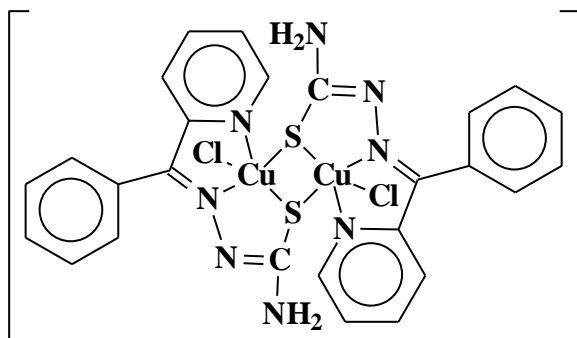
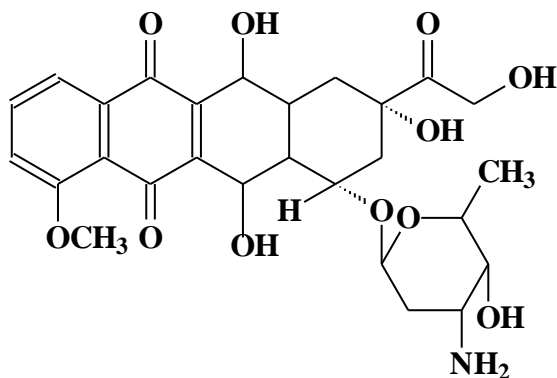


Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa tiosemicarbazidelor. Acest compus inhibă proliferarea celulelor T-47D ale cancerului mamar și poate găsi implimentare în medicină ca preparat citostatic la profilaxia și tratarea cancerului mamar.

Din toți compuși chimici, care conțin în componența sa fragmentul tiosemicarbazidic și care inhibă creșterea și multiplicarea celulelor T-47D ale cancerului mamar, cel mai înalt efect cancerostatic a fost obținut în cazul di( $\mu$ -S)-bis{cloro[fenil(piridin-2-il)metanontiosemicarbazono(1-)]cupru} (prototipul) [1] cu formula :



Complexul dat la concentrația  $10^{-6}$  mol/l depășește de 10,5-8,8 ori caracteristicile cancerostatice respective ale doxorubicinei :

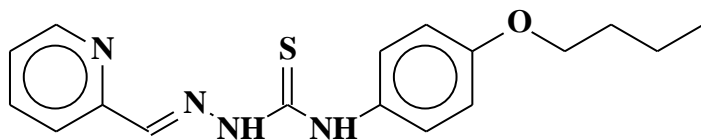


care este cel mai efectiv preparat chimioterapeutic organic, folosit în practica medicală pentru tratarea și profilaxia cancerului mamar.

Dezavantajul prototipului [1] constă în faptul că el nu posedă o activitate anticancer înaltă și pînă acum nu a găsit o aplicare în medicină.

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

*Esența* invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamidei [N-(4-butoxifenil)tiosemicarbazonei 2-formilpiridinei] cu formula :

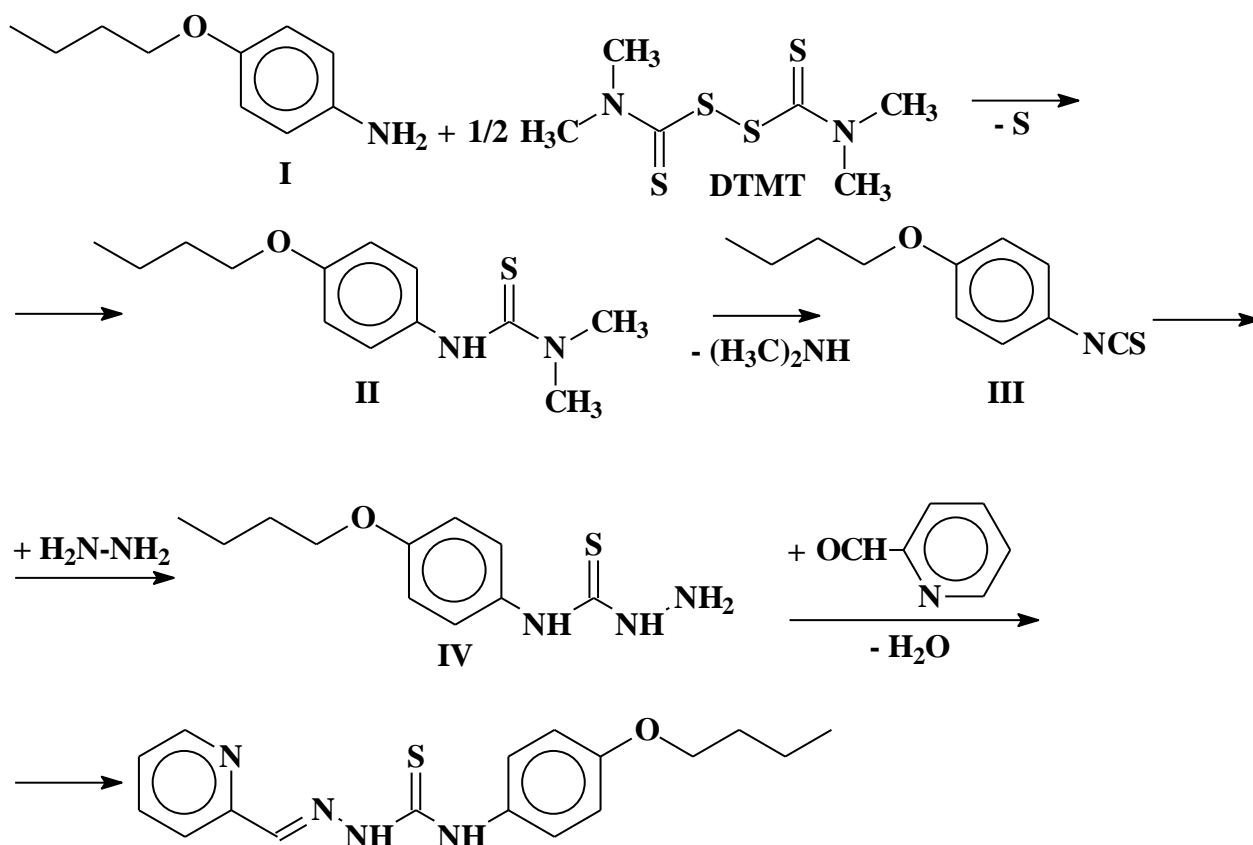


*Rezultatul tehnic* al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anticancerigene, care la concentrația  $10^{-6}$  mol/l se află la nivelul di( $\mu$ -S)-bis{cloro[fenil(piridin-2-il)metanontiosemicarbazono(1-)]cupru} (prototipului) [1], iar la concentrația  $10^{-7}$  inhibă creșterea și multiplicarea a 44,2% de celule T-47D ale cancerului mamar, în timp ce prototipul nu manifestă la această concentrație activitate anticancerigenă. Proprietatea stabilită a N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamidei susnumită este nouă, fiindcă pînă acum nu este descrisă utilizarea ei în calitate de inhibitor al creșterii și multiplicării celulelor T-47D ale cancerului mamar.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul, că pentru prima dată în calitate de inhibitor al proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar se propune N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamida, care conține o combinare nouă de legături chimice deja cunoscute.

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

N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamida revendicată se obține conform următoarei scheme :



Mecanismul prezentei reacții este următorul : la prima etapă de sinteză 4-butoxianilina (I) reacționează cu dimetiltiouram (DTMT) în raport molar 1:0,5 la încălzire în solvenți polari (etanol, dimetilformamidă sau dimetilsulfoxidă). La următoarea etapă, 3-(4-butoxifenil)-1,1-dimetiltiureea (II) obținută, se supune procesului dezaminării [încălzire compusului II cu  $H_2SO_4$  (raport molar al reagenților 1:1) în dioxan] cu formarea 1-butoxi-4-izotiocianatobenzenului (III). N-(4-butoxifenil)hidrazintiocarbamida (IV) se obține prin picurarea soluției de izotiocianat III la exces de hidrat de hidrazină în dioxan. Astfel se exclude adăția tiosemicarbazidei IV formate la izotiocianatul inițial. N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamida finală se sintetizează prin condensarea tiosemicarbazidei IV cu 2-formilpiridina la încălzire într-un amestec de dimetilformamidă-etanol (1 : 3). Sinteza compușilor inițiali I-IV a fost efectuată după metodicile standarde descrise în literatură. Puritatea lor a fost confirmată cromatografic, prin analiza elementală și spectrală (IR,  $^1H$  și  $^{13}C$ -RMN).

*Exemplu de obținere al N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotoamidei.*

La soluția obținută din 0,32 g (0,003 mol) 2-formilpiridină și 2,0 ml etanol se adaugă 0,72 g (0,003 mol) N-(4-butoxifenil)hidrazintiocarbamida (IV), dizolvată în 3 ml dimetilformamidă, apoi amestecul se încălzește la baie de apă 1 oră. Sfirșitul reacției se verifică după consumul aldehidei. După răcire produsul final se filtrează, se spală pe filtru cu etanol și se usucă. Se obțin 0,84 g (80%) de produs final. Compoziția substanței a fost stabilită în baza rezultatelor analizei elementelor.

Determinat, % : C - 62,19; H - 5,99; N - 16,81; S - 9,54. Calculat pentru compusul  $C_{17}H_{20}N_4OS$ , % : C - 62,17; H - 6,14; N - 17,06; S - 9,76.

P. t. = 242-244°C.

Spectrul  $^1H$ -RMN(DMSO,  $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 9,31(s, 1H, NH); 8,95(s, 1H, NH); 8,56 (d, 1H, CH piridinic); 8,27 (s, 1H, CH=N); 7,95 (d, 1H, CH piridinic); 7,76 (t, 1H, CH piridinic); 7,33 (t, 1H, CH piridinic); 7,18 (d, 2H, CH fenilenic); 7,16 (d, 2H, CH fenilenic); 3,91 (t, 2H,  $CH_2$ ); 1,65 (m, 2H,  $CH_2$ ); 1,42 (m, 2H,  $CH_2$ ); 0,90 (t, 3H,  $CH_3$ ).

Spectrul  $^{13}C$ -RMN (DMSO,  $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 177,26 (C=S); 159,24; 156,44; 149,51; 136,55; 133,20; 125,51; 123,70; 122,74; 116,02 (C aromatic); 141,53 (HC=N), 68,18; 31,25; 19,20 ( $CH_2$ ); 13,80 ( $CH_3$ ).

Procedeele de obținere al compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile. Compusul obținut este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă, bine solubil în alcooli, clorofom, eter, dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă.

La recristalizarea compusului declarat din soluție etanolică au fost obținute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X (Formula empirică  $C_{17}H_{20}N_4OS$ , grupa spațială Pc, parametrii celulei elementare [Å] : a = 9,596(2); b = 5,6455(12), c = 31,145(9); volumul celulei elementare 1673,2 Å<sup>3</sup>). A fost stabilit (Fig.), că în celula elementară a compusului se află două molecule de azometină, care au structură practic planară. Fragmentul tiosemicarbazidic în componența ambelor molecule se află în forma tionică [ d(C=S) 1,69(3) Å].

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

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

*Exemplu al utilizării N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotioamidei 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) și păstrată în fiole de 75 cm<sup>3</sup> la 37°C în atmosferă de CO<sub>2</sub> cu umiditatea de 5%. Celulele T-47D au fost cultivate în mediul RPMI cu adaos de 10% ser de bovine fetal (SBF), L-glutamină (2mM), penicilină (100 IU/ml), streptomycină (100 μg/ml) și estradiol (1nM).

*Testarea proliferării celulelor.* Pentru determinarea cuantificării creșterii celulelor s-a utilizat Testarea Proliferării Celulelor cu Soluții Apoase CellTiter 96<sup>®</sup> (Promega, Nepean, On, Canada) în conformitate cu cerințele de preparare. Celulele T-47D au fost resuspendate în mediul cu adaos de insulină (50ng/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 (100μl) ale suspensiei de celule au fost semănate în 96 plăci cu godeuri (3000 celule/godeuri) în trei exemplare. După 48 ore mediul s-a schimbat, urmând diluarea specifică cu diferiți inhibitori în mediul de creștere. Celule au fost cultivate în absența sau prezența inhibitorilor timp de 3 zile.

Datele experimentale obținute în urma studiului N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotioamidei declarate în calitate de inhibitor al multiplicării celulelor T-47D indică, că la concentrația 10<sup>-6</sup> mol/l activitatea ei se află la nivelul di(μ-S)-bis{cloro[fenil(piridin-2-il)metanontiosemicarbazono(1-)]cupru} (prototipului) [1], iar la concentrația 10<sup>-7</sup> mol/l este inhibată creșterea și multiplicarea a 44,2% de celule T-47D ale cancerului mamar, în timp ce prototipul la această concentrație nu manifestă activitate anticancerigenă. În baza datelor experimentale a fost stabilit, că compusul declarat are concentrația de inhibare semimaximală (IC<sub>50</sub>) egală cu 0,8 μmol/L.

Tabel

Partea celulelor T-47D ale cancerului mamar inhibitate, %

Compusul	Concentrație, mol/l		
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Doxorubicina	40	0	0
Di(μ-S)-bis{cloro[fenil(piridin-2-il)metanontiosemi-carbazono(1-)]cupru} (prototipul)	100	38±3,5	0
N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-carbotioamida	100	46,6	44,2

Proprietățile depistate ale N-(4-butoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetiliden)-hidrazincarbotioamidei prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor T-47D ale cancerului mamar.