



MD 4132 B1 2011.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4132 (13) B1

(51) Int.Cl: C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/50 (2006.01)
C07C 49/303 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (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 2010 0137 (22) Data depozit: 2010.12.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.10.31, BOPI nr. 10/2011
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; STRAISTARI Tatiana, MD; POIRIER Donald, CA	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Di(μ -S)-bis{cloro-[fenil(piridin-2-il)metanon-tiosemicarbazonato(1-)]cupru} care manifestă proprietatea de inhibare a proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar

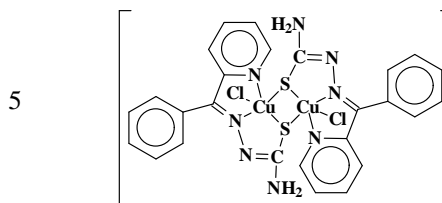
(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la o combinație complexă biologic activă a cuprului cu tiosemicarbazone, care poate găsi aplicare în medicină ca preparat citostatic la profilaxia și tratarea cancerului mamar.

Esența invenției constă în sinteza unui compus coordinativ nou al cuprului cu tiosemicarbazona2-benzoilpiridinei, di(μ -S)-bis{cloro-[fenil(piridin-2-il)metanon-tiosemicarbazonato(1-)]cupru} cu formula:

2



10 care manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar.

15 Rezultatul tehnic constă în extinderea gamei de compuși coordinativi cu activitate anticancerigenă, care la o concentrație de 10^{-6} mol/L depășește aproximativ de 4 ori caracteristicile similare ale analogului proxim din clasa tiosemicarbazonaților de cupru.

Revendicări: 2

MD 4132 B1 2011.10.31

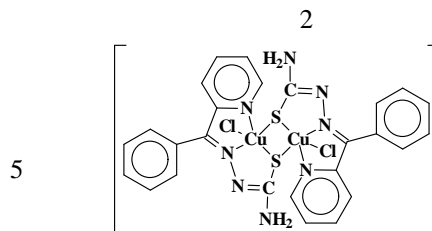
(54) Di(μ -S)-bis{chloro-[phenyl(pyridine-2-yl)methanone-thiosemicarba-

zonato(1-)-copper} manifesting the property of inhibiting the proliferation of mammary cancer T-47D cells

(57) Abstract:

1
The invention relates to chemistry and medicine, namely to a biologically active complex combination of copper with thiosemicarbazone, which can be used in medicine as a cytostatic preparation in the prevention and treatment of mammary cancer.

Summary of the invention consists in the synthesis of a new coordinative compound of copper with 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone, di(μ -S)-bis{chloro-[phenyl(pyridine-2-yl)methanone-thiosemicarbazonato(1-)]-copper} of formula:



manifesting the property of inhibiting the proliferation of mammary cancer T-47D cells.

10 The technical result is to increase the range of coordinative compounds with anticancer activity, which at a concentration of 10^{-6} mol/L is about 4 times higher than the similar characteristics of the closest analogue from the class of copper thiosemicarbazonates.

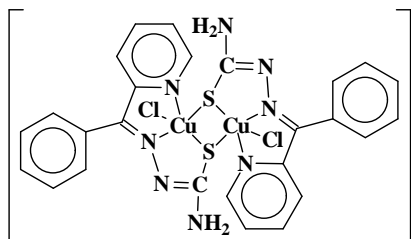
15 Claims: 2

(54) Ди(μ -S)-бис{хлоро-[фенил(пиридин-2-ил)метанон-тиосемикарбазонато(1-)]медь} проявляющий свойство ингибитора пролиферации клеток Т-47D рака молочной железы

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активного комплекса меди с тиосемикарбазонами, который может найти применение в медицине как цитостатик при профилактике и лечения рака молочной железы.

Сущность изобретения заключается в синтезе нового координационного соединения меди с тиосемикарбазоном 2-бензоилпиридина, ди(μ -S)-бис{хлоро-[фенил(пиридин-2-ил)метанон-тиосемикарбазонато(1-)]-меди} формулы:



2
который проявляет свойство ингибирования пролиферации клеток Т-47D рака молочной железы.

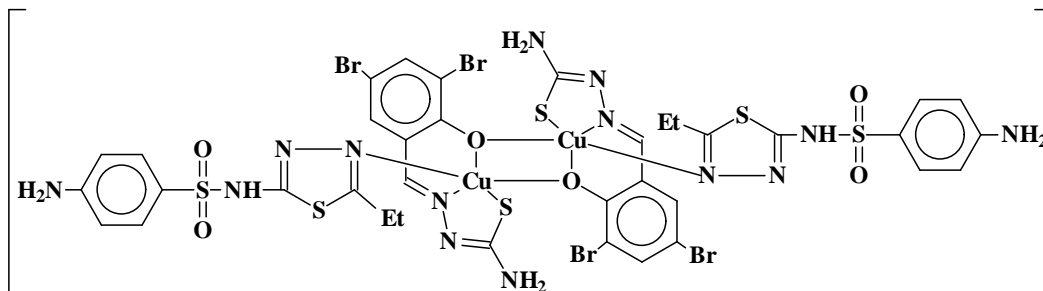
5
Технический результат заключается в расширении гаммы координационных соединений с противораковой активностью, которая при концентрации 10^{-6} моль/л примерно в 4 раза превосходит аналогичные характеристики ближайшего аналога из класса тиосемикарбазонатов меди.

10 П. формулы: 2

Descriere:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la o combinație complexă biologic activă a cuprului cu tiosemicarbazone, care poate găsi aplicare în medicină ca preparat citostatic la profilaxia și tratarea cancerului mamar.

- 5 Din compușii coordinativi, care inhibă creșterea și multiplicarea celulelor T-47D ale cancerului mamar cel mai înalt efect cancerostatic a fost obținut în cazul di(μ -O_{fenoxi})-di{[2-(4-aminobenzensulfamido)-5-etil-1,3,4-tiadiazol]-3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazonato(2-)cupru} (analogul proxim) [1] cu formula :

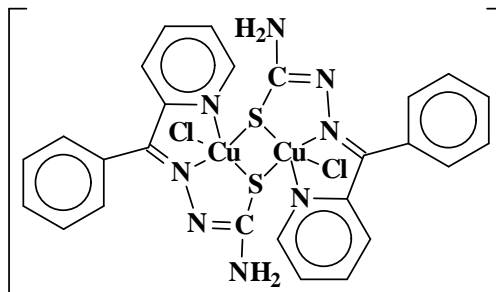


- 10 Combinația dată la concentrația de 10^{-5} mol/L depășește de 2,5 ori caracteristicile cancerostatice respective ale doxorubicinei – cel mai efektiv preparat chimioterapeutic, folosit în practica medicală pentru tratarea și profilaxia cancerului mamar.

Dezavantajul acestui compus constă în faptul că el nu posedă o activitate anticancerasă mai înaltă.

- 15 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar cu activitate citostatică înaltă.

Esența invenției constă în sinteza unui compus coordinativ nou al cuprului di(μ -S)-bis{cloro-[fenil(piridin-2-il)-metanon-tiosemicarbazonato(1-)]cupru} cu formula :



care manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar.

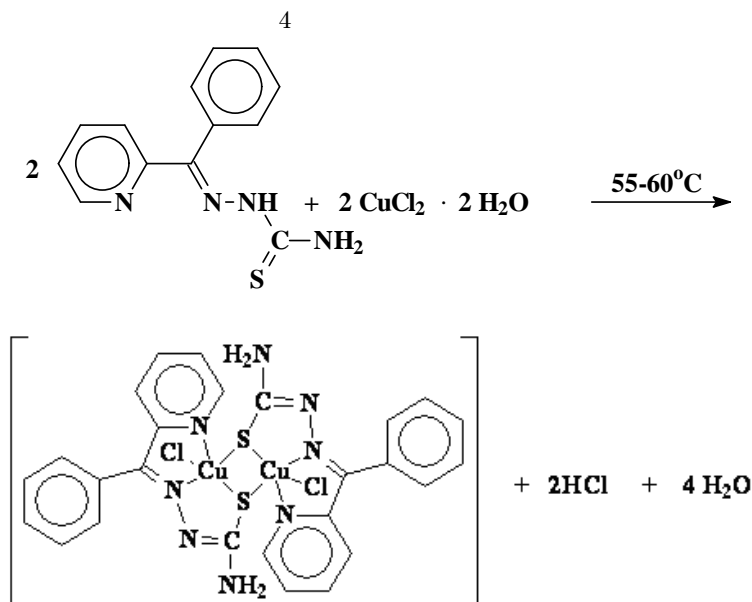
- 20 Rezultatul tehnic constă în extinderea gamei de compuși coordinativi cu activitate anticancerigenă, care la o concentrație de 10^{-6} mol/L depășește aproximativ de 4 ori caracteristicile similare ale analogului proxim din clasa tiosemicarbazonaților de cupru sus-menționat [1].

Compusul dat și proprietățile lui, precum și procedul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

- 25 Analiza comparativă a compusului revendicat cu analogul proxim demonstrează că ei se deosebesc prin aceea, că în analogul proxim fragmentul 3,5-dibromosalicilidenic este înlocuit cu cel 2-benzoil-piridinic, iar tiosemicarbazona este monodeprotonată. În afară de aceasta, molecula de streptocidă coordinată este substituită cu ionul de clor, iar funcția de atom-punte o îndeplinește atomul de sulf al tiosemicarbazonei. Datorită acestor particularități în structura complexului revendicat se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

- 30 Di(μ -S)-bis{cloro-[fenil(piridin-2-il)metanon-tiosemicarbazonato(1-)]cupru} revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (55...60°C) de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ cu tiosemicarbazona 2-benzoil-piridinei, luate în raport molar de 1 : 1. Reacția decurge în 45...60 min conform următoarei scheme :

MD 4132 B1 2011.10.31



Mecanismul reacției date constă în deprotonizarea grupei tiolice a tiosemicarbazonei sus-numite în prezența azotului piridinic al ligandului și coordinarea anionului format la ionul de cupru(2+) ca ligand N,N,S-tridentat monodeprotonizat. Al patrulea loc în sfera internă a atomului central îl ocupă atomul de sulf al moleculei vecine. La rândul său, în molecula vecină al patrulea loc coordinativ este ocupat de atomul de sulf al primului fragment de complex. Al cincilea loc în sfera coordinativă a ambilor atomi centrali de cupru este ocupat de ionii de clor.

Procedeele de obținere a di(μ -S)-bis{cloro-[fenil(piridin-2-il)metanon-tiosemicarbazonato(1-)]cupru} revendicat este simplu în realizare, substanțele inițiale sunt accesibile, iar randamentul constituie 65%. Complexul sintetizat are culoare verde, este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcooli alifatici, solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubil în eter.

Exemplu de obținere a di(μ -S)-bis{cloro-[fenil(piridin-2-il)metanon-tiosemicarbazonato(1-)]cupru}

La soluția etanolică, care conține 10 mmol de dihidrat al clorurii de cupru(2+) în 20 mL etanol, încălzită (55...60°C) și amestecată în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic, se adaugă soluția ce conține 10 mmol de tiosemicarbazona 2-benzoilpiridinei în 50 mL de alcool etilic. După aceasta, amestecul reactant se refluxează pe parcursul a 45...60 min. La răcire din amestecul reactant se precipită cristale mărunte de culoare verde, care se filtrează printr-un filtru poros din sticlă, se spală cu C₂H₅OH, eter și se usucă în aer.

Pentru C₂₆H₂₂Cl₂Cu₂N₈S₂ determinat, %: C – 43,95, H – 2,99, Cu – 17,79; N – 15,70, S – 8,88. calculat, %: C – 44,07; H – 3,13; Cu – 17,93; N – 15,81; S – 9,05.

Cercetarea la microscop a compusului coordinativ sintetizat demonstrează că el posedă omogenitate fazică. Din cauza dimensiunilor mici și absenței monocristalelor acestui complex, pentru determinarea individualității componente și structurii lui au fost utilizate metoda de analiză a elementelor, spectroscopia IR, magnetochimia și termogravimetria.

În baza măsurării în dimetilformamidă a conductibilității electrice molare (?) a complexului revendicat s-a stabilit că el este neelectrolit [$\Lambda = 3 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 20°C, C_M=0,001 mol/L].

Analiza magnetochimică la temperatura camerei (292 K) a compusului coordinativ sintetizat a demonstrat că el posedă un moment magnetic efectiv redus ($\mu_{\text{ef}} = 1,32 \text{ m.B.}$) comparativ cu cel de spin (S = 1/2), fapt care indică despre structura lui polinucleară.

Pentru determinarea modului de coordinare a ligandului la ionul de cupru(2+), a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale compusului revendicat cu cele ale analogului proxim [1], tiosemicarbazonele inițiale și ale complexului clorurii de cupru cu tiosemicarbazona 2-formilpiridinei [2], structura căruia a fost stabilită folosind analiza cu raze X. S-a constatat că tiosemicarbazona studiată în complexul revendicat se comportă ca un ligand tridentat monodeprotonizat, unindu-se cu ionul central prin intermediul atomilor de azot piridinic și azometinic și a sulfurii, formând două metalocicluri din cinci atomi. În favoarea acestui fapt indică absența în spectrele IR ale substanței revendicate și ale analogului

proxim a benzilor de absorbție $\nu(\text{NH})$ și $\nu(\text{C}=\text{S})$, care în tiosemicarbazonele libere se observă în domeniile 1540...1535 și, respectiv, 1125...1120 cm^{-1} . În structurile ambelor tipuri de complecși se observă banda de absorbție $\nu(\text{C}-\text{S})$ în domeniul 755...745 cm^{-1} , iar banda $\nu(\text{C}=\text{N})$ se deplasează cu 25...20 cm^{-1} spre frecvențe mai mici (în tiosemicarbazona inițială $\nu(\text{C}=\text{N})$ se observă la 1615 cm^{-1}), fiind însoțită de scindare în două componente. La 1575 cm^{-1} în spectrul $\text{di}(\mu\text{-S})\text{-bis}\{\text{cloro-}[\text{fenil}(\text{piridin-2-il})\text{metanon-tiosemicarbazonato(1-)}]\text{cupru}\}$ se observă banda de absorbție, care este condiționată de oscilațiile de valență $>\text{C}=\text{N}-\text{N}=\text{C}<$. Acest caracter al spectrelor IR demonstrează enolizarea tiosemicarbazonei în procesul de formare a complexului revendicat. În afară de aceasta în domeniul 535...405 cm^{-1} în spectrul $\text{di}(\mu\text{-S})\text{-bis}\{\text{cloro-}[\text{fenil}(\text{piridin-2-il})\text{metanon-tiosemicarbazonato(1-)}]\text{cupru}\}$ se observă o serie de benzi de absorbție noi, care conform datelor luate din literatură, pot fi atribuite la $\nu(\text{Cu}-\text{N}) = 530$ și 410 cm^{-1} și $\nu(\text{Cu}-\text{S}) = 465 \text{ cm}^{-1}$.

Analiza termică a demonstrat că pe derivatograma compusului revendicat se observă un singur efect exotermic la 280°C, care corespunde procesului de distrucție termooxidativă a ligandului organic în complex.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și cercetărilor fizico-chimice a fost stabilită compoziția și structura probabilă a compusului revendicat.

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Exemplu de utilizare a $\text{di}(\mu\text{-S})\text{-bis}\{\text{cloro-}[\text{fenil}(\text{piridin-2-il})\text{metanon-tiosemicarbazonato(1-)}]\text{cupru}\}$ în calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar

Cultivarea celulelor. Seria de celule T-47D ER-pozitive ale cancerului mamar a fost obținută din colecția de cultivare de tip american (CCTA) păstrată în fiole de 75 cm^3 la 37°C în atmosferă de CO_2 cu umiditatea de 5%. Celulele T-47D au fost cultivate în mediul RPMI cu adaos de 10% ser de bovine fetal (SBF), L-glutamină (2 mM), penicilină (100 IU/mL), streptomycină (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) și estradiol (1nM).

Testarea proliferării celulelor. Pentru determinarea cuantificării creșterii celulelor s-a utilizat Testarea Proliferării Celulelor cu Soluții Apoase CellTiter 96[®] (Promega, Nepean, On, Canada) în conformitate cu cerințele de preparare. Celulele T-47D au fost resuspendate în mediul cu adaos de insulină (50 ng/mL) și 5% de cărbune activat acoperit cu dextran tratat cu ser de bovine fetal (SBF) pentru a înlătura rămășițele de estrogen din ser și mediu. Părțile alicote (100 μL) ale suspensiei de celule au fost semănate în 96 plăci cu godeuri (3000 celule/godeu) în trei exemplare. După 48 ore mediul s-a schimbat, urmând diluarea specifică cu diferiți inhibitori în mediul de creștere. Celulele au fost cultivate în absența sau prezența inhibitorilor timp de 3 zile.

Datele experimentale obținute în urma studiului $\text{di}(\mu\text{-S})\text{-bis}\{\text{cloro-}[\text{fenil}(\text{piridin-2-il})\text{metanon-tiosemicarbazonato(1-)}]\text{cupru}\}$ revendicat în calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar demonstrează că acest compus la concentrația de 10^{-5} mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 100%, iar la 10^{-6} mol/L – $38 \pm 3,5\%$ de celule T-47D ale cancerului mamar (vezi tabelul). Datele obținute indică că acest compus după activitatea anticancerigenă depășește de aproximativ 4 ori caracteristicile analoage ale $\text{di}(\mu\text{-O}_{\text{fenoxi}})\text{-di}\{[2\text{-}(4\text{-aminobenzensulfamido})\text{-5-etil-1,3,4-tiadiazol}]\text{-3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazonato(2-)}\text{cupru}\}$ (analogul proxim).

Tabel

Rata inhibării celulelor T-47D ale cancerului mamar, %

Compusul	Concentrație, mol/L		
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
$\text{Di}(\mu\text{-O}_{\text{fenoxi}})\text{-di}\{[2\text{-}(4\text{-aminobenzensulfamido})\text{-5-etil-1,3,4-tiadiazol}]\text{-3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazonato(2-)}\text{cupru}\}$ (analogul proxim)	100	10	0
$\text{Di}(\mu\text{-S})\text{-bis}\{\text{cloro-}[\text{fenil}(\text{piridin-2-il})\text{metanon-tiosemicarbazonato(1-)}]\text{cupru}\}$	100	$38 \pm 3,5$	0

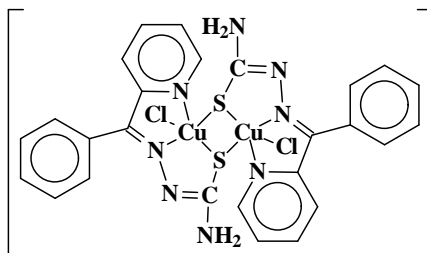
Proprietățile depistate ale $\text{di}(\mu\text{-S})\text{-bis}\{\text{cloro-}[\text{fenil}(\text{piridin-2-il})\text{metanon-tiosemicarbazonato(1-)}]\text{cupru}\}$ prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 3995 B1 (2009.12.31)
2. Chumakov Iu. M., Tsapkov V. I., Jeanneau E., Bairac N. N., Bocelli G., Poirier D., Roy J., Gulea A. Crystal structures of copper(II) chloride, copper(II) bromide and copper(II) nitrate complexes with pyridin-2-carbaldehide tiosemicarbazone. Cryst. Report. 2008, Vol.53, N 5, P. 786-792

(57) Revendicări:

1. Di(μ -S)-bis{cloro-[fenil(piridin-2-il)metanon-tiosemicarbazonato(1-)]cupru} cu formula:



2. Compus conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea** că manifestă proprietatea de inhibare a proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar.

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

JOVMIR Tudor

Redactor:

LOZOVANU Maria