



MD 4300 C1 2015.03.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4300** (13) **C1**  
(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

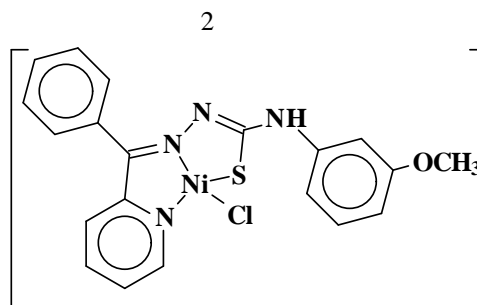
(21) Nr. depozit: a 2012 0128 (22) Data depozit: 2012.12.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.08.31, BOPI nr. 8/2014
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; JALBĂ Angela, MD; ȚAPCOV Victor, MD; ȘOVA Sergiu, MD; POIRIER 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  $10^{-5}$ ... $10^{-6}$  mol/L.

Revendicări: 2

MD 4300 C1 2015.03.31

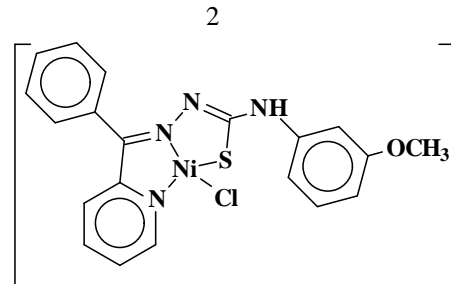
**(54) Inhibitor of HepG2 cell proliferation in liver cancer based on chloro-[2-phenyl(pyridine-2-yl)methanone-4-(3-methoxyphenyl)thiosemicarbazono]nickel**

**(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:



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

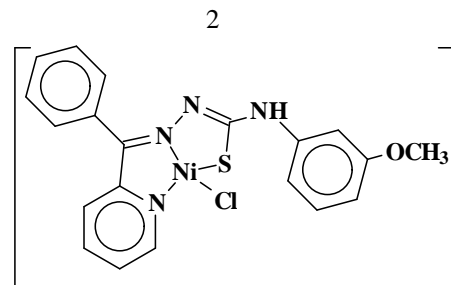
**(54) Ингибитор роста клеток HepG2 при раке печени на основе хлоро-[2-фенил(пиридин-2-ил)метанон-4-(3-метоксифенил)тиосемикарбазо]никеля**

**(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 HepG2 при раке печени предлагают применение нового соединения, хлоро-[2-фенил(пиридин-2-ил)метанон-4-(3-метоксифенил)тиосемикарбазо]никеля формулы:



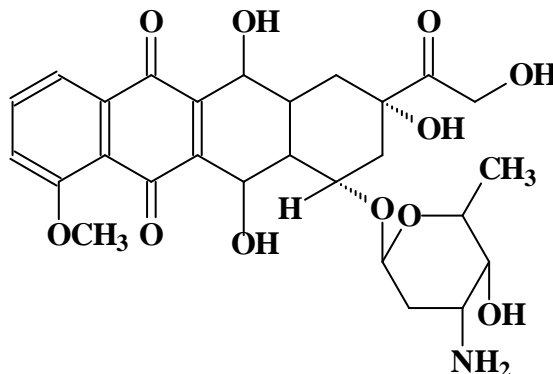
Заявляемое соединение проявляет себя как эффективный ингибитор роста клеток HepG2 при раке печени в концентрациях  $10^{-5} \dots 10^{-6}$  моль/л.

П. формулы: 2

**Descriere:**

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinațivi 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 grupei antracilinelor cu următoarea formulă de structură:

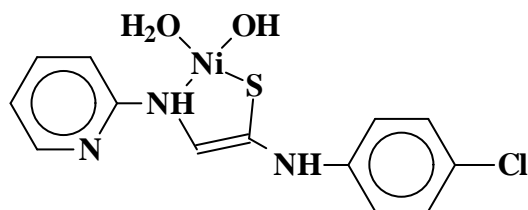


Mecanismul acțiunii doxorubicinei este apropiat de cel al ribomicinei și este bazat pe intercalarea celulelor ADN. Ea se aplică în cazul cancerului glandei mamare, sarcomei țesuturilor moi, sarcomei osteogene, tumorii Young, cancerului pulmonar, limfosarcomei, cancerului ovarian, cancerului pavimentos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

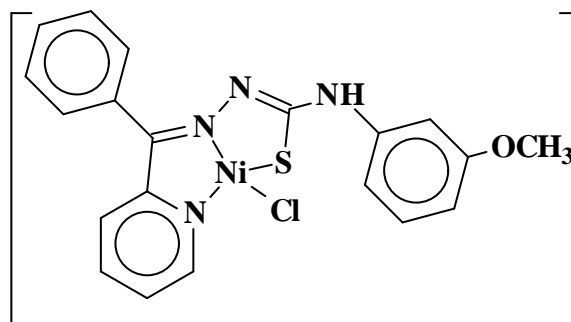
Dintre toți compușii coordinațivi ai nichelului, care inhibă creșterea și multiplicarea celulelor HepG2 ale cancerului hepatic [2], cel mai înalt efect cancerostatic a fost obținut în cazul hidroxo- [4-(p-clorofenil)-1-(piridin-2-il)tiosemicarbazido]aquanichel cu formula structurală:



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.

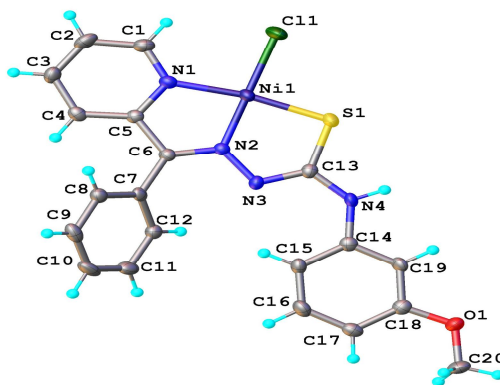
Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor HepG2 ale cancerului hepatic cu activitate citostatică înaltă.

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

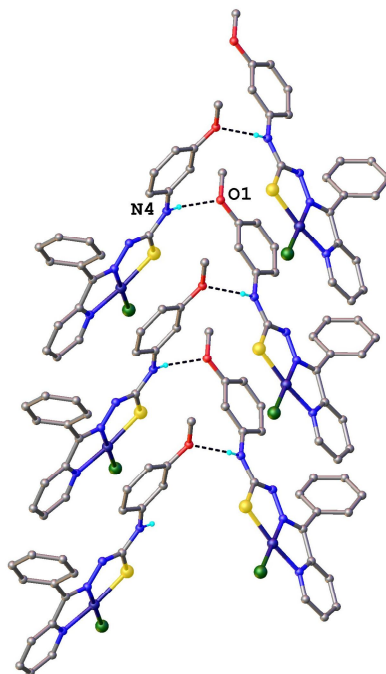


Compusul revendicat se manifestă ca un inhibitor efectiv al proliferării celulelor HepG2 in cancerul hepatic in concentrații de  $10^{-5}$ ... $10^{-6}$  mol/L.

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



10 Formarea structurii supramoleculare 1D are următorul aspect:





S-a stabilit că compusul coordinativ revendicat posedă o configurație plan-pătratică în care 4-(3-metoxifenil)tiosemicarbazona 2-benzoilpiridina coordinează la ionul de nichel prin intermediul atomilor de azot piridinic și azometinic și a sulfului, 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 intermoleculare 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 streptomycină și 10% ser fetal bovin în atmosferă umidificată (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Tipic, 10<sup>6</sup> 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<sup>-5</sup> mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 100%, iar la 10<sup>-6</sup> 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 analoge 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 <sub>20</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> NiOS
Masa molară, g/mol	455,60
Temperatura, K	200,0
Singonia, grupa spațială, Z	Ortorombic, P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
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 <sup>3</sup>	1917,91(7)
Z	4
ρ <sub>calc</sub> , mg/mm <sup>3</sup>	1,578
μ/mm <sup>-1</sup>	1,279
Dimensiunea monocristalului, mm	0,15 ? 0,15 ? 0,1
Numărul parametrilor	5306
S	1,041
Final R index [I ≥ 2Σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0,0284, wR <sub>2</sub> = 0,0626
Final R index	R <sub>1</sub> = 0,0312, wR <sub>2</sub> = 0,0640
Programe	SHELX-97

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

Legătura	$d, \text{Å}$	Legătura	$d, \text{Å}$
Ni1 - S1	2,1462(8)	C7 - C12	1,396(3)
Ni1 - C11	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	$\Omega, \text{grad}$	Unghiul	$\Omega, \text{grad}$
S1 - Ni1 - C11	92,82(3)	N1 - C5 - C4	121,7(2)
N1 - Ni1 - S1	170,80(6)	N1 - C5 - C6	113,1(2)
N1 - Ni1 - C11	96,28(6)	C4 - C5 - C6	125,1(2)
N2 - Ni1 - S1	86,99(7)	C5 - C4 - C3	118,9(2)
N2 - Ni1 - C11	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)		

Partea celulelor Hep G2 ale cancerului hepatic inhibitate, %

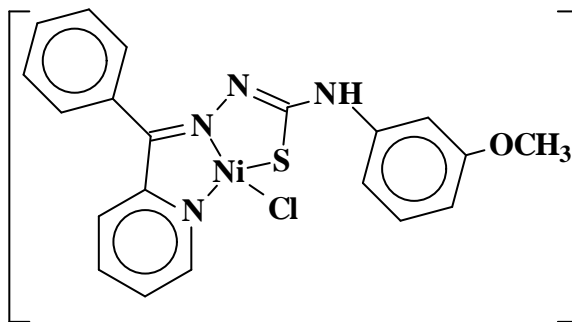
Compusul	Concentrație, mol/L		
	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
Doxorubicina (soluția apropiată)	76,7	28,6	0
Hidroxo-{{4-(p-clorofenil)-1-(piridin-2-il)tiosemicarbazido}aquanichel (cea mai apropiată soluție)	100	5	0
Cloro-[2-fenil(piridin-2-il)metanon-4-(3-metoxifenil)-tiosemicarbazono]nichel (invenția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

**(56) Referințe bibliografice citate in descriere:**

1. Горбунова В. А. Новые цитостатики в лечении злокачественных опухолей. Медицина, 1998, 128с
2. Mohammad M. Hassanien, 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 in cancerul hepatic.

**Director adjunct Departament:**

GROSU Petru

**Examinator:**

IUSTIN Viorel