



MD 4300 B1 2014.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4300** (13) **B1**
(51) Int.Cl.: *C07F 15/04* (2006.01)
C07C 49/303 (2006.01)
C07C 49/323 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/31 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

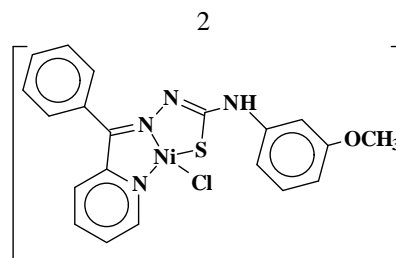
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2012 0128 (22) Data depozit: 2012.12.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.08.31, BOPI nr. 8/2014
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; JALBĂ Angela, MD; ȚAPCOV Victor, MD; ȘOVA Sergiu, MD; POIRIER Donald, CA; COTOVAIA Aliona, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Inhibitor al proliferării celulelor HepG2 în cancerul hepatic în bază de cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]nichel

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, și poate fi aplicată în medicină ca remediu citostatic la profilaxia și tratarea cancerului hepatic.

Esența invenției constă în aceea că în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HepG2 în cancerul hepatic se propune utilizarea unui nou compus, cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]nichel cu formula :



Compusul revendicat se manifestă ca un inhibitor efectiv al proliferării celulelor HepG2 în cancerul hepatic în concentrații de 10^{-5} ... 10^{-6} mol/L.

Revendicări: 2

MD 4300 B1 2014.08.31

(54) Inhibitor of HepG2 cell proliferation in liver cancer based on chloro-[2-phenyl(pyridine-2-yl)methanone-4-(3-methoxyphenyl)thiosemicarbazono]nickel

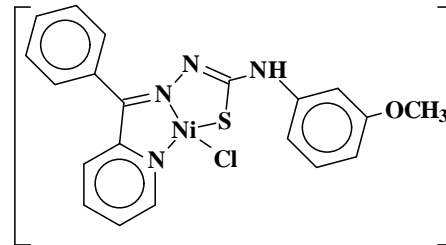
(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry, namely to the synthesis of coordinative compounds from the class of thiosemicarbazones of transition metals and can be used in medicine as cytostatic agent in the prophylaxis and treatment of liver cancer.

Summary of the invention consists in the fact that as inhibitor of HepG2 cell proliferation in liver cancer is proposed the use of a new compound, chloro-[2-phenyl(pyridine-2-yl)methanone-4-(3-methoxyphenyl)thiosemicarbazono]nickel of formula:

2



The claimed compound exhibits itself as an effective inhibitor of HepG2 cell proliferation in liver cancer at concentrations of $10^{-5} \dots 10^{-6}$ mol/L.

Claims: 2

(54) Ингибитор роста клеток НерG2 при раке печени на основе хлоро-[2-фенил(пиридин-2-ил)метанон-4-(3-метоксифенил)тиосемикарбазоно]никеля

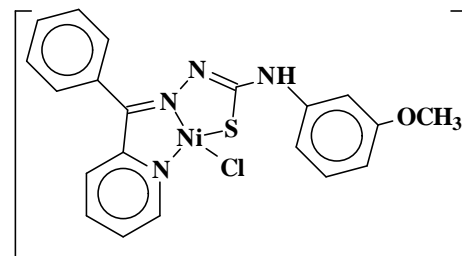
(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии, а именно к синтезу координационных соединений из класса тиосемикарбазидатов переходных металлов, и может быть применено в медицине в качестве цитостатического средства для профилактики и лечения рака печени.

Сущность изобретения состоит в том, что в качестве ингибитора роста клеток НерG2 при раке печени предлагают применение нового соединения, хлоро-[2-фенил(пиридин-2-ил)метанон-4-(3-метоксифенил)тиосемикарбазоно]никеля формулы :

2



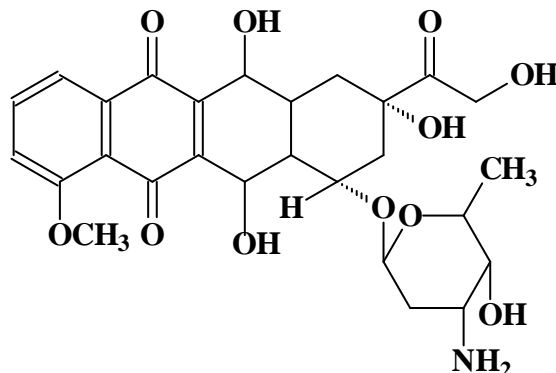
Заявляемое соединение проявляет себя как эффективный ингибитор роста клеток НерG2 при раке печени в концентрациях $10^{-5} \dots 10^{-6}$ моль/л.

П. формулы: 2

Descriere:

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, și poate fi aplicată în medicină ca remediu citostatic la profilaxia și tratarea cancerului hepatic.

În practica medicală, pentru tratarea și profilaxia cancerului hepatic se utilizează doxorubicina (*doxorubicinum*) – unul dintre antibioticele grupeii antracinelor cu următoarea formulă de structură:

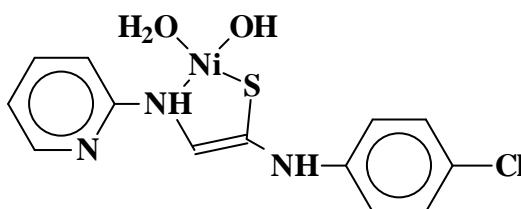


Mecanismul acțiunii doxorubicinei este apropiat de cel al ribomicinei și este bazat pe intercalarea celulelor ADN. Ea se aplică în cazul cancerului glandei mamare, sarcomei țesuturilor moi, sarcomei osteogene, tumorii Young, cancerului pulmonar, limfosarcomei, cancerului ovarian, cancerului pavimentos de diversă localizare, cancerului vizicii urinare, tumorii Williams, cancerului glandei tiroide, diverselor leucoze și limfogranulomatozei [1].

La concentrația de 10^{-5} mol/L doxorubicina inhibă creșterea și multiplicarea a 76,7%, iar la concentrația de 10^{-6} mol/L – 28,6% din celulele HepG2 ale cancerului hepatic.

Dezavantajul acestui compus constă în întrebuințarea lui limitată, deoarece nu posedă o activitate înaltă cancerostatică, precum și în cauzarea unor efecte secundare: se pot dezvolta cardiomiopatii, dureri în regiunea cardiacă, dereglarea ritmului cardiac, insuficiență cardiacă și hipotensiune.

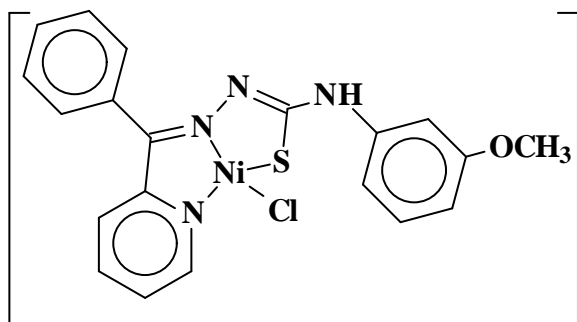
Dintre toți compușii coordinativi ai nichelului, care inhibă creșterea și multiplicarea celulelor HepG2 ale cancerului hepatic [2], cel mai înalt efect cancerostatic a fost obținut în cazul hidroxo-[4-(p-clorofenil)-1-(piridin-2-il)tiosemicarbazido]aquanichel cu formula structurală:



Dezavantajul compusului menționat constă în faptul că nu posedă o activitate cancerostatică suficientă, inhibând la concentrația de 10^{-6} mol/L doar 5% de celule și până acum nu i s-a găsit aplicare în medicină.

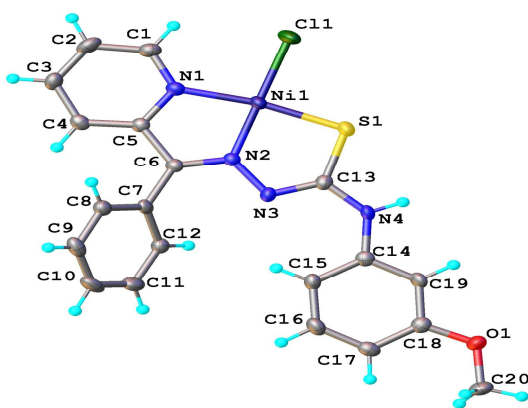
Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor HepG2 ale cancerului hepatic cu activitate citostatică înaltă.

Esența invenției constă în aceea că în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HepG2 în cancerul hepatic se propune utilizarea unui nou compus, cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]nichel cu formula :

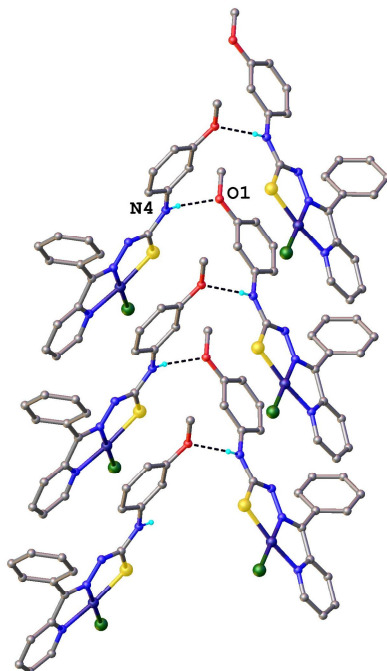


Compusul revendicat se manifestă ca un inhibitor efectiv al proliferării celulelor HepG2 in cancerul hepatic în concentrații de 10^{-5} ... 10^{-6} mol/L.

5 Structura moleculară a cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)-tiosemicarbazono]nichel are următorul aspect:



Formarea structurii supramoleculare 1D are următorul aspect:

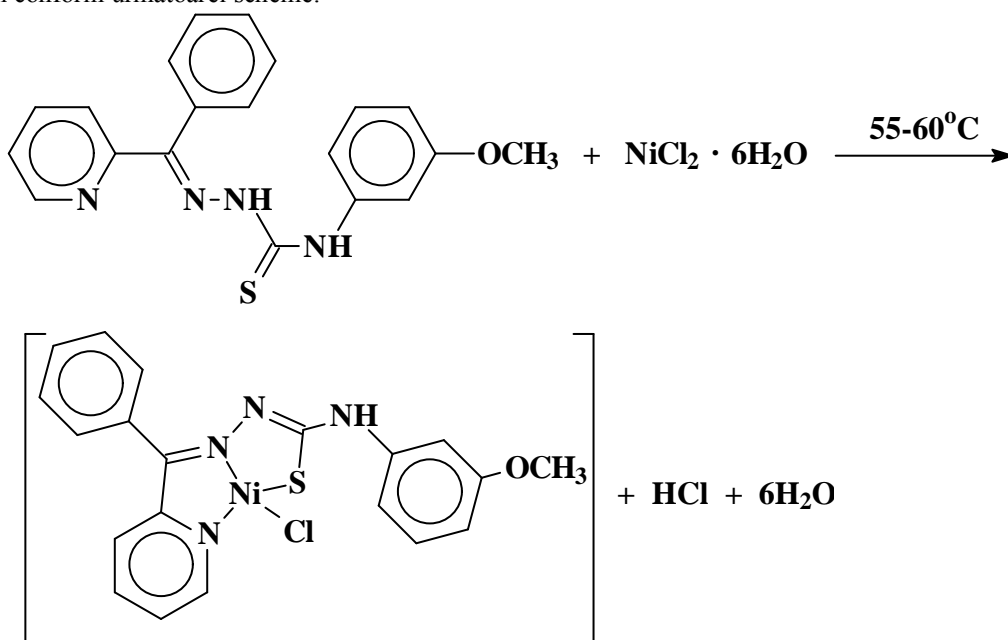


Procesul de sinteză, proprietățile fizico-chimice și cancerostate ale acestui compus nu sunt descrise în literatura de specialitate.

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității cancerostate, care la concentrații de 10^{-5} ... 10^{-6} mol/L depășește de 1,3...1,4 ori caracteristicile analoage ale doxorubicinei și de 8,2 ori ale analogului structural. Proprietatea stabilită a complexului sus-numit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al creșterii și multiplicării celulelor HepG2 ale cancerului hepatic.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HepG2 ale cancerului hepatic se propune cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]-nichel, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Compusul revendicat cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]-nichel se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (55 ... 60°C) ale $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ cu 4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazona 2-benzoilpiridina, luate în raport molar de 1 : 1. Reacția decurge în 45...60 min conform următoarei scheme:



Mecanismul reacției date constă în deprotonarea grupei tiolice a tiosemicarbazonei sus-numite în prezența azotului piridinic al ligandului și coordonarea anionului format la ionul de nichel ca ligand N,N,S-tridentat monodeprotonizat. Al patrulea loc în sfera internă a atomului central îl ocupă atomul de clor.

Procedul de obținere a cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]nichel este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 71%. Complexul sintetizat are culoarea roșie întunecată, este stabil la contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcoolii alifatici, este solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubil în eter.

Exemplu de obținere a cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]-nichel.

La soluția etanolică, care conține 10 mmol de hexahidrat al clorurii de nichel în 20 ml etanol, încălzită (55 ... 60°C) și amestecată în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic, se adaugă o soluție ce conține 10 mmol de 3-metoxifenitiosemicarbazona a 2-benzoilpiridinei în 50 ml de alcool etilic. Amestecul reactant se încălzește în continuare cu refrigerent ascendent pe parcursul a 45...60 min. La răcire, din amestecul reactant se depun cristale mărunte de culoare roșie întunecată, care se filtrează printr-un filtru din sticlă, se spală cu $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, eter și se usucă în aer.

S-a determinat, % : C – 52,90, H – 3,57, Cl – 7,51, N – 12,07, Ni – 12,99, S – 6,88.

Pentru $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ClNi}_4\text{NiOS}$ s-a calculat, % : C – 52,73; H – 3,76, Cl – 7,78; N – 12,30; Ni – 12,88, S – 7,04.

La recristalizarea compusului sintetizat din soluție dimetilformamid-etanolică (1:4) au fost obținute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X. Experimentul s-a efectuat la difractometrul Xcalibur-Gemini "Oxford Diffraction". Structura a fost determinată prin metoda directă și stabilită folosind metoda celor mai mici pătrate în apropiere anizotropă pentru atomii de hidrogen după programele SHELX-97. Atomii de hidrogen sunt incluși în pozițiile geometrice prevăzute, iar factorul lor de temperatură U_H este luat de 1,2 ori mai mare, decât în cazul atomilor de carbon și oxigen legați cu ei. Parametrii principali ai experimentului sunt prezențați în tabelele 1 și 2.

S-a stabilit că compusul coordinativ revendicat posedă o configurație plan-pătratică în care 4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazona 2-benzoilpiridina coordonează la ionul de nichel prin intermediul atomilor de azot piridinic și azometinic și a sulfurii, formând două metalocicluri din cinci atomi. Al patrulea loc coordinativ este ocupat de ionul de clor (vezi structura moleculară a cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)-tiosemicarbazono]nichel, indicată mai sus). Structura cristalină rezultă prin împachetarea lanțurilor supramoleculare de tip 1D (vezi formarea structurii supramoleculare 1D, indicată mai sus) construite prin formarea legăturii de hidrogen intermoleculară N-H...O.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și analizei cu raze X a fost stabilită compoziția și structura compusului revendicat.

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Exemplu de utilizare a cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)-tiosemicarbazono]nichel în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HepG2 ale cancerului hepatic.

Celulele de hepatom uman HepG2 au fost crescute în mediul DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), conținând 100 μmol/L aminoacizi neesențiali, 100 U/mL penicilină, 100 μg/mL streptomicină și 10% ser fetal bovin în atmosferă umidificată (5% CO₂, 37°C). Tipic, 10⁶ celule per un godeu au fost însămânțate pe plăci cu 6 godeuri și cultivate până la o confluență de 70...80%.

Testarea proliferării celulelor.

Viabilitatea celulelor a fost stabilită cu ajutorul testului MTT. Aproximativ 2000 de celule de HepG2 au fost introduse în fiecare godeu al unei plăci cu 96 godeuri. După incubare peste noapte, celulele au fost tratate cu ds ARN timp de 48...72 ore. La momente diferite după tratament, mediul a fost îndepărtat, MTT (20 μl de 5 mg/ml) a fost adăugat în fiecare godeu și incubat la 37°C timp de 4 ore. Plăcile au fost centrifugate, iar precipitatele de formazan, colorate în violet, au fost dizolvate în 150 μL de dimetilsulfoxid. Absorbanța a fost măsurată la 490 nm utilizând cititorul de absorbanță MRX II (Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, SUA). Reducerea viabilității celulelor de HepG2 tratate cu ds Control a fost exprimată în procente față de celulele simulate, care se consideră a fi 100% viabile.

Datele experimentale obținute în urma studiului cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)-tiosemicarbazono]nichel, declarat în calitate de inhibitor al multiplicării celulelor HepG2 ale cancerului hepatic demonstrează că acest compus la concentrația de 10⁻⁵ mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 100%, iar la 10⁻⁶ mol/L – 40,1% de celule HepG2 ale cancerului hepatic. Datele obținute denotă că acest compus, după activitatea cancerostatică, depășește de 1,3...1,4 ori caracteristicile analoage ale doxorubicinei (soluția apropiată) și de 8,2 ori ale celei mai apropiate soluții, tabelul 3.

Proprietățile depistate ale cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]nichel prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai celulelor cancerului hepatic.

Tabelul 1

Date cristalografice și detalii privind experimentul cu raze X pentru cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)-tiosemicarbazono]nichel

Formula moleculară	C ₂₀ H ₁₇ ClN ₄ NiOS
Masa molară, g/mol	455,60
Temperatura, K	200,0
Singonia, grupa spațială, Z	Ortorombic, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a, Å	7,15501(15)
b, Å	15,9430(4)
c, Å	16,8131(4)
α, grad	90,00
β, grad	90,00
γ, grad	90,00
V, Å ³	1917,91(7)
Z	4
ρ _{calc} mg/mm ³	1,578
μ/mm ⁻¹	1,279
Dimensiunea monocristalului, mm	0,15 ? 0,15 ? 0,1
Numărul parametrilor	5306
S	1,041
Final R index [I ≥ 2Σ(I)]	R ₁ = 0,0284, wR ₂ = 0,0626
Final R index	R ₁ = 0,0312, wR ₂ = 0,0640
Programe	SHELX-97

Tabelul 2

Valorile unor distanțe interatomice (d , Å) și ale unghiurilor de valență (Ω , grad °) pentru cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)-tiosemicarbazono]nichel

Legătura	d , Å	Legătura	d , Å
Ni1 - S1	2,1462(8)	C7 - C12	1,396(3)
Ni1 - Cl1	2,1575(8)	C7 - C8	1,401(3)
Ni1 - N1	1,923(2)	C7 - C6	1,471(3)
Ni1 - N2	1,849(2)	N1 - C5	1,366(3)
S1 - C13	1,743(3)	N1 - C1	1,335(3)
O1 - C20	1,424(3)	C5 - C4	1,374(3)
O1 - C18	1,372(3)	C5 - C6	1,483(3)
N4 - C13	1,358(3)	C4 - C3	1,391(3)
N4 - C14	1,409(3)	C2 - C3	1,368(4)
C15 - C14	1,404(3)	C2 - C1	1,389(4)
C15 - C16	1,379(4)	C12 - C11	1,380(4)
C13 - N3	1,321(3)	C19 - C18	1,382(4)
C17 - C18	1,395(4)	C8 - C9	1,379(4)
C17 - C16	1,383(4)	C9 - C10	1,381(4)
N3 - N2	1,374(3)	C10 - C11	1,376(4)
C14 - C19	1,388(4)	C6 - N2	1,316(3)
Unghiul	Ω , grad	Unghiul	Ω , grad
S1 -Ni1 -Cl1	92,82(3)	N1 -C5 -C4	121,7(2)
N1 - Ni1 - S1	170,80(6)	N1 - C5 - C6	113,1(2)
N1 - Ni1 - Cl1	96,28(6)	C4 - C5 - C6	125,1(2)
N2 -Ni1 - S1	86,99(7)	C5 -C4 -C3	118,9(2)
N2 -Ni1 -Cl1	179,52(7)	C3 -C2 -C1	119,3(2)
N2 -Ni1 -N1	83,90(9)	C11 -C12 -C7	120,5(3)
C13 -S1 -Ni1	95,25(8)	C18 -C19 -C14	121,3(2)
C18 -O1 -C20	117,5(2)	C9 -C8 -C7	120,3(2)
C13 -N4 -C14	131,0(2)	O1 -C18 -C17	124,0(2)
C16 -C15 -C14	118,4(3)	O1 -C18 -C19	116,1(2)
N4 -C13 -S1	116,67(18)	C19 -C18 -C17	119,9(2)
N3 -C13 -S1	123,29(19)	C8 -C9 -C10	120,3(3)
N3 -C13 -N4	120,0(2)	C11 -C10 -C9	120,1(3)
C16 -C17 -C18	118,2(2)	C10 -C11 -C12	120,3(3)
C13 -N3 -N2	110,2(2)	C15 -C16 -C17	122,9(2)
C15 -C14 -N4	124,1(2)	C2 -C3 -C4	119,3(2)
C19 -C14 -N4	116,6(2)	C7 -C6 -C5	121,9(2)
C19 -C14 -C15	119,3(2)	N2 -C6 -C7	125,8(2)
C12 -C7 -C8	118,5(2)	N2 -C6 -C5	112,2(2)
C12 -C7 -C6	122,0(2)	N1 -C1 -C2	121,9(3)
C8 -C7 -C6	119,5(2)	N3 -N2 -Ni1	124,24(16)
C5 -N1 -Ni1	112,66(16)	C6 -N2 -Ni1	117,72(18)
C1 -N1 -Ni1	128,54(19)	C6 -N2 -N3	118,0(2)
C1 -N1 -C5	118,7(2)		

5

Tabelul 3

Partea celulelor Hep G2 ale cancerului hepatic inhibitate, %

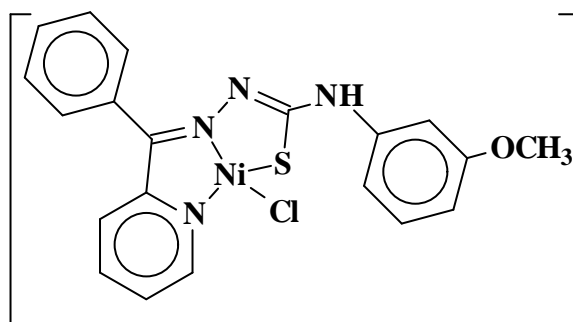
Compusul	Concentrație, mol/L		
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Doxorubicina (soluția apropiată)	76,7	28,6	0
Hidroxo-{{[4-(p-clorofenil)-1-(piridin-2-il)tiosemicarbazido]aquanichel (cea mai apropiată soluție)	100	5	0
Cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)-tiosemicarbazono]nichel (invenția revendicată)	100	40,1	0

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Горбунова В. А. Новые цитостатики в лечении злокачественных опухолей. Медицина, 1998, 128с
2. Mohammad M. Hassani, Wael I. Mortada, Ali M. Hassan, Ahmed A. El-Asmy Synthesis, characterization and biological activities of 4-(p-chlorophenyl)-1-(pyridine-2-yl)thiosemicarbazide and its metal complexes. Journal of the Korean Chemical Society, 2012, vol. 56. Nr. 6. p. 679 - 691

(57) Revendicări:

1. Cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazono]-nichel cu formula :



2. Compus conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** posedă proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor Hep G2 în cancerul hepatic.

Director adjunct Departament:

GROSU Petru

Examinator:

IUSTIN Viorel

Redactor:

LOZOVANU Maria