



MD 4620 B1 2019.02.28

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4620** (13) **B1**  
(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)  
*C07C 337/08* (2006.01)  
*C07D 213/48* (2006.01)  
*C07C 311/38* (2006.01)  
*C07C 311/39* (2006.01)  
*C07C 311/43* (2006.01)  
*A61K 31/30* (2006.01)  
*A61K 31/63* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (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 2018 0027 (22) Data depozit: 2018.04.11	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.02.28, BOPI nr. 2/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ISTRATI Dorin, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GARBUZ Olga, MD; GUDUMAC Valentin, MD; GROPPA Stanislav, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Utilizare a di( $\mu$ -S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-{N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}}cupru in calitate de inhibitor al proliferării celulelor cancerigene

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea unui compus coordinativ biologic activ de cupru, din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție în calitate de inhibitor al proliferării celulelor cancerigene.

Esența invenției constă în utilizarea di( $\mu$ -S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-{N-

2  
[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}}cupru in calitate de inhibitor al proliferării celulelor cancerigene de leucemie mieloidă umană, de cancer de col uterin, de cancer pancreatic și de rabdomiosarcom embrionar.

Revendicări: 2

MD 4620 B1 2019.02.28

**(54) Use of di( $\mu$ -S)-bis{(4-aminobenzenesulfamide)-chloro-{N-[phenyl-2-(pyridine-2-ylmethylidene)hydrazine-1-carbothioamido(1-)]}}copper as a cancer cells proliferation inhibitor**

**(57) Abstract:**

1  
The invention relates to chemistry and medicine, in particular to the use of a biologically active coordinative copper compound from the class of transition metal thiosemicarbazones as a cancer cells proliferation inhibitor.

Summary of the invention consists in the use of di( $\mu$ -S)-bis{(4-

2  
aminobenzenesulfamide)-chloro-{N-[phenyl-2-(pyridine-2-ylmethylidene)hydrazine-1-carbothioamido(1-)]}}copper as a human myeloid leukemia, cervical carcinoma, pancreatic cancer and embryonal rhabdomyosarcoma cancer cells proliferation inhibitor.

Claims: 2

**(54) Использование ди( $\mu$ -S)-бис{(4-аминобензолсульфамид)-хлоро-{N-[фенил-2-(пиридин-2-илметилен)гидразин-1-карботиоамидо(1-)]}}меди в качестве ингибитора пролиферации раковых клеток**

**(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к химии и медицине, а именно к применению биологически активного координационного соединения меди из класса тиосемикарбазонатов переходных металлов в качестве ингибитора пролиферации раковых клеток.

Сущность изобретения состоит в использовании ди( $\mu$ -S)-бис{(4-

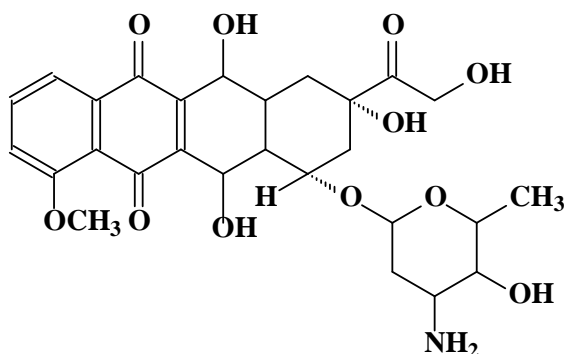
2  
аминобензолсульфамид)-хлоро-{N-[фенил-2-(пиридин-2-илметилен)гидразин-1-карботиоамидо(1-)]}}меди в качестве ингибитора пролиферации раковых клеток миелоидной лейкемии человека, рака шейки матки, рака поджелудочной железы и эмбриональной рабдомиосаркомы.

П. формулы: 2

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

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea compusului coordinațiv biologic activ de cupru din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție în calitate de inhibitor al proliferării unui spectru larg de celule de cancer, care poate găsi aplicare în medicină ca citostatic.

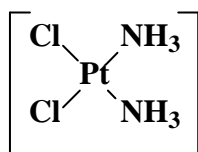
10 În practica medicală pentru profilaxia și tratarea celulelor de cancer pe larg se utilizează doxorubicina (doxorubicinum, DOXO) – unul din antibioticele din grupa antracilinelor, care are următoarea formulă:



15 Mecanismul acțiunii doxorubicinei este bazat pe intercalarea celulelelor ADN. Ea se aplică în cazul cancerului glandei mamare, sarcomei țesuturilor moi, sarcomei osteogene, tumorii lui Young, cancerului pulmonar, limfosarcomei, cancerului ovarului, cancerului pavimentos de diversă localizare, cancerului vezicii urinare, tumorii lui Williams, cancerului glandei tiroide, diverselor leucoze și limfogranulomatozei. DOXO inhibă creșterea și multiplicarea a 80...12% de celule ale acestor tipuri de cancer în diapazonul concentrațiilor 100...0,1 μM [1].

20 Dezavantajul acestui medicament constă în faptul că utilizarea lui totuși este limitată, deoarece el nu posedă o activitate anticancer înaltă față de unele tipuri de celule canceroase, precum și datorită efectelor secundare pe care le cauzează: în procesul tratării cu acest preparat se pot dezvolta cardiomiopatia, dureri în regiunea cardiacă, dereglarea ritmului cardiac, insuficiența cardiacă și hipotensiunea.

25 Dintre compușii coordinațivi, care manifestă activitate anticancer, descriși în literatură, un spectru larg de acțiune citotoxică posedă cis-diclorodiaminplatina cu formula:



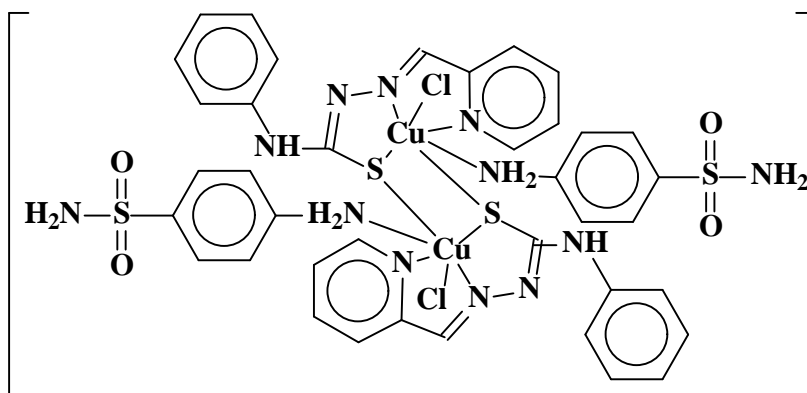
30 Acest citostatic sub forma preparatului cisplatină este larg folosit în practica medicală. Mecanismul lui de acțiune constă în blocarea funcțiilor ADN-ului, legate de formarea legăturilor coordinațive între atomul de platină și două baze guaninice ale ADN-ului. Ca rezultat, în ADN se formează legături intra- și intercatenare, care duc la dereglarea replicării și transcripției, întârzierea diviziunii celulare și inducerea apoptozei [2].

35 Dezavantajul compusului menționat constă în faptul că el pătrunde greu în celule și prin transformări nefermentative rapid se metabolizează în metaboliți neactivi. Legarea acestui compus de proteine constituie de obicei, nu mai mult de 90% și induce reacții adverse: greață, vomă, stomatită, trampe musculare, neuropatie, tahicardie și hipotensiune arterială.

Compușii coordinațivi ai biometalelor cu liganzii organici din clasa tioamidelor sau derivațiilor lor, care manifestă activitate anticancer, de obicei nu inhibă proliferarea unui spectru larg de celule de cancer, manifestând activitate selectivă citostatică numai față de una sau două tipuri de celule de cancer (analogul structural lipsește).

40 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării unui spectru larg de celule de cancer cu activitate citostatică înaltă.

Esența invenției constă în utilizarea di(μ-S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-[N-fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}cupru cu formula:



5 în calitate de inhibitor al proliferării celulelor cancerigene de leucemie mieloidă umană, de cancer de col uterin, de cancer pancreatic și de rabdomiosarcom embrionar.

Compusul coordinativ dat, procedeul lui de sinteză, structura și proprietățile fizico-chimice sunt descrise în literatură (MD 4179 B1 2012.07.31). A fost stabilit, că el manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din specia *Bacillus cereus*, dar din cauza activității joase până acum nu a găsit aplicare în medicină.

10 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul dat a activității anticancer, care depășește de 6,9...1,1 ori activitatea Doxorubicinei și de 42,2...1,1 ori caracteristicile analoge ale cis-diclorodiamminplatinei (cisplatina).

Exemplu al utilizării di( $\mu$ -S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-{N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}}cupru in calitate de inhibitor de proliferare al celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloidă. Celulele leucemiei umane mieloidă HL-60 obținute din Colecția Culturilor Tip American (American Type Culture Collection, Rockville, MD) au fost cultivate în formă de suspensie în mediul RPMI-1640 suplimentat cu 10% (V/V) ser embrionic de Sovine, 2 mM de L-glutamină, 100 IU penicilină/ml și 100  $\mu$ g de streptomycină/ml și incubate în atmosferă umedă de 95% aer / 5% CO<sub>2</sub> la 37°C. Celulele au fost amestecate de 2-3 ori pe parcursul săptămânii, pentru a le păstra în fază omogenă. După aceasta celulele au fost plasate în vase Falcon din plastic pentru culturi cu 24 de compartimente (2 cm<sup>2</sup>/celulă) la densitatea inițială de 1 · 10<sup>5</sup> celule/ml/compartiment și tratate cu soluții de diferită concentrație al compusului declarat în apă sterilă. Fiecare procedură de tratare cu aceeași concentrație a fost efectuată în câte trei repetări.

25 Exemplu al utilizării di( $\mu$ -S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-{N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotio-amido(1-)]}}cupru in calitate de inhibitor de proliferare a celulelor HeLa – ale cancerului de col uterin, B<sub>x</sub>PC-3 – ale cancerului pancreatic, RD – ale rabdomiosarcom embrionar. Celulele au fost cultivate ca monostrat in mediu nutritiv DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) și RPMI -1640 cu un conținut înalt de glucoză, L-glutamină, soluție tampon HEPES (acid N-2 hidroxietilpiperazin-N'-2-etan sulfonic), penicilină, streptomycină, FBS (fetal bovine serum). Celulele au fost crescute in două flacoane T-75 și au fost incubate în termostat ce conține 2% CO<sub>2</sub>, 78% aer și temperatura de 37°C. Mediul nutritiv se schimbă la fiecare 4-3 zile.

35 Proliferarea celulelor cu resazurină: Resazurina este un colorant indicator non-fluorescent, este transformat în rezorufină fluorescentă foarte roșie prin reacțiile de reducere a celulelor metabolice active. Cantitatea de fluorescență produsă este proporțională cu numărul de celule vii. Resazurina a fost dizolvată în soluție tampon fiziologică (rezultând o soluție albastru închisă) și adăugată omogen la celule. În prezența reducătorilor NADPH dehidrogenaza sau NADH dehidrogenaza ca enzime, resazurina este redusă până la resorufin.

40 Celulele au fost tripsinizate prin adăugarea a 3 ml de acid tripsin-etilendiamintetraacetic (tripsin-EDTA) în flacoane de 50 ml și incubate timp de 5 minute la temperatura de 37°C, cu o agitare permanentă și vizualizare la microscop (OLYMPUS) pentru a vedea dacă celulele sunt aranjate într-un monostrat. Reacția de tripsinizare poate fi stopată prin adăugarea a 10 ml de mediu nutritiv ce conține 10% FBS. Celulele trebuie să fie distribuite într-o concentrație de 1x10<sup>5</sup> celule/ml. Suspensia de celule rezultată a fost duplicată în placi de microtitrare cu 96 celulele într-o cantitate de 90  $\mu$ L și au fost incubate în termostat la o

temperatura de 37°C și 2% CO<sub>2</sub>. După 4 ore de incubare, la celule se adaugă 10 μL de compus coordinativ, care a fost dizolvat în prealabil în DMSO. Plăcile cu substanțe și celule se incubează în termostat la temperatura de 37°C și 2% CO<sub>2</sub>.

5 Asupra celulelor s-a acționat cu diverse concentrații (100, 10, 1, 0,1 μmol/L) ale compusului coordinativ revendicat. După 24 de ore în fiecare celulă a plășetei de microtitrare se adaugă 20 μL de resazurin și se incubează 4 ore la temperatura de 37°C. Dacă compusul posedă proprietăți anticancer are loc distrugerea celulelor de cancer.

Se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 570 nm și 600 nm cu aparatul Synergy H1, BioTek). Partea de celule inhibitate este calculată prin intermediul formulei:

$$100 - ((\text{Abs } 570\text{nm}_{\text{sample}} - \text{Abs } 600\text{nm}_{\text{sample}}) / (\text{Abs } 570\text{nm}_{\text{control}} - \text{Abs } 600\text{nm}_{\text{control}})) \cdot 100$$

De asemenea, se calculează partea semimaximală de inhibare IC<sub>50</sub> pentru fiecare probă.

10 Datele experimentale obținute privind studiul proprietăților citostatice ale di(μ-S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-{n-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}}cupru sunt prezentate în Tabel, din care se observă, că în diapazonul concentrațiilor 10<sup>-5</sup> - 10<sup>-7</sup> mol/L compusul revendicat manifestă activitatea anticancer față de un spectru larg de celule de cancer și după caracteristicile citostatice depășește de 6,9-1,1 ori activitatea *Doxorubicinei* și de 42,2-1,1 ori caracteristicile analoage ale cis-diclorodiamminplatinei.

20 Proprietățile depistate ale di(μ-S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-{N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}}cupru prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai proliferării unui spectru larg de celule de cancer.

25 Caracteristicile citostatice ale compusului declarat în comparație cu DOXO și cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (cisplatin)

Compusul	IC <sub>50</sub> pentru linii celulare			
	HL-60	HeLa	B <sub>x</sub> PC-3	RD
DOXO	1,0±0,2	6,2±1,0	6,0±0,8	2,3±0,9
cis-[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] ("cisplatin")	25±1,0	38,0±1,0	11,2±1,2	1,4±0,97
Di(μ-S)-bis{(4-amino-benzensulfamid)-clo-ro-{N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazin-1-carbotio-amido(1-)]}}cupru	0,9±0,3	0,9±0,4	1,7±0,5	1,3±0,3

\*Notă : linii celulare: HL-60 – cancerul leucemiei mieloide umane, HeLa – cancer de col uterin, B<sub>x</sub>PC-3 – cancerul pancreatic, RD –rabdomyosarcom embrionar.

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

1. Lee R.J., Low P.S. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochimica et Biophysica acta*, Vol. 1233, Nr 2, 1995, p. 134-144
2. Coluccia M., Natile G. Trans-platinum complexes in cancer therapy. *Anti-cancer agents in Medicinal Chemistry*, Nr. 7, 2007, p. 111-123

**(57) Revendicări:**

1. Utilizare a di( $\mu$ -S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-{N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}}cupru în calitate de inhibitor al proliferării celulelor cancerigene.
2. Utilizare, conform revendicării1, în care celulele cancerigene sunt celulele HL-60 ale leucemiei mieloide umane, HeLa ale cancerului de col uterin, B<sub>x</sub>PC-3 ale cancerului pancreatic și RD ale rābdomiosarcomului embrionar.