

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243810 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **422340**

(22) Data zgłoszenia: **2017.07.25**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2018.03.26 BUP 07/2018**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.16 WUP 42/2023**

(51) MKP:

C07F 9/40 (2006.01)

C07C 337/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ IM. LUDWIKA
HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK,
Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

WALDEMAR GOLDEMAN, Wrocław, PL
ANNA NASULEWICZ-GOLDEMAN, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Zastosowanie tiosemikarbazonów alfa -ketofosfonianów dialkilowych do wytwarzania preparatu farmaceutycznego

PL 243810 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie tiosemikarbazonu α -ketofosfonianów dialkylowych do wytwarzania preparatu farmaceutycznego.

Tiosemikarbazony wykazują silne właściwości kompleksujące i jako tzw. ligandy *N,N,S*-donorowe silnie chelatują szereg różnych kationów jak na przykład Cu(II), Zn(II), Ni(II), Re(I), Co(II), Ga(III) czy Pd(II) i Pt(II) [T. S. Lobana et al. *Coordin. Chem. Rev.*, 253 (2009) 977–1055]. Wykazują one ponadto szerokie spektrum aktywności biologicznej, jak na przykład aktywność przeciwwirusową (np. *Metisazon* stosowany dawniej jako lek na ospę) czy antybakteryjną (np. *Tioacetazon* stosowany w klinice w terapii wspomagającej leczenie gruźlicy).

Choroby nowotworowe obok chorób serca oraz wypadków są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Z tego powodu nie słabną poszukiwania nowych związków chemicznych o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej.

Ze względu na silne powinowactwo do jonów żelaza Fe(II) i Fe(III) tiosemikarbazony zaliczane są do grupy tzw. chelatorów żelaza o aktywności przeciwnowotworowej. Aktywność ta związana jest z możliwością wiązania żelaza wchodzącego w skład reduktazy rybonukleotydu (RNR) – enzymu biorącego udział w kluczowej dla syntezy DNA reakcji przemiany rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów. Spośród opisanych w literaturze naukowej chelatorów żelaza o aktywności przeciwnowotworowej to właśnie tiosemikarbazony są obecnie najszerzej badaną i wzbudzającą największe zainteresowanie grupą związków. Odzwierciedleniem tego jest *Triapina* – tiosemikarbazon aldehydu 3-amino-2-pirydylowego wykazujący szczególnie skuteczne działanie w przypadku nowotworów płuc, jajników i białaczki [Yu, Y. et al. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(23), 6876–6883], czy jeszcze bardziej aktywna *N,N*-dimetylowa pochodna di-2-pirydylo ketonu tzw. Dp44mT [Yuan, J. et al. *Blood*, 2004, 104(5), 1450–1458].

Obszerne badania pokazały, że przeciwnowotworowe działanie tiosemikarbazonów jest dużo bardziej złożonym procesem, który może zachodzić według kilku mechanizmów. Okazało się, że samo powinowactwo do jonów żelaza nie zapewnia aktywności, konieczne jest tworzenie tzw. aktywnych kompleksów redoks. Co więcej, wiązanie się tiosemikarbazonu z podjednostką R2 reduktazy rybonukleotydu nie jest jedynym mechanizmem przeciwproliferacyjnej aktywności tej grupy związków. Tiosemikarbazony mogą indukować także apoptozę oraz mieć wpływ na topoizomerazę α II. Szereg skutków ubocznych jak methemoglobinemia w przypadku *Triapiny* czy kardiotoxiczność Dp44mT, oraz złożone mechanizmy działania sprawiają, że ciągle poszukuje się nowych tiosemikarbazonów.

Istotą wynalazku jest związek o wzorze 1, w którym R oznacza podstawnik α -naftyl, β -naftyl, fenyl podstawiony grupą metoksyłową, metylosulfanyłową, dimetyloaminową lub atomem bromu lub fluoru, podstawnik 2-fenyletylowy, cykloheksyłowy lub grupę *n*-alkilową C1, C5, C7, C9, C11 i C13, natomiast Alk oznacza etyl, *n*-butyl, izopropyl lub *n*-heksyl do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych, w szczególności nabłoniaka nerwowego, ludzkiego raka płuc oraz ludzkiego raka jajnika.

Jako modele badawcze do oceny aktywności tiosemikarbazonów α -ketofosfonianów dialkylowych wybrano linię nabłoniaka nerwowego SK-N-MC, ludzkiego raka płuc A-549 oraz linię ludzkiego raka jajnika SKOV-3.

Wynalazek został bliżej przedstawiony w przykładzie realizacji.

Przykład 1

Opis i schemat oceny aktywności przeciwproliferacyjnej tiosemikarbazonów α -ketofosfonianów dialkylowych:

Komórki nabłoniaka nerwowego SK-N-MC, ludzkiego raka płuc A-549 oraz raka jajnika SKOV-3 pochodzące z hodowli *in vitro* nanoszono na płytkę 96-dołkową w liczbie 1×10^4 (dla komórek SKOV-3 i SK-N-MC) lub $0,25 \times 10^4$ (dla komórek A-549) na dołek w objętości 100 μ l medium hodowlanego z dodatkiem surowicy bydlęcej płodowej (FBS) i antybiotyków. Po 24 godzinach inkubacji w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO₂ komórki traktowano odpowiednim tiosemikarbazonem w stężeniach 100, 100, 10, 1 i 0,1 μ g/ml (w końcowej objętości 100 μ l), pod kontrolą komórek, do których dodano wyłącznie 100 μ l medium hodowlanego. Roztwór tiosemikarbazonu przygotowywano *ex tempore*, rozpuszczając naważkę związku w DMSO, a następnie dopełniając medium hodowlanym do stężenia związku 2 mg/ml. Kolejne rozcieńczenia wykonywane były w medium hodowlanym. Po kolejnych 72 godzinach inkubacji w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO₂ określano

stopień zahamowania proliferacji komórek SK-N-MC, A-549 i SKOV-3 pod wpływem danego tiosemikarbazonu.

Do odczytu testu stosowano metodę SRB [wg Skehan P. et al. J Natl Cancer Inst, 1990, 82, 1107–1112].

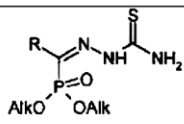
Kontrolę „zerującą” stanowił roztwór pochodzący z dołków zawierających tylko medium hodowlane. Kontrolę pozytywną stanowią komórki nietraktowane tiosemikarbazonami α -ketofosfonianów dialkylowych, zawieszane w medium hodowlanym.

Następnie na podstawie wykresu zależności procentu zahamowania proliferacji komórek od stężenia tiosemikarbazonu określono stężenie poszczególnych tiosemikarbazonów hamujące proliferację komórek SK-N-MC, A-549 i SKOV-3 w 50%, czyli wartości IC_{50} .

Wartości odczytanych IC_{50} dla poszczególnych tiosemikarbazonów α -ketofosfonianów dialkylowych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Wartości IC_{50} uzyskane dla tiosemikarbazonów α -ketofosfonianów dialkylowych oraz Dp44mT jako kontroli dla komórek nabłonika nerwowego SK-N-MC, ludzkiego raka płuc A-549 oraz ludzkiego raka jajnika SKOV-3. (UN – nie aktywny w zakresie stosowanych stężeń)

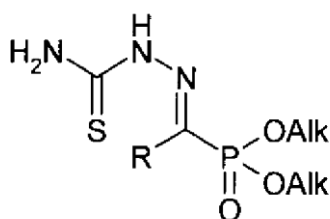
					
			IC_{50} [μ g/ml]		
R	Alk	E/Z (mol/mol)	SK-N-MC	A-549	SKOV-3
Me	Me	100:0	UN	UN	UN
Me	Et	79:21	UN	UN	UN
4-MeC ₆ H ₄	Et	36:64	34,0 ± 0,4	UN	UN
β -naftyl	Et	38:62	31,9 ± 3,7	54,8 ± 27,5	UN
α -naftyl	Et	100:0	58,6 ± 4,1	63,7 ± 10,4	UN
4-ClC ₆ H ₄	Et	28:72	UN	UN	UN
4-MeC ₆ H ₄	Et	0:100	UN	UN	UN
CH ₃ (CH ₂) ₄ -	Et	86:14	33,9 ± 3,1	89,9 ± 8,0	UN
4-MeOC ₆ H ₄	Et	0:100	UN	UN	UN
4-MeOC ₆ H ₄	Et	47:53	87,4 ± 3,8	UN	UN
Ph	Et	39:61	UN	UN	UN
4-PhC ₆ H ₄	Et	40:60	UN	UN	UN
iBu	Et	48:52	UN	UN	UN
Me	n-Bu	77:23	35,6 ± 3,6	87,3 ± 8,0	UN
CH ₃ (CH ₂) ₃ -	Et	60:40	UN	UN	UN
Et	Et	44:56	UN	UN	UN
4-Me ₂ NC ₆ H ₄	Et	58:42	47,8 ± 16,3	UN	UN
4-FC ₆ H ₄	Et	0:100	72,3 ± 21,8	UN	UN
Cyklopropyl	Et	33:67	UN	UN	UN
1-Adamantyl	Et	0:100	UN	UN	UN
4-BrC ₆ H ₄	Et	0:100	32,7 ± 2,5	UN	UN

Me	iPr	87:13	UN	UN	UN
Cyloheksyl	Et	7:93	31,5 ± 9,3	UN	UN
PhCH ₂ CH ₂	Et	11:89	33,2 ± 0,3	57,3 ± 1,2	UN
CH ₃ (CH ₂) ₆ -	Et	78:22	16,8 ± 9,6	29,4 ± 0,6	44,4 ± 11,5
CH ₃ (CH ₂) ₈ -	Et	62:38	3,3 ± 0,1	4,8 ± 1,7	27,9 ± 3,4
CH ₃ (CH ₂) ₈ -	n-Bu	71:29	1,4 ± 1,2	2,7 ± 0,5	7,8 ± 5,6
CH ₃ (CH ₂) ₈ -	i-Pr	60:40	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,7	8,1 ± 3,2
CH ₃ (CH ₂) ₈ -	n-heksyl	55:45	3,1 ± 0,6	3,1 ± 2,3	15,9 ± 10,3
CH ₃ (CH ₂) ₁₀ -	Et	78:22	3,1 ± 0,45	4,6 ± 0,9	31,5 ± 2,1
CH ₃ (CH ₂) ₁₂ -	Et	65:35	1,9 ± 1,1	2,7 ± 0,9	4,2 ± 1,3
Dp44mT			0,34 ± 0,2 (w ng/ml)	5,2 ± 1,0 (w ng/ml)	54,0 ± 11,8 (w ng/ml)

Zastrzezenie patentowe

1. Związek o wzorze 1, w którym R oznacza podstawnik α -naftyl, β -naftyl, fenyl podstawiony grupą metoksyową, metylosulfanylową, dimetyloaminową lub atomem bromu lub fluoru, podstawnik 2-fenyletylowy, cykloheksylowy lub grupę n-alkilową C1, C5, C7, C9, C11 i C13, natomiast Alk oznacza etyl, n-butyl, izopropyl lub n-heksyl do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych, w szczególności nabłoniaka nerwowego, ludzkiego raka płuc oraz ludzkiego raka jajnika.

Rysunek



Wzór 1