(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENŢII ŞI MĂRCI
Bucureşti

ROMÂNIA

(11) **RO 127619 B1**
(51) **Int.Cl.**
*A61K 31/04* (2006.01)

(12) # BREVET DE INVENŢIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01251**

(22) Data de depozit: **30/11/2010**

(45) Data publicării menţiunii acordării brevetului: **30/03/2018** BOPI nr. **3/2018**

(41) Data publicării cererii:
**30/07/2012** BOPI nr. **7/2012**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAŢIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU TEHNOLOGII CRIOGENICE ŞI IZOTOPICE - ICSI RÂMNICU VÂLCEA**,
*STR.UZINEI NR.4, OP RÂURENI, CP.7, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO*

(72) Inventatori:
• **NICULESCU VIOLETA-CAROLINA**,
*STR.DACIA NR.10, BL. UJCM, SC.B, ET.1, AP.8, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;*
• **TAMAIAN RADU**,
*STR. CALEA LUI TRAIAN NR.60, BL.S31, SC.A, AP.7, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;*
• **MARCUS IOAN**, *STR. TĂŞNAD NR. 17, BL. P6, SC. 1, ET.1, AP. 19, CLUJ- NAPOCA, CJ, RO;*
• **POPESCU IULIA LUCIANA**,
*SAT RĂDĂCINEŞTI, NR.259, COMUNA BERÎSLĂVEŞTI, VL, RO;*
• **SEVASTRE BOGDAN**,
*STR. GRIGORE ALEXANDRESCU NR. 7, BL. E13, SC. 1, ET. 2, AP.11, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**YASMINE M. KANAAN, DOUGLAS F. WHITE, JHARNA R. DAS, SOLOMON BERHE, OLADAPO BAKARE, HILLAIRE KENGUELE, DESTA BEYENE, YANFEI ZHOU, AGNES A. DAY ŞI ROBERT L. COPELAND JR., "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL UNSYMMETRICAL AND SYMETRICAL 3-HALO-OR 3- METHOXY-SUBSTITUED 2-DIBENZOYLAMINO-1,4-NAPHTOQUINONE DERIVATES", MOLECULES, VOL. 18, PP. 1973-1987, 2013**

(54) # DERIVAT NAFTALENDIONIC UTILIZAT ÎN CONTROLUL CREŞTERII TUMORALE

*Examinator*: **dr. chimist CONSTANTINESCU ADELA**

*Orice persoană are dreptul să formuleze în scris şi motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenţie, în termen de 6 luni de la publicarea menţiunii hotărârii de acordare a acesteia*

RO 127619 B1

Invenţia se referă la utilizarea unui derivat naftalendionic (DN) 2,3-disubstituit, clorurat, cu formula $C_{16}H_9ClN_2O_3$: N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă (fig. 1), în controlul creşterii tumorale, şi la un preparat injectabil, sub formă de soluţie injectabilă, care îl conţine.

Cercetările efectuate în domeniul terapiei cancerului au condus la dezvoltarea a numeroase clase de compuşi organici cu activitate antitumorală/anticancerigenă promiţătoare. Dintre numeroşii compuşi naturali sau sintetici studiaţi pentru potenţialul lor anticancerigen, compuşii cu structură naftalendionică reprezintă o parte importantă. **P. Babula, V. Adam, L. Havel şi R. Kizek în articolul *Naphthoquinones and their Pharmacological Properties,* publicat în Ceskâ a Slovenskâ Farmacie 2007, 56:114-120**, au menţionat că naftochinonele sunt compuşi fenolici larg răspândiţi în natură, care se leagă de ADN şi inhibă procesele de replicare, interacţionând şi cu numeroase enzime cheie, făcându-le utilizabile în China şi în ţările din America de Sud în fitoterapia afecţiunilor maligne. **B. H. Kim, J. Yoo, S. H. Park, J. K. Jung, H. Cho şi Y. Chung, în articolul *Synthesis and evaluation of antitumor activity of novel 1,4-naphthoquinone derivatives (IV),* Archive of Pharmacal Research 2006; 29:123-130,** descriu sinteza unor derivaţi dimetoxi- şi dihidroxi-1,4-naftochinonici, precum şi activitatea lor antitumorală la şoarecii cu transplant de cancer murinic, linia celulară S180.

Gruparea farmacoforă 1,4-naftalendionică este cunoscută ca având pronunţate efecte biologice în derivaţii 2,3-disubstituiţi, conducând la activităţi antitumorale/antiproliferative. **G.Y. Song, Y. Kim, X.G. Zheng, Y.J. You, H. Cho, J.H. Chung, D.E. Sok şi B.Z. Ahn, în *Naphthazarin derivatives (IV): synthesis, inhibition of DNA topoisomerase I and cytotoxicity of 2- or 6-acyl-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinones,* European Journal of Medicinal Chemistry 2000; 35:291-298, http://doi.org/10.1016/S0223-5234(00)00129-X**, au sintetizat o serie de derivaţi 2- şi 6-acilaţi ai 5,8-dimetoxi-1,4-naftochinonei, cu efecte antitumorale realizate prin inhibarea topoizomerazei I. **E. J. Lee, H. J. Lee, H. J. Park, H. Y. Min, M. E. Suh, H. J. Chung şi S. K. Lee, în *Induction ofG2/M cell cycle arrest and apoptosis by a benz[f]indole-4,9-dione analog in cultured human lung (A549) cancer cells*, Bioorganic Medicinal Chemistry Letters 2004; 14:5175-5178, http://doi.Org/10.1016/j.bmcl.2004.07.062**, au sintetizat 2-amino-3-etoxicarbonil-N-metil-benz[f]indol-4,9-dionă, care a prezentat efecte inhibitoare asupra unor linii celulare de cancer uman (linia A549 - cancer pulmonar, Col2 - cancer de colon şi SNU-638 - cancer stomacal). **A. E. Shchekoikhin, V. N. Buyanov, şi M. N. Preobrazhenskaya** descriu în ***Synthesis of 1-ω-aminoalkyl)naphthoindolediones with antiproliferative properties,* Bioorganic Medicinal Chemistry 2004; 12:3923-3930, http://doi.Org/10.1016/j.bmc.2004.04.042**, prepararea derivaţilor 4,11-dihidroxinafto[2,3-f]indol-5,10-dionici care conţin şi substituenţi N-aminoalchilici, demonstrând şi activitatea lor antiproliferativă ridicată împotriva a 60 de linii celulare de cancer uman (exemplu: linia celulară NCI/ADR de cancer de sân).

**M. T. Smith, C. G. Evans, H. Thor şi O. Sten, în *Quinones-induced oxidative injury to cells and tissues,* în Oxidative Stress, (Editor S. Helmet), Academic Press Inc. London, 1985, ISBN:978-0-12-642760-8, 0-12-642760-7,** au arătat că activarea celulară a compuşilor chinoidici (dicetone cu structura O = C-$(C=C)_n$-C = O) necesită reducerea lor printr-un proces de transfer cu unu sau doi electroni, care poate fi realizat de către mai multe reductaze NADPH, respectiv NADH - caracteristicile redox ale chinonei au fost bine caracterizate şi extrapolarea lor în procesele biologice a furnizat multiple informaţii cu privire la aspectele ei toxicologice. **M. R. S. Kumar, K. Aithal, B. N. Rao, N. Udupa, B. S. S. Rao, în *Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1***

***melanoma tumor cells*, Toxicology in Vitro 2009, 23:242-250**, au studiat potențialul citotoxic al 1,4-naftochinonei împotriva melanomului B16F1 *in vitro,* observând că tratamentul a determinat o citotoxicitate dependentă de concentrație, corelată cu creşterea corespunzătoare a generării de specii reactive de oxigen, sugerând rolul stresului oxidativ în moartea celulară datorată apoptozei.

**S. Patai, în *The Chemistry of the Quinonoid Compounds,* The Hebrew University, Jerusalem. John Wiley & Sons, New York, 1974; Volume II, Part I, ISBN 0 471919160**, pune accent pe grupările funcționale din structurile chinonice şi pe efectele pe care le exercită asupra proprietăților chimice şi fizice, în special în imediata vecinătate a grupării, şi nu în ultimul rând asupra comportamentului întregii molecule. În mod similar, se menționează că parametrii de activare pentru migrația intramoleculară a cationilor creşte odată cu creşterea substituției clorului în aducți radicalici alchiltin-chinonă. **S. Spyroudis în *Hydroxyquinones: Synthesis and Reactivity,* Molecules 2000; 5:1291-1330, doi:10.3390/51201291**, se concentrează în principal asupra chimiei fragmentului de hidroxi-chinonă, prin revizuirea metodele de preparare şi reactivitate. De asemenea, menționează că substituentul clor direct ataşat la ciclul unei chinone poate fi uşor transformat în grupare hidroxil.

Problema tehnică a invenției constă în realizarea unui control eficient al creşterii tumorale.

Soluția la problema tehnică a invenției constă în utilizarea unui derivat naftalendionic 2,3-disubstituit, clorurat, cu formula $C_{16}H_9ClN_2O_3$: N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă (fig. 1), administrat sub forma unui preparat injectabil. De preferință, preparatul injectabil este sub formă de soluție injectabilă.

Substanța activă, N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamida, se poate obține prin substituția selectivă a unuia dintre cei doi atomi de clor din pozițiile 2,3 ale 2,3-dicloro-1,4-dihidronaftalen-1,4-dionei - molecula fiind simetrică.

Această reacție (fig. 2) se poate efectua utilizând ca solvent alcoolul etilic absolut, reactantul fiind piridin-3-carboxamida. Pentru a substitui selectiv un singur atom de clor din molecula 2,3-dicloro-1,4-dihidronaftalen-1,4-dionei este necesar un raport molar de 1:1 între substrat şi reactant - reacția desfăşurându-se într-un interval de timp de 3 h, la refluxare.

Pentru a obține informații referitoare la natura legăturilor chimice şi tipul atomilor implicați în construcția moleculei, s-a înregistrat spectrul IR al compusului, tabelul 2 prezentând frecvențele de absorbție caracteristice grupărilor din moleculă, confirmând astfel, împreună cu analiza elementală (tabelul 1), structura presupusă a moleculei.

*Tabelul 1*

*Detalii ale preparării şi analiza elementală pentru DN*

| Compus | $M_{calc}$ | mp (°C) | tPSA[a] clogP[a] | Aspect | Randament % | Element | Calc./Exp% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DN | 312,71 | 137 | 75,6 2,6854 | Galben | 97 | C | 61,45/61,40 |
| | | | | | | H | 2,90/2,95 |
| | | | | | | N | 8,96/9,00 |
| | | | | | | O | 15,35/15,37 |
| | | | | | | Cl | 11,34/11,38 |
| | | | | | | Ni | 8,68/8,65 |

*Tabelul 2*

*Frecvențele de absorbție în IR caracteristice DN*

| Compus | $\nu_{N-H}$ | $\nu_{C=O}$ | $\nu_{CN}$ legătura dublă C=C | $\nu_{CN}$ legătura $NH_2$ | $\nu_{C-Cl}$ | $\nu_{C=C}$ | $\nu_{C-H}$ | $\nu_{NH}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DN | 3482i<br>3370i | 1670i | 1580i | 1356i | 687i | 1150m | 1005s | 755i |

i = intens, m = mediu, s = slab

Metoda de lucru pentru testarea efectelor antiproliferative (antitumorale) ale compusului N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă constă în prepararea unei soluții injectabile „mamă", obținută prin dizolvarea a 30 mg de compus în 300 µl amestec de excipienți: co-solvent (2,6-di-terț-butil-4-metilfenol ~ 0,02% vol., 5-hidroxi-1,3--dioxan ~ 60% vol., şi 4-hidroximetil-1,3-dioxolan ~ 40% vol.) şi propilen glicol, în raport molar de 2:3, urmată de omogenizare prin agitare energică.

Protocolul de tratament utilizat constă în administrarea injectabilă pe cale intraperitoneală, în două reprize, la interval de 6 zile, a unei cantități de 0,5 mg N-(3-cloro--1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă dizolvată în 0,5 ml amestec de excipienți (ziua 1), respectiv de 0,3 mg N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3--carboxamidă dizolvată în 0,3 ml excipienți în ziua 6. Preparatul injectabil administrat în ziua 1 este obținut prin dizolvarea a 50 ml soluție „mamă" în 2,475 ml amestec de excipienți, la care se adaugă 2,475 ml soluție salină sterilă, rezultând o concentrație finală de 0,5 mg N-(3--cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă la 0,5 ml amestec excipienți per animal, ceea ce este echivalent cu 1,5 mg N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il) piridin-3-carboxamidă la 100 g masă corporală sau cu 15 mg N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă per kg masă corporală. Pentru administrarea II (după 5 zile), soluția injectabilă se obține din 30 ml soluție „mamă" dizolvată în 1,485 ml amestec excipienți, completată cu 1,485 ml soluție salină sterilă, rezultând o concentrație de 0,3 ml N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă la 0,3 ml amestec excipienți per animal, ceea ce corespunde cu 0,9 mg N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2--il)piridin-3-carboxamidă la 100 g masă corporală sau cu 9 mg N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă per kg masă corporală.

Pentru evaluarea efectului antiproliferativ, s-au folosit 32 şoareci albi linia Swiss, femele, cu o greutate de 30,5 ± 1 g. Experimentul s-a desfăşurat pe o perioadă de 14 zile. În ziua 0, toate animalele au primit $10^6$ celule în suspensie de carcinom ascitic Ehrlich (CAE) intraperitoneal.

Animalele au fost împărțite în patru loturi, după cum urmează: primul lot CAE + DN a primit 0,5 mg derivat naftalendionic/animal în ziua 1, şi 0,3 mg naftalendionic/animal în ziua 6. Lotul doi CAE + Exp a primit 0,5 ml amestec excipienți/animal în ziua 1 şi 0,3 ml amestec/animal în ziua 6. Lotul trei CAE + D primeşte clorhidrat de doxorubicină (Adriablastina 10 mg - Pfizer) 0,01 mg/animal în zilele 1 şi 6 ale experimentului, iar lotul patru CAE-M este considerat lotul martor. Animalele au fost cântărite la începutul şi la sfârşitul experimentului. Pentru administrarea intraperitoneală, derivatul naftalendionic a fost preparat după modelul descris. Lavajul peritoneal la animalele care au necesitat această tehnică s-a făcut introducând 1 ml de ser fiziologic în cavitatea abdominală, urmată de recoltarea acestuia cu o pipetă semiautomată.

La finele experimentului, examenul clinic general al loturilor luate în studiu a relevat o stare generală bună. La lotul tratat cu derivat naftalendionic, animalele nu au prezentat modificările comportamentale (stare de abatere şi letargie) constatate în cazul loturilor CAE + Exp şi CAE, tulburări datorate dezvoltării tumorii ascitogene Ehrlich. De asemenea, animalele din lotul CAE + DN au avut un aspect exterior normal, blana prezentând luciul şi integritatea caracteristice. În cazul lotului tratat cu clorhidrat de doxorubicină, animalele au prezentat o uşoară stare de abatere, însoțită de aspectul neîngrijit al blănii animalelor. În urma administrării derivatului naftalendionic la lotul CAE + DN, la finele experimentului s-a observat o uşoară scădere a masei corporale semnificativă statistic față de lotul martor, la lotul CAE + D s-a înregistrat o uşoară creştere, dar şi aici diferența a fost semnificativă statistic față de lotul martor. O explicație a faptului că la lotul CAE + DN nu s-au înregistrat creşteri ale maselor corporale este dată de efectul inhibitor al derivatului naftalendionic asupra dezvoltării tumorale.

Creşterea masei corporale la loturile CAE + Exp şi CAE-M este pusă pe seama dezvoltării carcinomului ascitic Ehrlich. Remarcabil este faptul că în cazul lotului CAE + DN nu s-a înregistrat nici o cantitate de lichid ascitic. Această situație s-a înregistrat şi în cazul lotului CAE + D, dar aici era de aşteptat, deoarece clorhidratul de doxorubicină este un citostatic clasic de uz curent. Un deosebit avantaj al adminstrării derivatului naftalendionic față de doxorubicină rezidă în faptul că cea mai mică concentrație de celule tumorale viabile s-a înregistrat în cazul lotului CAE + DN. De asemenea, în cazul acestui lot, la colorația cu albastru de tripan nu s-au remarcat celule tumorale moarte, rezultând astfel că derivatul naftalendionic nu numai că are efect inhibitor asupra dezvoltării tumorale, ci mai mult, nu prezintă efect citotoxic, cum este cazul doxorubicinei folosite în cazul lotului CAE + D.

Invenția are aplicabilitate în domeniul oncologiei medical-veterinare (de exemplu, metastaze hepatice la câini si pisici) şi experimentale (de exemplu, ATCC® TCP-1011™).

## Revendicări

1. N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă pentru utilizare în controlul creşterii tumorale.

2. Soluție injectabilă care cuprinde 0,1 mg de N-(3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)piridin-3-carboxamidă şi 1 µl amestec de excipienți constând în co-solvent şi propilen glicol în raport molar 2:3.

3. Soluție injectabilă conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** respectivul co-solvent este selectat dintre 2,6-di-terț-butil-4-metilfenol în concentrație de 0,02% vol., 5-hidroxi-1,3-dioxan în concentrație de 60% vol. şi 4-hidroximetil-1,3-dioxan în concentrație de 40% vol.

(51) Int.Cl.
*A61K 31/04* (2006.01)

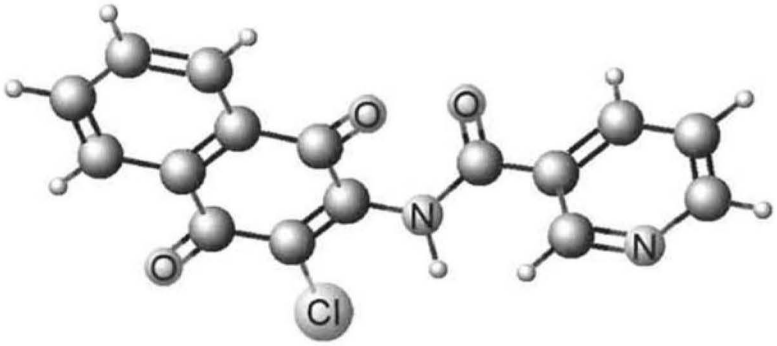


Fig. 1

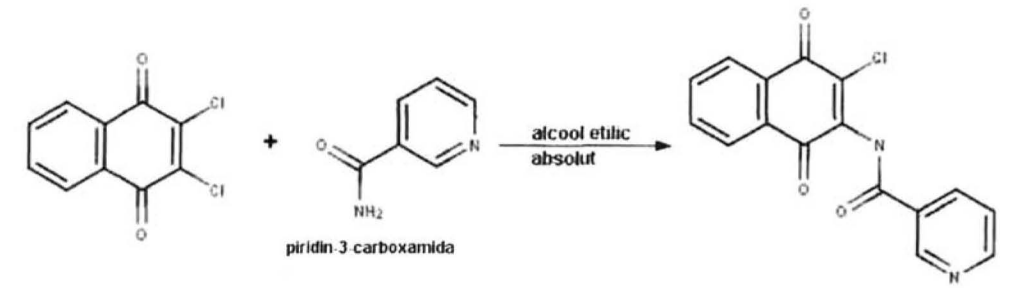


Fig. 2

Editare şi tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenţii şi Mărci
sub comanda nr. 105/2018