



MD 3996 C2 2009.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 3996 (13) C2

- (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

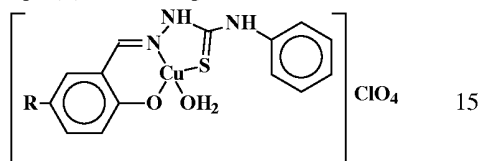
<p>(21) Nr. depozit: a 2009 0055 (22) Data depozit: 2009.05.25</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.12.31, BOPI nr. 12/2009</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; POIRIER Donald, CA; PAHONȚU Elena, RO (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

(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:

1
Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compuşilor coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, care își pot găsi aplicare în medicină pentru profilaxia și tratarea cancerului prostatei.

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



unde R = Br, NO₂

2
Compușii coordinativi posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17β-HSD (tipul 1), stimulator al proliferării celulelor cancerului prostatei.

Revendicări: 2

MD 3996 C2 2009.12.31

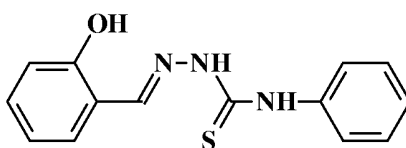
MD 3996 C2 2009.12.31

3

Descriere:

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinativi din clasa tiosemi-carbazonaților 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-feniltiosemi-carbazona aldehydei salicilice, cu următoarea formulă:

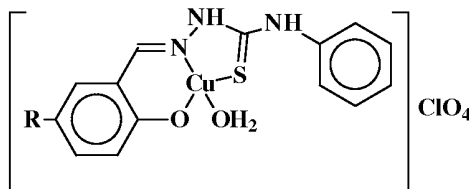


După activitatea antitumorală acest compus depășește de 1,3...1,8 ori caracteristicile citostatice ale estronului, care se aplică în medicină pentru profilaxia și tratarea cancerului prostatei [1].

15 Dezavantajul celei mai apropiate soluții constă în faptul că 4-feniltiosemi-carbazona aldehydei 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.

20 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.

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



unde R = Br, NO₂.

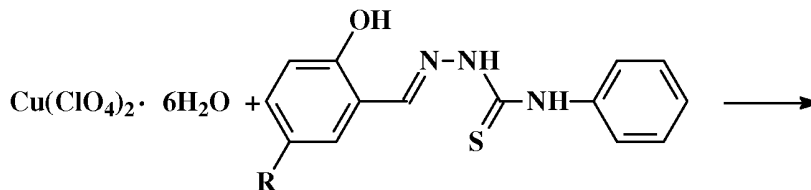
25 Compușii coordinativi posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD (tipul 1), stimulator al proliferării celulelor cancerului prostatei.

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

30 Rezultatul invenției constă în stabilirea la compuşii revendicați a activității anticancerigene, care depășește de 1,1...1,6 ori caracteristicile canceristice ale 4-feniltiosemi-carbazona aldehydei salicilice.

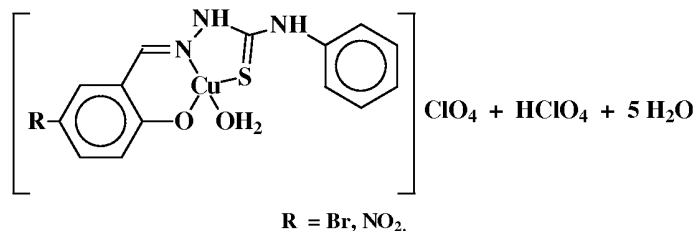
30 Rezultatul invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitori ai activității enzimei 17 β -HSD Tipul 1, care stimulează proliferarea celulelor cancerului prostatei, se propun compușii coordinativi ai percloratului de cupru(2+) cu 4-feniltiosemi-carbazona aldehydelor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

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



MD 3996 C2 2009.12.31

4



5 Mecanismul prezentei reacții este următorul: în timpul sintezei în amestecul reactant are loc coordinația 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 coordinațional 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 perchlorat-ionului din sfera exterioară.

10 Exemplu de obținere a perchloratului de 5-bromosaliciliden-4-feniltiosemicarbazonato (1-)aquacupru(II)

Compusul I

15 Se amestecă 30 mL de soluție etanolică, care conține 10 mmol de 4-feniltiosemicarbazona a aldehidei 5-bromosalicilice cu 10 mmol de $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$, dizolvat în 20 ml de alcool. Amestecul reactant este încălzit ($50 \dots 55^\circ C$) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de $45 \dots 50$ 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.

20 Pentru compusul $C_{14}H_{13}BrClCuN_3O_6S$

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.

25 După o metodă analogică, folosind în calitate de substanțe inițiale hexahidrat al perchloratului 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 $C_{14}H_{13}ClCuN_4O_8S$

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.

30 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 alcoolii, bine solubili în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubili în eter.

35 Cercetarea vizuală sub microscop a compușilor coordinațivi 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.

40 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) $\Omega^{-1} \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$, $20^\circ C$, $C_M = 0,001 mol/L$].

40 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.

45 În scopul determinării modului de coordinație 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 compoziții revendicați se comportă ca liganzii tridentați monodeprotonizați, 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 $\delta(OH)$, care în tiosemicarbazonatele libere se observă în domeniul $1250 \dots 1240 cm^{-1}$. În compoziții I și II și analogii lor structurali banda de absorbție $\nu(C=N)$ se deplasează cu $25 \dots 15 cm^{-1}$ spre frecvențe mai mici [în 4-feniltiosemicarbazonatele inițiale $\nu(C=N)$ se observă în domeniul $1620 \dots 1610 cm^{-1}$]. În favoarea modului numit de coordinație a 4-feniltiosemicarbazonatelor aldehidelor salicilice substituite vorbește și faptul apariției în domeniul $530 \dots 405 cm^{-1}$ a unui șir de benzi de absorbție noi, care conform datelor luate din literatură se detectează ca $\nu(Cu-N)$, $\nu(Cu-O)$ și $\nu(Cu-S)$. În afară de aceasta, în spectrele IR ale compușilor I și II sunt

MD 3996 C2 2009.12.31

5

prezente benzile de absorbție caracteristice moleculei de apă din sfera interioară [$\nu(\text{H}_2\text{O})=3595\text{...}3585$, $\delta(\text{H}_2\text{O})=1590\text{...}1585$, $\gamma(\text{H}_2\text{O})=925\text{...}910\text{ cm}^{-1}$].

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 KH₂PO₄, 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 CH₂Cl₂, identificate pe o placă de silicagel (TLC, 20 X 20 cm X 0,2 cm, Kieselgel 60 F254) și spălate cu CH₂Cl₂/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 celei mai apropiate soluții.

Tabel

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

Compusul	Concentrație, mol/L	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
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

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.

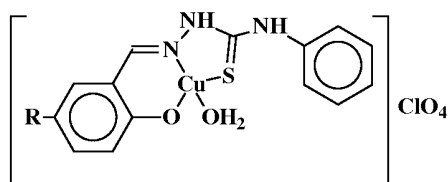
45

MD 3996 C2 2009.12.31

6

(57) Revendicări:

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



unde R = Br, NO₂.

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

10

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 3771 G2 2008.12.31

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

EGOROVA Tamara

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2009 0055	
(22) Data depozit: 2009.05.25	
<p>(51) : Int. Cl.: C07F 1/08 (2006.01) <i>C07C 337/08</i> (2006.01) <i>C07C 47/55</i> (2006.01) <i>C07C 47/56</i> (2006.01) <i>A61K 31/175</i> (2006.01) <i>A61K 31/055</i> (2006.01) <i>A61K 31/06</i> (2006.01) <i>A61K 31/11</i> (2006.01) <i>A61K 31/30</i> (2006.01) <i>A61P 13/08</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>Alți indici de clasificare:</p> <p>(54) Titlul : Perclorați de 5-R-saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)-aquacupru(II) ce posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17 β-HSD (Tipul 1)</p> <p>(71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p> <p>Termeni caracteristici :</p> <p>a) limba română: Perclorați de 5-R-saliciliden-4-feniltiosemicarbazonato(1-)-aquacupru(II) ce posedă proprietăți de inhibitori ai activității enzimei 17 β-HSD (Tipul 1)</p> <p>b) limba engleză: Perchlorates of 5-bromo- and 5-nitrosalicylidene-4-phenylthiosemicarbazonato(1-)-aquacopper(II) as inhibitors of enzyme 17 β-HSD Tip 1 activity</p>	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.)	
<p>Int. Cl.: C07F 1/08 (2006.01) <i>C07C 337/08</i> (2006.01) <i>C07C 47/55</i> (2006.01) <i>C07C 47/56</i> (2006.01) <i>A61K 31/175</i> (2006.01) <i>A61K 31/055</i> (2006.01) <i>A61K 31/06</i> (2006.01) <i>A61K 31/11</i> (2006.01) <i>A61K 31/30</i> (2006.01) <i>A61P 13/08</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p>	
II. Literatura tehnico-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
Аблов А. В., Гэрбэлэу Н. В. Производные тиосемикарбазона салицилового альдегида с никелем, медью и цинком, Журнал неорганической химии, 1965, т. 10, вып. 5, с. 1155-1159	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	

Bazele de date internaționale(Internet) BD FIBS (RU) Oficiul European de Brevete(ep.espacenet) SUA(www.uspto) Romania(www.osim.ro) MD 1994-2008 EA 1995-2008 SU 1970-1991
--

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 3771 G2 2008.12.31	1,2
A	RU C1 2265014 2005.11.27	1,2
A	US A 2695911 1954.11.30	1,2
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă divulgare		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2009.10.13
Examinatorul		EGOROVA Tamara