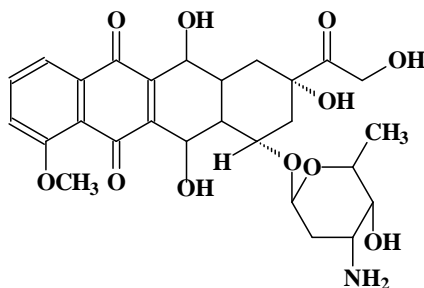
Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa tiosemicarbazidelor. Acest compus inhibă proliferarea celulelor T-47D ale cancerului mamar și poate găsi implementare în medicină ca preparat citostatic la profilaxia și tratarea cancerului mamar.

10 Dintre toți compuși chimici, care conțin în componența lor fragmentul tiosemicarbazidic și care inhibă creșterea și multiplicarea celulelor T-47D ale cancerului mamar, cel mai înalt efect cancerostatic a fost obținut în cazul compusului coordinativ di(μ -S)-bis{cloro[fenil(piridin-2-il)metanontiosemicarbazono(1-)]cupru} (prototip) [1] cu formula:



care la concentrația 10^{-6} mol/L depășește de 10,5...8,8 ori caracteristicile cancerostatice respective ale doxorubicinei:



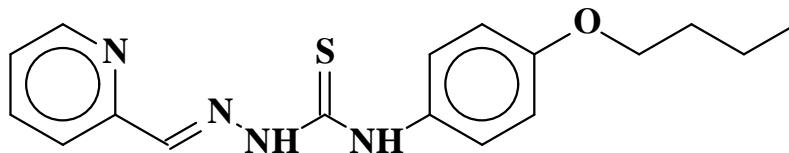
15

care este cel mai eficient preparat chimioterapeutic organic, folosit în practica medicală pentru tratarea și profilaxia cancerului mamar.

Dezavantajul prototipului constă în faptul că el nu posedă o activitate anticancer relativ înaltă și până în prezent nu a găsit o aplicare în medicină.

20 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar cu activitate citostatică înaltă.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar a N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotioamidei ([N-(4-butoxifenil)tiosemicarbazonei 2-formilpiridinei]) cu formula:



25

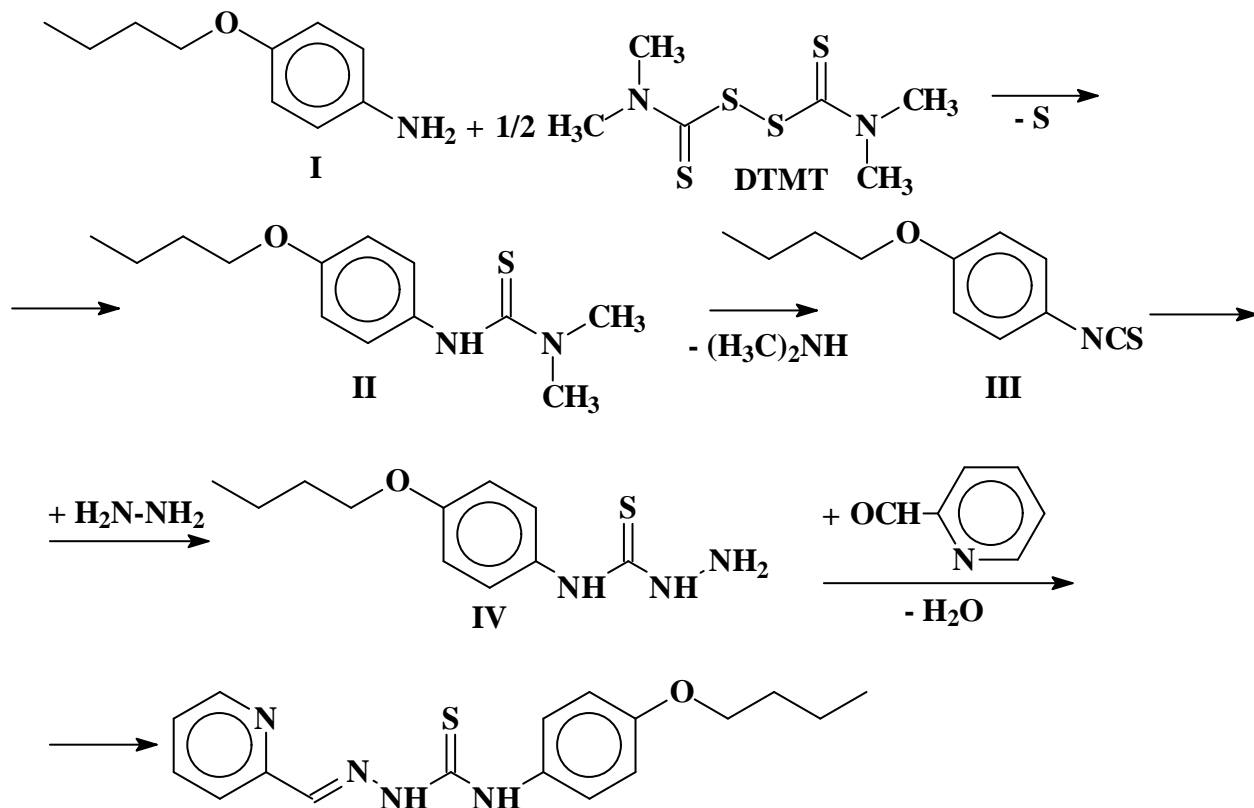
30 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anticancerigene, care la concentrația 10^{-6} mol/L se află la nivelul di(μ -S)-bis{cloro[fenil(piridin-2-il)metanontiosemicarbazono(1-)]cupru} (prototipului), iar la concentrația 10^{-7} mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 44,2% de celule T-47D ale cancerului mamar, în timp ce prototipul nu manifestă la această concentrație activitate anticancerigenă. Proprietatea stabilită a N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotioamidei susnumită este nouă, deoarece până în prezent nu este descrisă utilizarea ei în calitate de inhibitor al creșterii și multiplicării celulelor T-47D ale cancerului mamar.

35 Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul, că pentru prima dată în calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar se propune N-(4-butoxifenil)-2-

(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoioamida, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Compușul revendicat, proprietățile lui și procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

- 5 N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoioamida revendicată se obține conform următoarei scheme:



10

15

20

25

Mecanismul prezentei reacții este următorul: la prima etapă de sinteză 4-butoxianilina (I) reacționează cu tetrametiluram (DTMT) în raport molar de 1:0,5 la încălzire în solvenți polari (etanol, dimetilformamidă sau dimetilsulfoxidă). La următoarea etapă, 3-(4-butoxifenil)-1,1-dimetiltiureea (II) obținută, se supune procesului de deaminare, care constă în încălzirea compusului II cu H₂SO₄ (raport molar al reagenților 1:1) în dioxan cu formarea 1-butoxi-4-izotiocianatobenzenului (III). N-(4-butoxifenil)hidrazintiocarbamida IV se obține prin picurarea soluției de izotiocianat III la exces de hidrat de hidrazină în dioxan. Astfel se exclude aditia tiosemicarbazidei IV formate la izotiocianatul inițial. N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoioamida finală se sintetizează prin condensarea tiosemicarbazidei IV cu 2-formilpiridina la încălzire într-un amestec de dimetilformamidă:etanol (1:3). Sinteza compușilor inițiali I-IV a fost efectuată după metodele standard descrise în literatură. Puritatea lor a fost confirmată cromatografic, prin analiza elementală și spectrală (IR, ¹H și ¹³C-RMN).

Exemplu de obținere al N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoioamidei.

30

La soluția obținută din 0,32 g (0,003 mol) 2-formilpiridină și 2,0 mL etanol se adaugă 0,72 g (0,003 mol) N-(4-butoxifenil)hidrazintiocarbamida (IV), dizolvată în 3 mL dimetilformamidă, apoi amestecul se încălzește la baie de apă 1 oră. Sfârșitul reacției se verifică după consumul aldehidei. După răcire produsul final se filtrează, se spală pe filtru cu etanol și se usucă. Se obțin 0,84 g (80%) de produs final. Compoziția substanței a fost stabilită în baza rezultatelor analizei elementelor.

35

Determinat, %: C - 62,19; H - 5,99; N - 16,81; S - 9,54. Calculat pentru compusul C₁₇H₂₀N₄OS, %: C - 62,17; H - 6,14; N - 17,06; S - 9,76.

P. t. = 242...244°C.

¹H-RMN(DMSO, d₆), δ, ppm: 9,31(s, 1H, NH); 8,95(s, 1H, NH); 8,56 (d, 1H, CH piridinic); 8,27 (s, 1H, CH=N); 7,95 (d, 1H, CH piridinic); 7,76 (t, 1H, CH piridinic); 7,33 (t,

1H, CH piridinic); 7,18 (d, 2H, CH fenilenic); 7,16 (d, 2H, CH fenilenic); 3,91 (t, 2H, CH₂); 1,65 (m, 2H, CH₂); 1,42 (m, 2H, CH₂); 0,90 (t, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (DMSO, d₆), δ, ppm: 177,26 (C=S); 159,24; 156,44; 149,51; 136,55; 133,20; 125,51; 123,70; 122,74; 116,02 (C aromatic); 141,53 (HC=N), 68,18; 31,25; 19,20 (CH₂); 13,80 (CH₃).

Procedeeul de obținere al compusului declarat este simplu în executare, iar substanțele inițiale accesibile. Compusul obținut este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă, bine solubil în alcoolii, clorofom, eter, dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă.

La recristalizarea compusului declarat din soluție etanolică au fost obținute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X (Formula empirică C₁₇H₂₀N₄OS, grupa spațială Pc, parametrii celulei elementare, A: a = 9,596(2); b = 5,6455(12), c = 31,145(9); volumul celulei elementare 1673,2 Å³). A fost stabilit (Fig.), că în celula elementară a compusului se află două molecule de azometină, care au structură practic planară. Fragmentul tiosemicarbazidic în componența ambelor molecule se află în forma tionică [d(C=S) 1,69(3) Å].

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și a cercetărilor fizico-chimice, a fost stabilită compoziția și structura compusului declarat.

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Exemplu al utilizării N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamiei în calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar.

Cultivarea celulelor. Seria de celule T-47D ER-pozitive ale cancerului mamar a fost obținută din colecția de cultivare de tip american (CCTA) și păstrată în fiole de 75 cm³ la 37°C în atmosferă de CO₂ cu umiditatea de 5%. Celulele T-47D au fost cultivate în mediul RPMI cu adaos de 10% ser de bovine fetal (SBF), L-glutamină (2mM), penicilină (100 IU/mL), streptomycină (100 μg/mL) și estradiol (1nM).

Testarea proliferării celulelor. Pentru determinarea cuantificării creșterii celulelor s-a utilizat Testarea Proliferării Celulelor cu Soluții Apoase CellTiter 96[®] (Promega, Nepean, On, Canada) în conformitate cu cerințele de preparare. Celulele T-47D au fost resuspendate în mediul cu adaos de insulină (50 ng/mL) și 5% de cărbune activat acoperit cu dextran tratat cu ser de bovine fetal (SBF) pentru a înlătura rămășițele de estrogen din ser și mediu. Părțile alicote (100 μL) ale suspensiei de celule au fost semănate în 96 plăci cu godeuri (3000 celule/godeuri) în trei exemplare. După 48 ore mediul s-a schimbat, urmand diluarea specifică cu diferiți inhibitori în mediul de creștere. Celule au fost cultivate în absența sau prezența inhibitorilor timp de 3 zile.

Datele experimentale obținute în urma studiului N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamiei declarate în calitate de inhibitor al multiplicării celulelor T-47D indică, că la concentrația 10⁻⁶ mol/L activitatea ei se află la nivelul di(μ-S)-bis{cloro[fenil(piridin-2-il)metanontiosemi-carbazono(1-)]cupru} (prototipului), iar la concentrația 10⁻⁷ mol/L este inhibată creșterea și multiplicarea a 44,2% de celule T-47D ale cancerului mamar, în timp ce prototipul la această concentrație nu manifestă activitate anticancerigenă. În baza datelor experimentale a fost stabilit, că compusul declarat are concentrația de inhibare semimaximală (IC₅₀) egală cu 0,8 μmol/L.

Partea celulelor T-47D ale cancerului mamar inhibitate, %

Compus	Concentrație, mol/L		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Doxorubicina	40	0	0
Di(μ-S)-bis{cloro[fenil(piridin-2-il)metanontiosemi-carbazono(1-)]cupru} (prototipul)	100	38±3,5	0
N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-carbotoamida	100	46,6	44,2

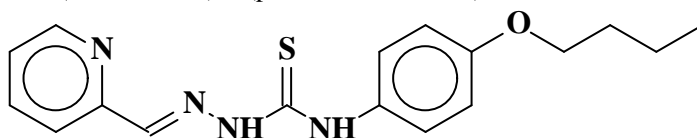
Proprietățile depistate ale N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamiei prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 4132 B1 2011.10.31

(57) Revendicări:

1. N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbotioamida cu formula:



2. Compus, conform revendicării 1, pentru utilizare în calitate de inhibitor al proliferației celulelor T-47D ale cancerului mamar.

