



MD 4858 C1 2023.12.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4858** (13) **C1**(51) Int.Cl: *A61K 31/30* (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/4402 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/50 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

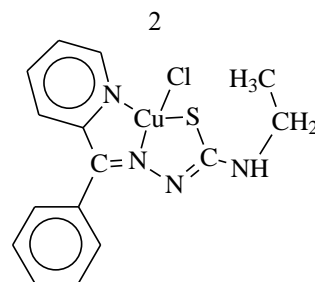
<p>(21) Nr. depozit: a 2021 0066 (22) Data depozit: 2021.09.30</p> <p>(41) Data publicării cererii: 2023.03.31, BOPI nr. 3/2023</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2023.05.31, BOPI nr. 5/2023</p>
<p>(71) Solicitant: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: GUDUMAC Valentin, MD; PANTEA Valeriana, MD; CEBAN Emil, MD; ANDRONACHE Lilia, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GULEA Aurelian, MD; GHINDA Sergiu, MD</p> <p>(73) Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD</p>	

(54) Utilizarea cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazon-
tioato}cupru în calitate de inhibitor al factorilor de creștere

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, în particular la utilizarea unui compus coordinativ de cupru biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție în calitate de inhibitor sintetic al factorilor de creștere. Acest complex poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat, care, inhibând producerea excesivă a factorilor de creștere în organism, previne dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, legate de acumularea excesivă a țesutului conjunctiv, procesele inflamatorii, patologii neurodegenerative, renale, cardiovasculare, ateroscleroza și carcinogeneza.

Esența invenției constă în utilizarea cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru cu formula:



în calitate de inhibitor al factorilor de creștere selectați din grupul care constă din factorul de creștere endotelial vascular (VEGF), factorul de creștere derivat din trombocite (PDGF), factorul de creștere al fibroblastelor-beta (FGF-β) și factorul de creștere transformator beta (TGF-β).

Compusul menționat extinde arsenalul de inhibitori ai factorilor de creștere cu activitate biologică înaltă.

Revendicări: 1

MD 4858 C1 2023.12.31

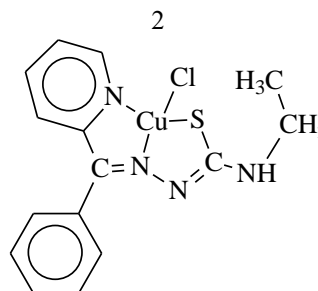
(54) Use of chloro-{N-ethyl-N'-[phenyl(pyridin-2-yl)methylidene]carbamohydrazonethioato}copper as a growth factor inhibitor

(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and medicine, in particular to the use of a biologically active copper coordination compound of the class of transition metal thiosemicarbazones as a synthetic growth factor inhibitor. This complex can find application in medicine as a preparation, which, by inhibiting the excessive production of growth factors in the organism, prevents the development of cell and tissue injuries, related to excessive accumulation of connective tissue, inflammatory processes, neurodegenerative, renal, cardiovascular pathologies, atherosclerosis and carcinogenesis.

Summary of the invention consists in the use of chloro-{N-ethyl-N'-[phenyl(pyridin-2-yl)methylidene]carbamohydrazonethioate} copper with the formula:



as an inhibitor of growth factors selected from the group consisting of vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor-beta (FGF- β) and transforming growth factor-beta (TGF- β).

The said compound expands the arsenal of growth factor inhibitors with high biological activity.

Claims: 1

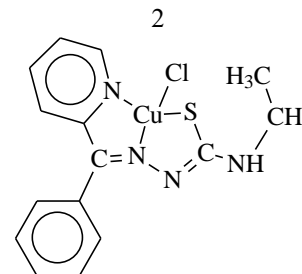
(54) Применение хлоро-{N-этил-N'-[фенил(пиридин-2-ил)метилен]карбамогидразонтиоато}меди в качестве ингибитора факторов роста

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и медицине, в частности к использованию биологически активного координационного соединения меди класса тиосемикарбазонатов переходных металлов в качестве синтетического ингибитора факторов роста. Этот комплекс может найти применение в медицине в качестве препарата, который, подавляя чрезмерную выработку факторов роста в организме, предотвращает развитие клеточных и тканевых повреждений, связанных с чрезмерным накоплением соединительной ткани, воспалительными процессами, нейродегенеративными, почечными, сердечно-сосудистыми заболеваниями, атеросклерозом и карциногенезом.

Сущность изобретения заключается в применении хлоро-{N-этил-N'-[фенил(пиридин-2-ил)метилен]карбамогидразонтиоато}меди формулы:



в качестве ингибитора факторов роста выбранных из группы состоящей из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста тромбоцитов (PDGF), фактора роста фибробластов-бета (FGF- β) и трансформирующего фактора роста бета (TGF- β).

Упомянутое соединение расширяет арсенал ингибиторов факторов роста с высокой биологической активностью.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la chimie și medicină, în particular la utilizarea unui compus coordinativ de cupru biologic activ din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție în calitate de inhibitor sintetic al factorilor de creștere. Acest complex poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat, care, inhibând producerea excesivă a factorilor de creștere în organism, previne dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, legate de acumularea excesivă a țesutului conjunctiv, procesele inflamatorii, patologii neurodegenerative, renale, cardiovasculare, ateroscleroza și carcinogeneza.

Factorii de creștere reprezintă un grup de proteine din familia citokinelor cu masă moleculară joasă, a căror funcție principală este menținerea homeostaziei imune și inducerea inflamației. Sinteza excesivă a factorilor de creștere, supraexpresarea lor este implicată în patogeneza unei multitudini de boli umane și procese patologice severe (Buch S. Growth factor signaling: implications for disease & therapeutics. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014, vol.9(2), p.65-68, doi:10.1007/s11481-014-9534-4).

Printre diferite tipuri de factori de creștere, un rol important îi revine factorului de creștere endotelial vascular (VEGF). VEGF este o proteină de semnalizare produsă de o multitudine de celule pentru stimularea vasculogenezei și angiogenezei, procese importante implicate în instalarea și progresia bolilor renale și altor boli, instalarea proceselor inflamatorii și creșterea tumorală (Apte R. S., Chen D. S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.*, 2019, vol.176(6), p.1248-1264). VEGF secretat de celulele tumorale stimulează proliferarea și supraviețuirea celulelor endoteliale, ducând la formarea de noi vase de sânge, care favorizează expansiunea tumorii, metastazarea și rezistența la tratamentul cancerului.

Activitatea excesivă a factorului de creștere derivat din trombocite (PDGF) este asociată cu mai multe stări patologice, inclusiv ateroscleroza, restenoza coronariană indusă de implantarea stentului, hipertensiunea pulmonară, fibroza organelor și tumorigeneza (Alvarez R.H., Kantarjian H.M., Cortes J.E. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc.*, 2006, vol.81(9), p.1241-1257, doi: 10.4065/81.9.1241. PMID: 16970222).

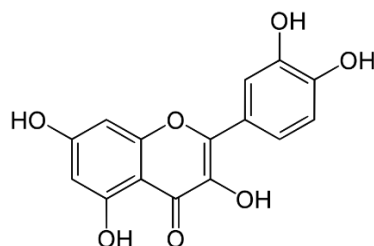
Familia factorului de creștere al fibroblastelor (FGF) reglează o multitudine de procese fiziologice și fiziopatologice, inclusiv repararea țesuturilor, vindecarea rănilor, angiogeneza și dezvoltarea embrionară celulară (Yun Y.R., Won J.E., Jeon E., et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng.*, 2010;2010:218142, doi:10.4061/2010/218142; Agrawal S., Maity S., AlRaawi Z., et al. Targeting Drugs Against Fibroblast Growth Factor(s)-Induced Cell Signaling. *Curr Drug Targets.*, 2021.01.01, 22(2), p.214-240).

Factorul de creștere transformator beta (TGF- β) este un mediator profibrotic cheie în bolile fibrotice, în special în fibroza renală (Patrick Ming-Kuen Tang, Ying-Ying Zhang, Thomas Shiu-Kwong Mak, et al. Transforming growth factor- β signalling in renal fibrosis: from Smads to non-coding RNAs. *J. Physiology*, 2018, vol. 596 (16), p.3493-3503).

Dezvoltarea unor agoniști și antagoniști farmacologici selectivi, care funcționează la toate nivelurile de semnalizare, ai factorilor de creștere menționați, oferă noi instrumente pentru protejarea țesuturilor de leziuni, îmbunătățirea reparării celulelor și țesuturilor, tratarea unei varietăți de boli metabolice și inhibarea cancerului (Snigdha Tiash, Ezharul Hoque Chowdhury. Growth factor receptors: promising drug targets in cancer. *J Cancer Metastasis Treat*, 2015, vol.1 (3), p.190-200).

Astfel, inhibarea terapeutică a factorilor de creștere este o contribuție nouă, deoarece compușii care inhibă activitatea factorilor de creștere manifestă un puternic efect curativ, prevenind dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, procesele fibrotice, ateroscleroza și carcinogeneza.

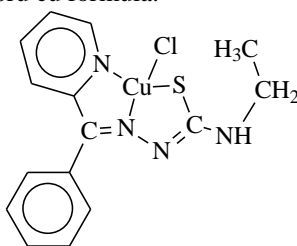
În calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a factorilor de creștere se utilizează quercetina cu formula:



Dezavantajul quercetinei constă în faptul, că ea nu posedă o activitate de inhibare a factorilor de creștere suficient de înaltă, precum și în provocarea unor efecte adverse severe [1].

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în utilizarea cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru care extinde arsenalul de compuși cu activitate de inhibare a factorilor de creștere înaltă, manifestată prin inhibarea producției factorilor de creștere VEGF, PDGF, FGF-β și TGF-β.

Esența invenției constă în utilizarea cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru cu formula:



în calitate de inhibitor al factorilor de creștere selectați din grupul care constă din factorul de creștere endotelial vascular, factorul de creștere derivat din trombocite, factorul de creștere al fibroblastelor-beta și factorul de creștere transformator beta.

Compusul menționat, proprietățile lui și procedeele de sinteză sunt descrise în literatură (Indoria S., Lobana T.S., Singh D., et al. Stabilization of CuII-I Bonds Using 2-Benzoylpyridine Thiosemicarbazones – Synthesis, Structure, Spectroscopy, Fluorescence, and Cyclic Voltammetry. Eur. J. Inorg. Chem., 2015, 5106–5117, doi:10.1002/ejic.201500618).

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității de inhibare a factorilor de creștere, care se manifestă prin inhibarea concludentă a producerii principalilor factori de creștere: VEGF cu 38%; PDGF cu 33%; FGF-β cu 38%; și TGF-β cu 25%, induse de lipopolizaharidele bacteriene (LPS) față de nivelul controlului, aceste valori fiind superioare în raport cu cele manifestate de quercetină, utilizată în calitate de analog (prototip) pentru determinarea activității de inhibare a factorilor de creștere.

Proprietatea stabilită a cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru menționat este nouă, deoarece, până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al factorilor de creștere (chemokinelor).

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Exemplu al utilizării cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru în calitate de inhibitor al factorilor de creștere.

Testarea cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru [cod – CMD-8] s-a efectuat conform procedurii descris în literatură (Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А. Стандартизация методики определения продукции цитокинов клетками крови *ex vivo*. Клин. лабор. д-ка, 2011, № 11, с. 49-53) cu modificări. Sângele de la 6 persoane, condiționat sănătoase, incluse în studiu* a fost recoltat dimineața *a jeun*, prin puncția venei cubitale, în cantitate de 5 mL. În condiții sterile, sângele a fost introdus într-un flacon ce conținea 20 mL mediu nutritiv Eagle modificat după Dulbecco (DMEM), heparină (2,5 un/mL), gentamicină (100μg/mL) și L-glutamină (0,6 mg/mL).

Pentru studiul influenței cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru asupra secreției factorilor de creștere stimulate de către lipopolizaharide bacteriene (LPS) amestecul de sânge cu mediul nutritiv a fost suplimentat cu 10 μg/mL LPS.

Toate experiențele au fost efectuate în duplicat, pentru ce s-a pipetat câte 0,9 mL din amestecul de sânge cu mediul nutritiv în toate godeurile plăcii cu 24 de godeuri. Apoi, pentru stabilirea nivelului inițial al indicilor studiați, în primele 2 godeuri s-a adăugat câte 0,1 mL soluție 0,9% NaCl. În celelalte godeuri s-au adăugat câte 0,1 mL sol. de 10 μmol/L de cloro-{N-etil-N'-

[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru, diluat în soluție de 0,9% NaCl. Astfel, concentrația finală a remedului testat a constituit 1,0 μmol/L. Toate determinările au fost efectuate în duplicat.

După incubare la 37°C în incubatorul cu 3,5% CO₂ timp de 48 ore conținutul plăcilor a fost transferat în eprubete Eppendorf cu volumul de 2 mL și, apoi, centrifugate la 2000 rot/min, timp de 7 min. Supernatantul obținut a fost transferat în eprubete Eppendorf curate și folosit ulterior pentru determinarea factorilor de creștere - VEGF, PDGF, FGF-β și TGF-β. Determinarea cantitativă a factorilor de creștere menționați a fost efectuată cu ajutorul kiturilor de analize ELISA ale firmei Vector-Best (Rusia) conform instrucțiunilor anexate. Principiul metodei constă în aceea că, mai întâi factorii de creștere din proba de cercetat (FCP) reacționează cu anticorpii specifici imobilizați pe microplacă, apoi FCP fixați la microplacă reacționează cantitativ cu conjugatul ce conține anticorpi anti-factori de creștere conjugați cu biotina. Apoi se adaugă anticorpii ce conțin complexul streptavidina legată de peroxidaza din hrean, după care se adaugă substratul peroxidazei – H₂O₂ și cromogenul (tetrametilbenzidina), iar intensitatea colorării este proporțională cu concentrația FCP și se măsoară prin spectrofotometrie la riderul cu microplăci. Avantajul acestei metode constă în aceea că proba de cercetat nu trebuie să fie purificată înainte de analiză, iar metoda este foarte sensibilă.

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților de inhibare a producerii factorilor de creștere ale cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru sunt prezentate în tabel, din care se observă, că compusul menționat manifestă activitate anti-factori de creștere mai înaltă, decât cea produsă de quercetina, utilizată în calitate de analog.

Tabel

Influența compusului cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru [cod – CMD-8] asupra producerii factorilor de creștere – VEGF, PDGF, FGF-β și TGF-β induse de lipopolizaharidele bacteriene – LPS (10 μg/mL)

Grupele de studiu	Producerea de VEGF (ng/mL) indusă de LPS	Producerea de PDGF(pg/mL) indusă de LPS	Producerea de FGF-β (ng/mL) indusă de LPS	Producerea de TGF-β (pg/mL) indusă de LPS
Control (nivel inițial)	137,5±12,1 (100%)	572,5±25,3 (100%)	19,7±2,1 (100%)	218,1±18,1 (100%)
CMD-8 (1,0 μmol/L)	84,9±10,4** (62%)	385,6±43,2** (67%)	12,2±2,1* (62%)	163,8±15,4* (75%)
Quercetina (1,0 μmol/L)	102,8±10,3* (75%)	453,8±22,5 (79%)*	16,1±1,8 (82%)	181,1±17,1 (83%)

Notă: Control (nivel inițial) – până la tratarea sângelui cu remediile studiate;

Diferență statistic semnificativă față de nivelul controlului (nivel inițial):

*- p<0,05; **- p<0,01.

Sub influența compusului coordonativ testat are loc diminuarea producerii indusă de LPS a nivelului de VEGF cu 38%, PDGF cu 33%, FGF-β cu 38% și TGF-β cu 25% față de nivelul controlului (nivel inițial).

Proprietățile depistate ale cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato} cupru prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori sintetici ai factorilor de creștere (chemokinelor).

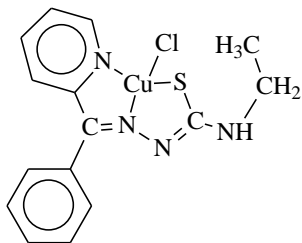
*Prelevarea sângelui de la subiecții umani s-a efectuat în conformitate cu standardele etice formulate în Declarația de la Helsinki din 1975 și revizuite în 1983. A fost obținut acordul informat de la persoanele incluse în studiu (Hotărârea Comitetului de Etică al Cercetării, USMF Nicolae Testemițanu nr.81 din 18.09.2020).

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Shu-Chen Cheng et al. Quercetin inhibits the production of IL-1b-induced inflammatory cytokines and chemokines in ARPE-19 cells via the MAPK and NF-kB signaling pathways. International Journal of Molecular Sciences, 2019, vol. 20 (12):2957.

(57) Revendicări:

Utilizarea cloro-{N-etil-N'-[fenil(piridin-2-il)metiliden]carbamohidrazontioato}cupru cu formula:



în calitate de inhibitor al factorilor de creștere selectați din grupul care constă din factorul de creștere endotelial vascular, factorul de creștere derivat din trombocite, factorul de creștere al fibroblastelor-beta și factorul de creștere transformator beta.