



MD 4778 B1 2021.12.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4778** (13) **B1**
(51) Int.Cl: C07C 337/08 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07D 213/53 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

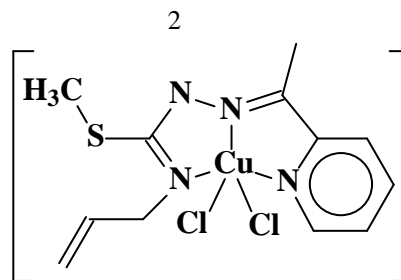
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2020 0088 (22) Data depozit: 2020.12.17	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.12.31, BOPI nr. 12/2021
(71) Solicitanți: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; IP UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; GRAUR Vasilii, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GARBUZ Olga, MD; ANDRONACHE Lilia, MD; CEBAN Emil, MD; GUDUMAC Valentin, MD	
(73) Titulari: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; IP UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Compusul dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotoat-*N,N,N*}cupru, care inhibă proliferarea celulelor rabdomiosarcomului uman

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ biologic activ din clasa *S*-alchilizotiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, și poate găsi aplicare în medicină la tratarea și profilaxia rabdomiosarcomului uman.

Conform invenției, se propune compusul dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotoat-*N,N,N*}cupru cu formula:



care inhibă proliferarea celulelor rabdomiosarcomului uman.

Rezultatul invenției constă în sinteza compusului coordinativ de cupru, care inhibă proliferarea celulelor rabdomiosarcomului uman de 7,3 ori mai activ decât analogul structural.

Revendicări: 2

Figuri: 1

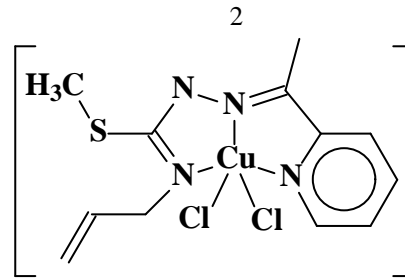
MD 4778 B1 2021.12.31

(54) Dichloro{methyl-*N*-(prop-2-en-1-yl)-2-[1-(pyridin-2-yl)ethylidene]hydrazinecarbimidothioate-*N,N,N*}copper compound, inhibiting the proliferation of human rhabdomyosarcoma cells

(57) Abstract:

The invention relates to chemistry and medicine, namely to a biologically active coordination compound from the class of transition metal S-alkylisothiosemicarbazones, and can find application in medicine in the treatment and prevention of human rhabdomyosarcoma.

According to the invention, proposed is dichloro{methyl-*N*-(prop-2-en-1-yl)-2-[1-(pyridin-2-yl)ethylidene]hydrazinecarbimidothioate-*N,N,N*}copper compound of the formula:



inhibiting the proliferation of human rhabdomyosarcoma cells.

The result of the invention consists in the synthesis of the copper coordination compound, inhibiting the proliferation of human rhabdomyosarcoma cells 7.3 times more actively than the structural analogue.

Claims: 2

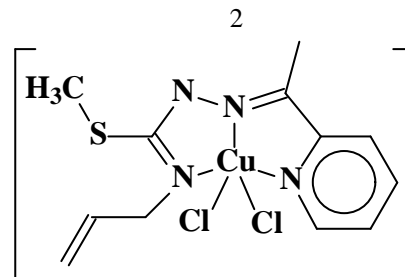
Fig.: 1

(54) Соединение дихлоро{метил-*N*-(проп-2-ен-1-ил)-2-[1-(пиридин-2-ил)этилиден]гидразинкарбимидотиоат-*N,N,N*}меди, ингибирующее пролиферацию клеток рабдомиосаркомы человека

(57) Реферат:

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активному координационному соединению класса S-алкилизотиосемикарбазонатов переходных металлов, и может найти применение в медицине при лечении и профилактике рабдомиосаркомы человека.

Согласно изобретению, предлагается соединение дихлоро{метил-*N*-(проп-2-ен-1-ил)-2-[1-(пиридин-2-ил)этилиден]гидразинкарбимидотиоат-*N,N,N*}меди формулы:



ингибирующее пролиферацию клеток рабдомиосаркомы человека.

Результат изобретения заключается в синтезе координационного соединения меди, которое ингибирует пролиферацию клеток рабдомиосаркомы человека в 7,3 раза более активно, чем структурный аналог.

П. формулы: 2

Фиг.: 1

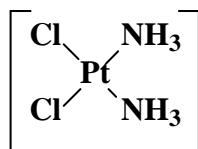
Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ biologic activ din clasa S-alchilizotiosemicarbazonaților metalelor de tranziție și poate găsi aplicare în medicină la tratarea și profilaxia rhabdomyosarcomului uman.

Rhabdomyosarcoamele umane sunt tumori maligne ale țesuturilor moi, în special țesutul muscular scheletic și care pot afecta rinichii, vezica urinară și aparatul genito-urinar la sugari, copii și maturi (Protocol clinic național „Cancerul renal”, aprobat prin ordinul Ministerului Sănătății al Republicii Moldova nr.1057 din 30.09.2013, Chișinău, 2013; ALAA SAMKARI, HANEEN AL-MAGHRABI. Rhabdomyosarcoma of the kidney. Journal of Pediatric Surgery Case Reports, v. 32, 2018, p. 62-67; RINI B.I., RATHMELL W.K., GODLEY P. Renal cell carcinoma. Curr. Opin. Oncol., 2008, v. 20(3), p. 300-306; LESLIE S.W., SAJJAD H., MURPHY P.B. Wilms Tumor. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan., URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442004/>; PRIYADARSHI V., GOGOI D., BERA M.K., PAL D.K. Rhabdomyosarcoma of urinary bladder. APSP J Case Rep., 2014, v.5(2), p. 24).

În tratamentul acestor tumori un rol important se acordă chimioterapiei sistemice, care include cel mai des vincristină, doxorubicină, ciclofosfamidă, carboplatină și al. (OOSTVEEN R.M., PRITCHARD-JONES K. Pharmacotherapeutic Management of Wilms Tumor: An Update. Paediatr. Drugs., 2019, v. 21(1), p.1-13; MULDER P.F., BROUWERS A.H., HULSBERGEN-VAN DER KAA CA, et al. Guideline Renal cell carcinoma, 2008, v. 152(7), p. 376-380; CASTAGNETTI M., HERBST K.W., ESPOSITO C. Current treatment of pediatric bladder and prostate rhabdomyosarcoma (bladder preserving vs. radical cystectomy). Curr. Opin. Urol., 2019, v. 29(5), p. 487-492).

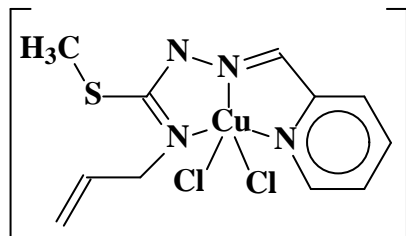
25 Printre medicamentele, utilizate pentru tratarea rhabdomyosarcomelor umane se află și preparatul cisplatin - compus coordinativ *cis*-diclorodiamminplatina [1] cu formula:



Mecanismul de acțiune al acestui citostatic este legat de formarea legăturilor coordinative între atomul de platină și două baze guaninice ale ADN-ului și blocarea funcțiilor lui. Ca rezultat, în ADN se formează legături intra- și intercatenare, care duc la dereglarea replicării și transcripției, întârzierea diviziunii celulare și inducerea apoptozei.

Dezavantajul medicamentului cisplatin 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, crampe musculare, neuropatie, tahicardie și hipotensiune arterială.

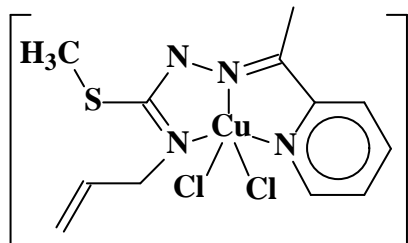
Din compușii coordinativi din clasa S-alchilizotiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, care inhibă proliferarea celulelor rhabdomyosarcomului uman, descriși în literatură, cel mai înalt efect cancerostatic a fost obținut în cazul complexului clorurii de cupru(II) cu metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbimidioat (4-alilizotiosemicarbazona 2-formilpiridinei) (analogul structural) [2] cu formula:



După activitatea citostatică acest compus este de 1,2 ori mai efectiv decât cisplatin, utilizat în medicină în calitate de inhibitor al celulelor rhabdomyosarcomului uman, dar nu a găsit o aplicare în medicină.

45 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai celulelor rhabdomyosarcomului uman cu activitate citostatică înaltă.

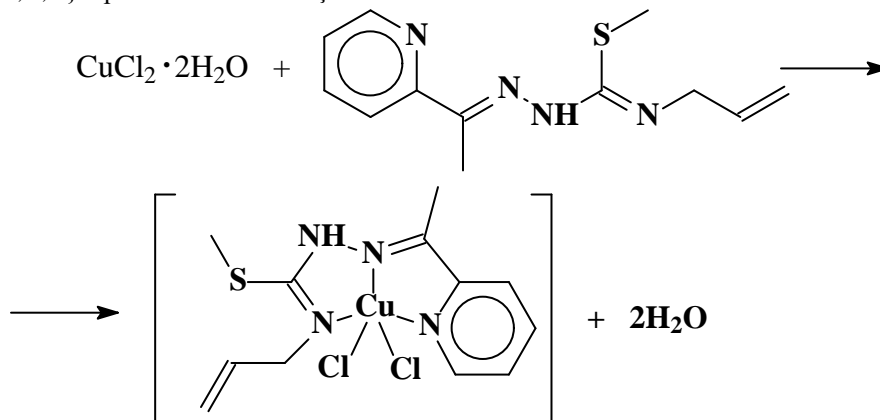
Esența invenției constă în aceea, că în calitate de inhibitor al celulelor rabdomiosarcomului uman se propune dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat-*N,N,N*}cupru cu formula:



- 5 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anticancerigene, care posedă concentrația de inhibare semimaximală $IC_{50} = 0,16 \mu\text{mol/L}$ și este de 8,8 ori mai efectiv decât cisplatin și de 7,3 ori mai activ decât analogul structural. Proprietatea stabilită a dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat-*N,N,N*}cupru este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al creșterii și multiplicării celulelor rabdomiosarcomului uman.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul, că pentru prima dată în calitate de inhibitor al proliferării celulelor rabdomiosarcomului uman se propune dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]-hidrazincarbimidotioat-*N,N,N*}cupru, care conține o combinație nouă de legături chimice cunoscute.

- 15 Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură. Dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat-*N,N,N*}cupru revendicat se obține conform următoarei scheme:



- 20 Mecanismul reacției date este legat de faptul, că în timpul sintezei în amestecul reactant are loc adăția la ionul de cupru(II) a unei molecule de metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioatului (4-alil-*S*-metilizotiosemicarbazonei 2-acetilpiridinei), care joacă rolul de ligand *N,N,N* tridentat și doi ioni de clor. În rezultatul acestui proces are loc formarea complexului, în care atomul central are numărul de coordinare 5.

- 25 Procedeul de obținere a compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 85% față de cel teoretic calculat. Metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat (4-alil-*S*-metilizotiosemicarbazona 2-formilpiridinei) se obține în mod similar cu 4-alil-*S*-metilizotiosemicarbazona 2-formilpiridinei [2], înlocuind 2-formilpiridina cu 2-acetilpiridina [Randamentul: 86%; p.t.: 65-66°C; M = 248,35 g/mol; Calculat, %: C - 58,04; H - 6,49; N - 22,56; S - 12,91. Determinat, %: C - 58,16; H - 6,54; N - 22,65; S - 13,03. IR (cm⁻¹): ν(NH) 3257, ν(C=C alil) 1644, ν(C=N^I) 1597, ν(C=N_{pir}) 1582, ν(CH₃-S) 1098, ν(C-S) 637. ¹H RMN (CDCl₃; δ, ppm): 8,63 (d, 1H, CH aromatic); 8,09 (d, 1H, CH aromatic); 7,69 (t, 1H, CH aromatic); 7,26 (t, 1H, CH aromatic); 6,61 (br, 1H, NH); 5,93 (m, 1H, CH alil); 5,26 (dd, 2H, CH₂=C); 3,96 (t, 2H, CH₂-N); 2,57 (s, 3H, CH₃); 2,55 (s, 3H, CH₃-S). ¹³C RMN (CDCl₃; δ, ppm): 161,34 (C-S); 157,12, 147,13, 135,82, 123,26, 120,80 (C aromatic); 148,42 (C=N); 13,64 (CH alil); 116,41 (CH₂=); 45,71 (CH₂-N); 13,23 (CH₃); 12,89 (CH₃-S)]. Complexul sintetizat are culoare verde, este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă, solubil în alcooli alifatici, dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubil în eter.

Exemplu de obținere a dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat-*N,N,N*}cupru.

Se amestecă 25 mL de soluție etanolică, care conține 0,248 g (1 mmol) de 4-alil-*S*-metilizotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei cu 0,170 g (1 mmol) de dihidrat al clorurii de cupru(II) (CuCl₂·2H₂O). Amestecul reactant este încălzit (50-55°C) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 50-60 min. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare verde, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu etanol rece și uscate în vid.

S-a determinat, %: C - 37,58; H - 4,25; Cl - 18,46; Cu - 16,67; N - 14,70; S - 8,48. Pentru C₁₂H₁₆Cl₂CuN₄S s-a calculat, %: C - 37,65; H - 4,21; Cl - 18,52; Cu - 16,60; N - 14,64; S - 8,38.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm⁻¹: ν(NH) 3073, ν(C=C alil) 1639, ν(C=N¹) 1570, ν(C=N_{pir}) 1554, ν(CH₃-S) 1093, ν(C-S) 634, μ_{ef} (292K) = 1,81 MB; χ (CH₃OH) = 184 Ω⁻¹·cm²·mol⁻¹.

La recristalizarea complexului din soluția etanolică au fost obținute monocristale de dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat-*N,N,N*}cupru, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X. Măsurătorile cristalografice au fost efectuate utilizând un difractometru de tip Xcalibur E CCD Oxford-Diffraction cu monocromator de grafit înzestrat cu sursă de raze X de tip Mo-*K*_α. Procedeele de determinare a parametrilor celei elementare și de integrare a datelor experimentale au fost efectuate cu ajutorul setului de programe "CrysAlis package Oxford Diffraction". Pentru structura cercetată soluția a fost determinată prin metoda directă cu ajutorul programului SHELXS-97 și fitată prin metoda patratelor minimale în cadrul programului SHELXL-97 în varianta anizotropică pentru toți atomii cu masă molară mai mare decât a atomului de hidrogen. Atomii de hidrogen au fost introduși în poziții idealizate (d_{CH} = 0,96 Å), utilizând modelul pivot cu fixarea parametrilor izotropici de deplasare la valoarea de 120% față de valorile respective ale atomilor de carbon cu care sunt legați. Formula empirică a compusului investigat C₁₂H₁₆Cl₂CuN₄S, grupa spațială P 2₁/c, parametrii celei elementare, [A]: a = 10,4488(3); b = 11,1148(3), c = 13,9677(5); α = 90,0°, β = 104,551(3)°, γ = 90,0°.

A fost stabilit (Fig.), că compusul investigat reprezintă un monomer coordinativ, în care poliedrul de coordinare al generatorului de complex reprezintă o piramidă tetragonală distorsionată. În sfera internă a atomului central se află o moleculă de 4-alil-*S*-metilizotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei tridentată, care coordonează la atomul de cupru prin atomii de azot piridinic [d(Cu-N) = 2,037 Å], azometinic [d(Cu-N) = 1,981 Å] și tiocarbamidic N⁴ [d(Cu-N⁴) = 2,020 Å], formând două metalocicluri din cinci atomi. Legătura dublă în molecula de izotiosemicarbazonă coordinată este localizată între atomii de carbon și azot N⁴ [d(C - N²) = 1,374 Å, iar d(C - N⁴) = 1,277 Å]. Al patrulea și al cincilea locuri în sfera internă a atomului de cupru îl ocupă ionii de clorură [d(Cu - Cl¹) = 2,501 Å și d(Cu - Cl²) = 2,247 Å]. Alte distanțe interatomice și unghiuri de valență sunt standarde pentru compușii din această clasă.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor, cercetărilor fizico-chimice și a analizei cu raze X a fost stabilită compoziția și structura compusului declarat.

Exemplu al utilizării dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat-*N,N,N*}cupru în calitate de inhibitor de proliferare al celulelor rbdomiosarcomului uman.

Celulele au fost cultivate în monostrat în 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 în două flacoane T-75 la temperatura de 37°C în termostat ce conținea 2% CO₂ și 78% aer. Mediul nutritiv se schimbă la fiecare 4-3 zile.

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților anticanceroase ale dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimido-tioat-*N,N,N*}cupru sunt prezentate în tabel, din care se observă, că el posedă concentrația de inhibare semimaximală IC₅₀ = 0,16 μmol/L și este de 8,8 ori mai efektiv decât cisplatin, utilizat în medicină și de 7,3 ori mai activ decât analogul structural.

Proprietățile depistate ale dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat-*N,N,N*}cupru prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai celulelor rbdomiosarcomului uman.

Concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$) a celulelor rabdomiosarcomului uman de către compusul revendicat în comparație cu prototipul și analogul structural

Compusul	IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$
Cisplatin	1,4
Analogul structural	1,16
Dicloro{metil- <i>N</i> -(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazin-carbimidotioat- <i>N,N,N</i> }cupru	0,16

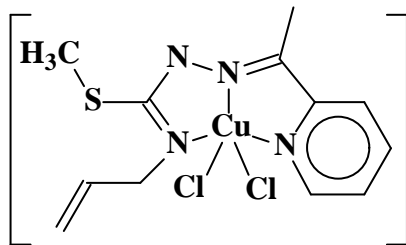
5

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Цисплатин. Машковский М. Д. Лекарственные средства. Москва: Новая волна, 2008, p. 989 - 990
2. Balan G., Burduniuc O., Usataia I., Graur V., Chumakov Yu., Petrenko P., Gudumac V., Gulea, A., Pahontu E. Novel 2-formylpyridine 4-allyl-S-methylisothiosemicarbazone and Zn(II), Cu(II), Ni(II) and Co(III) complexes: Synthesis, characterization, crystal structure, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity. Applied Organometallic Chemistry, 2019, v. 34, nr. 3, p.e 5423

(57) Revendicări:

1. Compusul dicloro{metil-*N*-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimido-tioat-*N,N,N*}cupru cu formula:



2. Compusul, conform revendicării 1, care inhibă proliferarea celulelor rabdomiosarcomului uman.

