



MD 4630 B1 2019.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4630** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07C 277/00* (2006.01)
C07C 279/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/13 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2018 0006 (22) Data depozit: 2018.02.14	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.05.31, BOPI nr. 5/2019
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ARICU Aculina, MD; KUCHKOVA Kaleria, MD; DUCA Gheorghe, MD; SECARA Elena, MD; BARBA Alic, MD; DRAGALIN Ion, MD; UNGUR Nicon, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Compusul 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină cu activitate antiproliferativă și citotoxică**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, în special la un compus cu schelet hibrid terpenic și guanidinic și poate fi utilizat pentru tratamentul cancerului.

Esența invenției constă în aceea că se revendică compusul 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-

2
tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină pentru utilizare în calitate de compus cu activitate antiproliferativă și citotoxică.

Revendicări: 2

MD 4630 B1 2019.05.31

(54) 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-Tetramethyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalene-1-yl)butane-2-yl)guanidine compound with antiproliferative and cytotoxic properties

(57) Abstract:

1
The invention relates to chemistry and medicine, in particular to a compound with hybrid terpene-guanidine skeleton and can be used for treating cancer.

Summary of the invention consists in that the compound 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-

2
tetramethyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalene-1-yl)butane-2-yl)guanidine is claimed for use as a compound with antiproliferative and cytotoxic properties.

Claims: 2

(54) Соединение 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-тетраметил-3,4,4a,5,6,7,8,8a-октагидро-нафталин-1-ил)бутан-2-ил)гуанидин с антипролиферативными и цитотоксическими свойствами

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к химии и медицине, в частности к соединению с гибридным терпеново-гуанидиновым скелетом и может быть использовано для лечения рака.

Сущность изобретения состоит в том, что заявляется соединение 1-(4-((4aS,8aS)-

2
2,5,5,8a-тетраметил-3,4,4a,5,6,7,8,8a-октагидро-нафталин-1-ил)бутан-2-ил)гуанидин для использования в качестве соединения с антипролиферативными и цитотоксическими свойствами.

П. формулы: 2

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la chimie și medicină, în special la un compus cu schelet hibrid terpenic și guanidinic și poate fi utilizat pentru tratamentul cancerului.

În practica mondială designul moleculelor cu proprietăți anticancer s-a dezvoltat preponderent în direcția sintezei combinațiilor *cis*-platinice [1]. Utilizarea compușilor platinici în tratarea cancerului se confruntă în prezent cu multiple efecte adverse. Problema de asamblare a unor agenți noi de inhibare a proliferării celulelor canceroase, eficienți și puțin toxici, rămâne în continuare una actuală.

Majoritatea preparatelor antiproliferative și citotoxice existente nu asigură un efect curativ radical și stabil. Tratamentele existente, ca regulă, nu conduc la dispariția definitivă a oricărui semn de boală, ci doar ameliorează temporar starea generală a pacienților, aceasta recidivând frecvent cu manifestări clinice mai pronunțate.

15 Din seria de preparate frecvent utilizate în practica medicală este bine cunoscută Cisplatina, care este un medicament chimioterapic utilizat pentru a trata un număr mare de cancere [2]. Aceasta include cancerul testicular, cancerul ovarian, cancerul de col uterin, cancerul de sân, cancerul vezicii urinare, cancerul capului și gâtului, cancerul esofagian, cancerul pulmonar, mezoteliomul, tumorile cerebrale și neuroblastomul. Se utilizează prin
20 injectare intravenoasă. Cisplatina este din familia de medicamente antineoplazice bazate pe platină. Funcționează în parte prin legarea și inhibarea replicării ADN.

Preparatul menționat însă are și un șir de dezavantaje, ce constau în:

- supresia măduvei osoase;
- problemele auditive;
- 25 - problemele de rinichi;
- amorteală;
- tulburări de mers pe jos,
- reacții alergice;
- utilizarea în timpul sarcinii dăunează asupra dezvoltării copilului;
- 30 - probleme de electroliză și boli de inimă ș.a.

Extinderea cercetărilor științifice în domeniul elaborării remediilor anticancer cu activitate biologică ridicată, la prețuri competitive cu preparatele de import, adică accesibile pentru populație, din materie primă locală, constituie o problemă de importanță primordială pentru Republica Moldova.

35 Problema pe care o rezolvă invenția constă în lărgirea gamei de compuși enantiopuri, cu activitate anticanceroasă ridicată obținuți prin semisinteză din materii prime de origine vegetală, ieftine și accesibile. Extinderea cercetărilor științifice în domeniul elaborării remediilor anticancer cu activitate biologică ridicată, la prețuri competitive cu preparatele de import, adică accesibile pentru populație, din materie primă locală, constituie o problemă
40 de importanță primordială pentru Republica Moldova. O valoare adăugată invenției oferă faptul că materia primă locală este renovabilă, accesibilă și poate fi obținută din deșeurile provenite din industria uleiurilor etero-oleaginoase.

Esența invenției constă în aceea că se revendică compusul 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină pentru utilizare în
45 calitate de compus cu activitate antiproliferativă și citotoxică.

Rezultatul invenției constă în obținerea a unui compus nou, terpeno-guanidinic, care poate fi utilizat pentru tratarea unor afecțiuni de natură canceroasă.

Avantajele compusului revendicat constau în:

- 50 1. activitatea biologică mai ridicată a 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină în raport cu preparatele cunoscute;
2. accesibilitatea compusului revendicat sub aspect eficiență/preț;
3. accesibilitatea materiei prime și originea ei locală;
4. eficiența și simplitatea metodei de sinteză a acestuia.

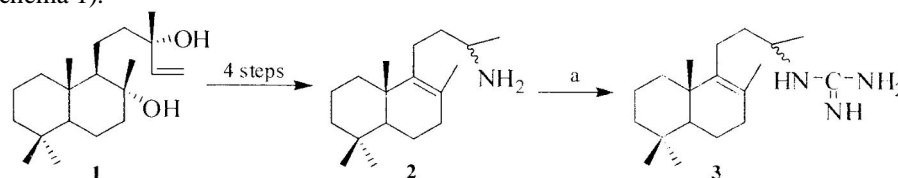
55 Invenția soluționează problema prin aceea că 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină, ce posedă un schelet hibrid terpenic și guanidinic poate fi utilizată în calitate de compus cu proprietăți anticancer pronunțate, fapt confirmat de testările activității biologice a acestuia *in vitro* utilizând teste

antiproliferative și de citotoxicitate pentru liniile celulare Colo 205 sensibile la doxorubicină și liniile celulare Colo 320 de adenocarcinom de colon uman, multidrog-rezistente și doxorubicină-rezistente.

De menționat, că obținerea 1-(4-((4a*S*,8a*S*)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină cât și rezultatele testărilor biologice ale acestui compus nu au fost descrise anterior în literatura de specialitate.

Compușii care conțin guanidină pot fi sintetizați direct pornind de la amine. În cererea revendicată se descrie prepararea derivaților de guanidină ai 13-amino-14,15- bis-norlabd-8-enei.

Amina (2) se sintetizează din sclareolul (1) conform metodei descrise anterior (Kuchkova K. I., Aricu A. N., Secara E. S., Barba A. N., Dragalin I. P., Vlad P. F., Ungur N. D. Synthesis of 13-amino-14,15-dinorlabd-8(9)-ene from sclareol. Russ. Chem. Bull., International Edition, 2014, 63, p. 1-3). Reacția aminei (2) cu hidrogenadianamida de sodiu în soluție etanol-apă (5:1), care a fost neutralizată cu acid acetic, a dat derivatul guanidinei (3) (Schema 1).



Schema 1

Calea de reacție pentru prepararea derivaților guanidiniici ai aminei:

(a) $\text{NH}(\text{Na})\text{CN}$, AcOH; EtOH - H_2O (5:1), 20°C, 24 h, δ , 20 h.

Structura compusului revendicat a fost confirmată prin metode de analiză obligatorii, spectroscopie în infraroșu (IR), rezonanță magnetică nucleară mono- și bidimensională (^1H , ^{13}C RMN și 2D), spectrometrie de masă (HRMS).

În rezultatul testărilor biologice s-a demonstrat, că compusul (3) are o activitate citotoxică puternică pe liniile celulare sensibile și rezistente la adenocarcinom de colon (IC₅₀ între 4 și 8 μM). Interesant: compusul (3) are activitate citotoxică mai scăzută asupra celulelor fibroblaste pulmonare normale, implicând toxicitatea selectivă a compușilor. Comparând activitatea citotoxică a compușilor cu cisplatina, compusul (3) a prezentat o activitate citotoxică mai puternică, cu selectivitate față de celulele tumorale.

Compusul revendicat este stabil la contact cu aerul, parțial solubil în alcoolii și apă, solubil în dimetilsulfoxid (DMSO), clorura de metilen, acetat de etil și acetonă.

Exemplu de realizare a invenției

Prepararea 1-(4-((4a*S*,8a*S*)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină (3).

Soluția de cianamidă de sodiu (209 mg, 4,97 mmoli) de NaNHCN în 4,5 ml apă se neutralizează cu 0,22 ml AcOH gheață și se adaugă prin picurare la o soluție de amină (2) (230 mg, 0,87 mmoli) în amestec EtOH- H_2O (5:1) (11 ml) la agitare. Amestecul de reacție se agită la temperatura camerei timp de 24 ore, apoi se refluxează timp de 20 ore, se neutralizează cu NaHCO_3 și se extrage cu EtOAc (3x50 ml). Extractul se usucă și se concentrează în vid, obținându-se un reziduu brut (350mg), care se cromatografiază rapid pe silicagel (10,5 g, eluent: CHCl_3 - CH_3OH , 4:1) pentru a se obține derivatul guanidinei (3) (79 mg).

1-(4-((4a*S*,8a*S*)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină (3).

(Randament 60%) sub formă de ulei (amestec inseparabil de diastereoizomeri în raport 1:1 conform datelor ^1H RMN), $[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 41,8$ (c 2,8, CHCl_3); IR (CHCl_3) 3431, 3339, 3254, 2928, 2867, 1677, 1619, 1591, 1461, 1403, 1338, 1151, 1046, 1006, 788 cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 6,2-5,13 (8H, m, 2x (2NH și NH_2)), 3,08 (2H, m, H-13) (6H, s, H-15), 1,26 (6H, m, H-14), 0,92 (6H), 0,86 (6H, s, H-16), 0,82 (6H, s, H-17); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 167,1 (C = NH), 139,6, 139,5 (C, C9), 126,4, 126,3 (C, C- (CH, C-13), 41,8, 41,0 (CH_2 , C-3), 39,3, 39,0 (CH_2 , C-1) (CH_3 , C-17), 21,4 (CH_3 , C-7), 33,4, 33,3, C-14), 20,2 (CH_3 , C-18), 19,6, 19,5 (CH_3 , C-15), 19,1 (CH_2 , C-2), 19,0 (CH_2 , C-6); HRESIMS m/z (pos): 305,2904. $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_3$ (calculat 305,5056); Anal. Calc. pentru $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{N}_3$: C, 74,70; H, 11,55; N, 13,75. Găsit: C, 74,50; H, 11,35; N, 13,58.

Testarea activității biologice a 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină (3).

Activitatea biologică a compusului revendicat a fost testată *in vitro* cu utilizarea testelor antiproliferative și de citotoxicitate pentru liniile celulare Colo 205 Sensibile la doxorubicină și liniile celulare Colo 320 de adenocarcinom colon uman, multidrog-rezistente și doxorubicină-rezistente.

Rezistența celulelor Colo 320 este mediată în primul rând prin supraexpresia ABCB1 (glicoproteina P), membru al xenohioticelor de extracție a casetei de legare ATP (ABC) din celule. Relația dintre nivelul de expresie al proteinelor transportoare MDR, cum ar fi transportatorii ABC și sensibilitatea la medicamente sau posibili candidați la medicamente, are o importanță deosebită în ceea ce privește chimioterapia clinică și experimentală și dezvoltarea de medicamente.

Pentru a determina activitatea compușilor asupra proliferării celulare, a fost ales un număr scăzut de celule (6×10^3 celule/godeu). Perioada de incubare a testului MTT a fost de 72 ore. Cisplatina a fost utilizată ca un control pozitiv. Compusul (3) a exercitat o activitate antiproliferativă puternică asupra ambelor linii celulare de adenocarcinom de colon (IC50 între 3 și 8 μM). Rezultatele testărilor sunt raportate în tabelul 1.

Activitatea antiproliferativă și citotoxică

Tabelul 1

Compusul	Efectul antiproliferativ, (μM)		Efectul citotoxic, (μM)		
	Colo 205 sensibil	Colo 320 rezistent	Colo 205 sensibil	Colo 320 rezistent	MRC5 fibroblastele pulmonare umane
3	3,36±0,69	3,45±1,10	4,12±1,18	7,02±1,92	15,34±4,8
Cisplatina	23,2±2,95	9,74±3,11	66,77±4,62	12,17±1,01	44,12±1,28

În testul citotoxicității, a fost utilizat un număr mare de celule (2×10^4 celule/godeu) și inhibarea creșterii celulare a fost determinată după 24 de ore prin testul MTT pentru a investiga toxicitatea compușilor. Cisplatina a fost utilizată ca un control pozitiv, iar citotoxicitatea a fost măsurată și în celule fibroblaste pulmonare embrionare umane normale (MRC-5). Solventul DMSO nu a afectat viabilitatea celulelor. Compusul (3) are o activitate citotoxică puternică pe liniile celulare sensibile și rezistent la adenocarcinom de colon (IC50 între 4 și 8 μM). Interesant: compusul (3) are activitate citotoxică mai scăzută asupra celulelor fibroblaste pulmonare normale, implicând toxicitatea selectivă a compușilor. Comparând activitatea citotoxică a compușilor cu cisplatina, compusul a prezentat o activitate citotoxică mai puternică cu selectivitate față de celulele tumorale.

Microorganismele au fost furnizate de American Type Culture Collection (ATCC), USA.

Liniile celulare de adenocarcinom de colon Colon 205 sensibil la doxorubicină (ATCC-CCL-222) și Colo 320 multidrog-rezistente/MDR-LRP care au supraexprimat ABCB1 (MDR1) -LRP (ATCC-CCL-220.1) au fost achiziționate de la LGC Promochem, Teddington, UK. Celulele au fost cultivate în mediu RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat termic, 2 mM L-glutamină, 1 mM Napiruvat și 100 mM Hepes. Liniile celulare au fost incubate la 37°C, într-un amestec de 5% CO₂ și 95% aer. Celulele semi-aderente de cancer de colon uman au fost detașate cu soluția Trypsin-Versene (EDTA) timp de 5 min la 37°C.

Linia de celule fibroblastice pulmonare embrionare umane MRC-5 (ATCC CCL-171) a fost achiziționată de la LGC Promochem, Tecdinwon, UK. Linia celulară a fost cultivată în mediul minimal esențial Eagle (EMEM, conținând 4,5 g/L glucoză) suplimentat cu un amestec de aminoacizi neesențiali, selecție de vitamine și ser de fetal bovin inactivat termic de 10%. Liniile celulare au fost incubate la 37°C, într-un amestec de 5% CO₂ și 95% aer.

Analiza pentru efect citotoxic

In studiul MRC-5, fibroblastele pulmonare embrionare umane necanceroase și liniile celulare de adenocarcinom colonic uman (celule Colo 205 sensibile la doxorubicină și celule de adenocarcinom de colon Colo 320 multidrog-rezistente) au fost utilizate pentru a determina efectul compușilor asupra creșterii (Efectele concentrațiilor crescande de compuși asupra creșterii celulare au fost testate pe plăci de microtitrare cu fund plat cu 96 de godeuri. Compușii au fost diluați într-un volum de 100 μL de mediu.

Celulele fibroblaste pulmonare embrionare umane aderente au fost cultivate pe plăci de microtitrare cu fund plat cu 96 de godeuri, utilizand EMEM suplimentat cu ser fetal bovin inactivat termic de 10%. Densitatea celulelor a fost ajustată la 2×10^4 celule in 100 μL *per* godeu, celulele au fost insămânțate timp de 24 ore la 37°C, 5% CO₂, apoi mediul a fost îndepărtat din plăcile care conțin celulele și diluțiile compușilor anterior pregătite într-o placă separată au fost adăugate celule lor în 200 μL.

În cazul celulelor adenocarcinomului de colon, dublele diluții în serie ale compușilor au fost preparate in 100 μL de RPMI 1640, orizontal. Celulele de adenocarcinom colorectal semi-aderent au fost tratate cu soluție Tripsin-Versene (EDTA). Acestea au fost ajustate la o densitate de 2×10^4 celule in 100 μL de mediu RPMI 1640 și au fost adăugate in fiecare godeu, cu excepția godeurilor de control al mediului. Volumul final al godeurilor a fost de 200 μL conținând compuși și celule.

Plăcile de cultură au fost incubate la 37°C, timp de 24 ore, iar la sfârșitul perioadei de incubare s-au adăugat in fiecare godeu 20 μL de soluție MTT (albastru de tiazolil bromură de tetrazoliu, Sigma) (dintr-o soluție stoc de 5 mg/ml). După incubare la 37°C, timp de 4 ore s-au adăugat 100 μL de soluție de dodecil sulfat de sodiu (SDS) (Sigma) (10% in 0,01 M HCl) la fiecare godeu și plăcele au fost incubate suplimentar la 37°C pe noapte. Creșterea celulelor a fost determinată prin măsurarea densității optice (OD) la 540/630 nm cu Multiscan EX ELISA (Thermo Labsystems, Cheshire, WA, SUA). Inhibarea creșterii celulare a fost determinată conform formulei de mai jos:

$$IC_{50} = 100 - \left[\frac{OD\ proba - OD\ controlul\ mediului}{OD\ controlul\ celular - OD\ controlul\ mediului} \right] \times 100$$

Rezultatele sunt exprimate in termeni de IC₅₀, definit doza inhibitoare care reduce creșterea celulelor expuse la compușii testați cu 50%.

Analiză pentru efect antiproliferativ

Metoda este similară celei descrise in testul pentru efectul citotoxic. In testul de testare a inhibării proliferării celulare s-au distribuit 6×10^3 celule de adenocarcinom de colon in 100 μL mediu, cu excepția godeurilor de control al mediului. Plăcile de cultură au fost incubate la 37°C, timp de 72 ore și după perioada de incubare plăcile au fost colorate cu MTT conform protocolului experimental anterior descris pentru testul citotoxicității.

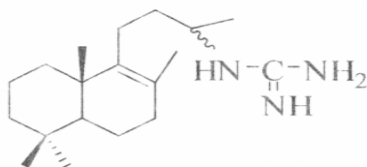
Rezultatul invenției este condiționat de utilizarea pentru prima dată a 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină in calitate de compus ce posedă proprietăți antiproliferative și anticancer pronunțate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Galanski M., Arion V.B., Jakupec M.A., Keppler B.K. Recent Developments in the Field of Tumor-Inhibiting metal Complexes. Current Pharm. Design, No 9, 2003, p. 2078
2. Johnstone Timothy C., Suntharalingam Kogularamanan , Lippard Stephen J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. Chem. Rev., No 116, 2016, p. 3436-3486

(57) Revendicări:

1. Compusul 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină cu formula structurală:



2. Compusul 1-(4-((4aS,8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)butan-2-il)guanidină pentru utilizare în calitate de compus cu activitate antiproliferativă și citotoxică.