



MD 3996 B1 2009.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 3996 (13) B1

(51) Int. Cl.: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07C 47/55 (2006.01)
C07C 47/56 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/055 (2006.01)
A61K 31/06 (2006.01)
A61K 31/11 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

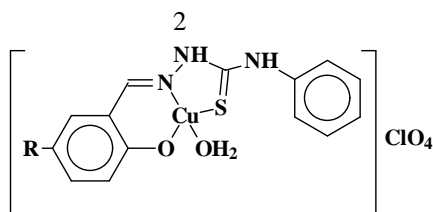
Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2009 0055 (22) Data depozit: 2009.05.25	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.12.31, BOPI nr. 12/2009
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; POIRIER Donald, CA; PAHONȚU Elena, RO (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Perclorați de 5-R-saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)-aquacupru(II) ce posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD (tipul 1)

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, care își pot găsi aplicare în medicină pentru profilaxia și tratarea cancerului prostatei.

Esența invenției constă în sinteza percloratului de 5-R-saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)-aquacupru(II) cu formula generală :

unde R = Br, NO₂

Compușii coordinativi posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD (tipul 1), stimulator al proliferării celulelor cancerului prostatei.

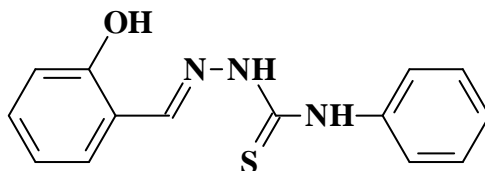
Revendicări: 2

MD 3996 B1 2009.12.31

Descriere:

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, care își pot găsi aplicare în medicină pentru profilaxia și tratarea cancerului prostatei.

- 5 Ultimul pas în formarea tuturor androgenilor și estrogenilor, premergător începutului cancerului prostatei, este favorizat de către 17 β -hidroxisteroidul dehidrogenazei (17 β -HSD), care face parte din categoria enzimelor-cheie steroidogenice. Din substanțele chimice descrise în literatură, care inhibă activitatea enzimei 17 β -HSD Tipul 1, care stimulează procesul de proliferare a celulelor cancerului prostatei, cel mai înalt efect a fost obținut în cazul 4-feniltiosemicarbazonei aldehidei salicilice, cu următoarea formulă:



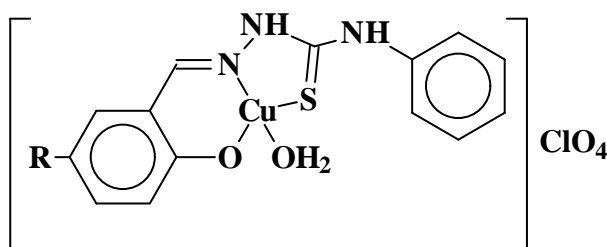
10

După activitatea antitumorală acest compus depășește de 1,3...1,8 ori caracteristicile citostatice ale estronului, care se aplică în medicină pentru profilaxia și tratarea cancerului prostatei [1].

- 15 Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că 4-feniltiosemicarbazona aldehidei salicilice nu posedă activitate antitumorală suficient de înaltă, inhibând la concentrația de 10⁻⁵ M proliferarea a 98%, la 10⁻⁶ M – numai 78%, iar la 10⁻⁷ M – numai 33% din celulele cancerului prostatei și până acum nu a fost aplicată în medicină.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este extinderea arsenalului de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD Tipul 1, care stimulează proliferarea celulelor cancerului prostatei cu activitate biologică înaltă.

- 20 Esența invenției constă în sinteza percloratului de 5-R-saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1)-aqua cupru(II) cu formula generală:



unde R = Br, NO₂

- 25 Compușii coordinativi posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD (tipul 1), stimulator al proliferării celulelor cancerului prostatei.

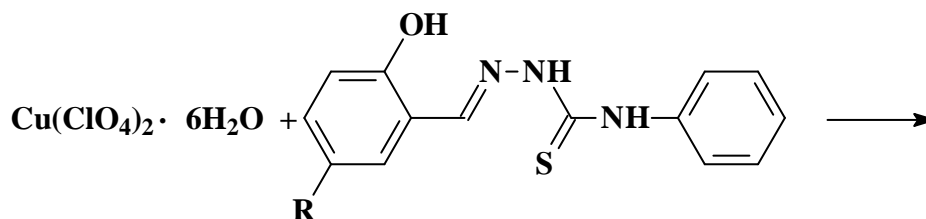
Compușii revendicați, proprietățile lor și procedeul de obținere nu sunt descrise în literatură.

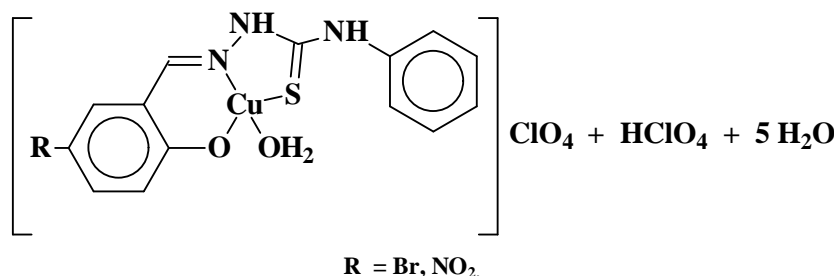
Rezultatul invenției constă în stabilirea la compușii revendicați a activității anticancerigene, care depășește de 1,1...1,6 ori caracteristicile canceristatice ale 4-feniltiosemicarbazonei aldehidei salicilice.

- 30 Rezultatul invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD Tipul 1, care stimulează proliferarea celulelor cancerului prostatei, se propun compușii coordinativi ai percloratului de cupru(2+) cu 4-feniltiosemicarbazonele aldehydelor salicilice substituite, care conțin o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Compușii revendicați se obțin la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50...55°C) a Cu(ClO₄)₂·6H₂O cu 4-feniltiosemicarbazonele aldehydelor 5-bromo- sau 5-nitrosalicilice, luate în raport molar de 1 : 1. Reacția decurge în 45...50 min conform următoarei scheme:

35





Mecanismul prezentei reacții este următorul: în timpul sintezei în amestecul reactant are loc coordinarea la ionul de cupru(2+) a unei molecule de 4-feniltiosemicarbazona a aldehidei salicilice substituite, care joacă rolul de ligand-O,N,S tridentat monodeprotonizat. Al patrulea loc coordinați în sfera internă a atomului central în particula complexă formată este ocupat de o moleculă de apă. În rezultatul acestor procese are loc formarea cationului complex 5-bromo- sau 5-nitrosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonatoaquacupru(2+), sarcina pozitivă a căruia este compensată de sarcina negativă a perclorat-ionului din sfera exterioară.

Exemplu de obținere a percloratului de 5-bromosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)aquacupru(II)
Compusul I

Se amestecă 30 mL de soluție etanolică, care conține 10 mmol de 4-feniltiosemicarbazona a aldehidei 5-bromosalicilice cu 10 mmol de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dizolvat în 20 ml de alcool. Amestecul reactant este încălzit (50...55° C) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 45...50 min. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare verde, care sunt filtrate printr-un filtru de sticlă, spălate cu etanol, eter și uscate la aer. Compoziția substanței a fost stabilită în baza rezultatelor analizei elementelor.

Pentru compusul $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{BrClCuN}_3\text{O}_6\text{S}$

Determinat, % : C - 31,48; H - 2,29; Br - 14,84; Cl - 6,40; Cu - 11,75; N - 7,71; S - 6,84.

Calculat, % : C - 31,71; H - 2,47; Br - 15,07; Cl - 6,69; Cu - 11,98; N - 7,92; S - 6,95.

După o metodă analogică, folosind în calitate de substanțe inițiale hexahidrat al percloratului de cupru(2+) și 4-feniltiosemicarbazona aldehidei 5-nitrosalicilice, luate în raportul molar de 1:1, se sintetizează compusul II. Compoziția complexului dat a fost stabilită în baza rezultatelor analizei elementelor.

Pentru compusul $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClCuN}_4\text{O}_8\text{S}$

Determinat, % : C - 33,61; H - 2,49; Cl - 6,89; Cu - 12,57; N - 11,00; S - 6,21.

Calculat, % : C - 33,88; H - 2,64; Cl - 7,14; Cu - 12,80; N - 11,29; S - 6,46.

Procedul de obținere a compușilor revendicați este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 67% (I) și 61% (II) față de cel teoretic calculat. Complecșii sunt stabili în contact cu aerul, solubili în apă și alcooli, bine solubili în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubili în eter.

Cercetarea vizuală sub microscop a compușilor coordinați I și II demonstrează că ei posedă omogenitate fazică. Din cauza dimensiunilor mici și absenței monocristalelor acestor complecși, pentru determinarea individualității compoziției și structurii lor au fost utilizate următoarele metode de analiză a elementelor: spectroscopia IR, magnetochimia și termogravimetria.

În baza determinării conductibilității electrice molare ale compușilor I și II în dimetilformamidă s-a stabilit că ei sunt electroliți binari [$\kappa = 67$ (I) și 74 (II) $\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 20° C, $C_M = 0,001$ mol/L].

Cercetarea magnetochimică la temperatura camerei (294 K) a compușilor revendicați a demonstrat că valorile obținute ale momentelor lor magnetice efective sunt apropiate de valoarea de spin pentru un electron necuplat [μ_{ef} (I) = 1,84; μ_{ef} (II) = 2,01 m, B]. Faptul acesta ne permite să presupunem, că substanțele cercetate au structură monomerică.

În scopul determinării modului de coordinare a azometinelor la ionul de cupru(2+), a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale compușilor I și II, tiosemicarbazonatelor aldehidelor salicilice substituite și ale analogilor lor structurali descriși. S-a stabilit că tiosemicarbazonatele aldehidelor 5-bromo- și 5-nitrosalicilice în compușii revendicați se comportă ca liganzii tridentați monodeprotonați, coordonând la ionii centrali prin intermediul atomului de oxigen fenolic deprotonizat, azotului azometinic și sulfurii, formând metalocicluri din cinci și șase atomi. În favoarea acestui fapt vorbește dispariția din spectrele IR ale substanțelor revendicate și ale analogilor structurali a benzii de absorbție $\delta(\text{OH})$, care în tiosemicarbazonatele libere se observă în domeniul $1250 \dots 1240 \text{ cm}^{-1}$. În compușii I și II și analogii lor structurali banda de absorbție $\nu(\text{C}=\text{N})$ se deplasează cu $25 \dots 15 \text{ cm}^{-1}$ spre frecvențe mai mici [în 4-feniltiosemicarbazonatele inițiale $\nu(\text{C}=\text{N})$ se observă în domeniul $1620 \dots 1610 \text{ cm}^{-1}$]. În favoarea modului numit de coordinare a 4-feniltiosemicarbazonelor aldehidelor salicilice substituite vorbește și faptul apariției în domeniul $530 \dots 405 \text{ cm}^{-1}$ a unui șir de benzi de absorbție noi, care conform datelor luate din literatură se detectează ca $\nu(\text{Cu}-\text{N})$, $\nu(\text{Cu}-\text{O})$ și $\nu(\text{Cu}-\text{S})$. În afară de aceasta, în spectrele IR ale compușilor I și II sunt

prezente benzile de absorbție caracteristice moleculei de apă din sfera interioară [$\nu(\text{H}_2\text{O})=3595\dots3585$, $\delta(\text{H}_2\text{O})=1590\dots1585$, $\gamma(\text{H}_2\text{O})=925\dots910\text{ cm}^{-1}$].

Analiza termică a compușilor revendicați a demonstrat că termoliza lor decurge în trepte: în intervalul de temperaturi 160...170°C cu efect endotermic decurge procesul de deaquare, iar la 370°C (I) și 320°C (II) cu efect exotermic are loc distrucția termooxidativă completă a compușilor revendicați.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și cercetărilor fizico-chimice, a fost stabilită compoziția și structura compușilor coordinați revendicați.

Esența invenției poate fi confirmată de următoarele date experimentale.

Exemplu de utilizare a percloratului de 5-bromosaliciliden-4-feniltiosemi-carbazonato(1-)aqua-cupru(II) (compusului I) și percloratului de 5-nitrosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)aqua-cupru(II) (compusului II) în calitate de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD și proliferării celulelor cancerului prostatei [Inhibiția de tipul 1 17 β -HSD (transformarea estronului (E1) în estradiol (E2))]. Celulele de Human Embryonic Kidney (HEK-293) transferate cu ADNC codare pentru tipul 1 17 β -HSD au fost dezmembrate pentru a degaja enzima brută ce a fost utilizată ca sursă de enzime fără a fi mai apoi purificată. Această probă s-a efectuat în felul următor: pentru început s-a preparat soluția inițială (soluția mamă), ce conține substratul radiomarcant [^{14}C]-E₁ (0,1 μM), NADH (1 mM) în soluție-tampon de fosfat (pH 7,4, 50 mM KH_2PO_4 , EDTA 1 mM, 20% glicerină). Pentru testare 890 μL de soluție inițială și 10 μL de soluție de inhibitor, dizolvate în alcool etilic, s-au turnat într-un tub. Reacția a început prin adăugarea a 100 μL de soluție de enzimă brută obținută prin metoda descrisă mai sus. Durata de incubare a amestecului a fost de 1 h la 37°C, iar la sfârșitul reacției s-a adăugat un exces de E₁ și E₂ neradiomarcant. Steroizii au fost extrași cu eter dietilic, iar solventul a fost înlăturat la presiune scăzută. Rămășițele au fost dizolvate în CH_2Cl_2 , identificate pe o placă de silicagel (TLC, 20 X 20 cm X 0,2 cm, Kieselgel 60 F254) și spălate cu $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (9:1). E₁ mai puțin polar și E₂ mai mult polar s-au identificat pe TLC ca două rânduri de picături vizibile la lumina UV. Pentru detectarea și determinarea cantității semnalelor radioactivității atribuite pentru [^{14}C]-E₁ și [^{14}C]-E₂ s-a folosit detectorul atomilor marcați (Sunny Vale, CA). Procentajul transformării [^{14}C]-E₁ în [^{14}C]-E₂ s-a calculat astfel: % trans. = $100 \times \frac{[\text{C}^{14}\text{E}_2 \text{ (cpm)}]}{([\text{C}^{14}\text{E}_1 \text{ (cpm)}] + [\text{C}^{14}\text{E}_2 \text{ (cpm)}])}$. Prin urmare, procentajul inhibiției = $100 \times [(\% \text{ trans. a controlului} - \% \text{ trans. a compusului}) / (\% \text{ trans. controlului})]$.

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților anticanceroase ale percloratului de 5-bromosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)aqua-cupru(II) (compusul I) și percloratului de 5-nitrosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)aqua-cupru(II) (compusul II) sunt prezentate în tab. 1. Conform datelor din tabel se observă că compușii revendicați inhibă activitatea enzimei 17 β -HSD Tipul 1 și proliferarea celulelor cancerului prostatei în limitele concentrațiilor 10^{-5} ... 10^{-7} mol/L. La concentrația de 10^{-5} M inhibă 100%, 10^{-6} M – 80...85%, iar la concentrația de 10^{-7} M – 33...48% din celulele cancerului prostatei. Datele obținute indică (vezi tabelul) că compușii revendicați, după activitatea antitumorală, depășesc de 1,1...1,6 ori caracteristicile cancerostatice ale cei mai apropiați soluții.

Tabel

Partea celulelor de enzimă 17 β -HSD Tipul 1 inhibitate, %

Concentrație, mol/L	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Compusul			
4-Feniltiosemicarbazona aldehidei salicilice (cea mai apropiată soluție)	90	78	33
Percloratul de 5-bromosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)aqua-cupru(II) (compusul I)	100	80	33
Percloratul de 5-nitrosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)aqua-cupru(II) (compusul II)	100	85	48

40

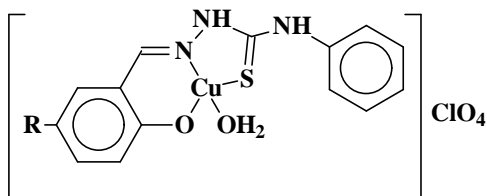
Proprietățile depistate ale 5-bromosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)aqua-cupru(II) și percloratului de 5-nitrosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)aqua-cupru(II) prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD Tipul 1, care stimulează proliferarea celulelor cancerului prostatei.

45

(57) Revendicări:

5

1. Perclorat de 5-R-saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)-aquacupru(II) cu formula generală :



unde R = Br, NO₂.

10

2. Compuși coordinativi conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17β-HSD (tipul 1), stimulator al proliferării celulelor cancerului prostatei.

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 3771 G2 2008.12.31

Șef Secție:

GROȘU Petru

Examinator:

EGOROVA Tamara

Redactor:

LOZOVANU Maria