



MD 4948 B1 2026.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4948** (13) **B1**
(51) Int.Cl: **A61K 31/4402** (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

În 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 2024 0031 (22) Data depozit: 2024.10.16	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2026.01.31, BOPI nr. 1/2026
(71) Solicitant: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GARBUZ Olga, MD; RUSNAC Roman, MD; PÎNTEA Aliona, MD (73) Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Compuși coordinativi nitrato-{N-[(2-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru și nitrato-{N-[(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru, care inhibă proliferarea celulelor cancerigene

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, în particular la compuși coordinativi de cupru din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, care pot fi utilizați în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor cancerigene și datorită acestor proprietăți pot găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparate citostatice.

Conform invenției, compuși coordinativi nitrato-{N-[(2-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru și nitrato-{N-[(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru se propun pentru utilizare în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor cancerigene, unde celulele cancerigene sunt celulele cancerului pancreatic BxPC-3, rabdomiosarcomului uman RD, cancerului de col uterin HeLa, leucemiei mieloide umane HL-60, carcinomului prostatic uman LNCaP, carcinomului mamar MCF-7, carcinomului hepatocelular uman HepG-2 și leucemiei mieloide cronice K-562.

Compuși coordinativi menționați extind arsenalul de inhibitori ai proliferării unui spectru larg de celule cancerigene, cu activitate biologică înaltă.

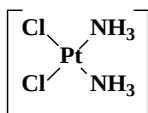
Revendicări: 1

MD 4948 B1 2026.01.31

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la complexii de cupru din clasa tiosemicarbazonaților metalelor, care pot fi utilizați în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor cancerigene și datorită acestor proprietăți pot găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparate citostatice.

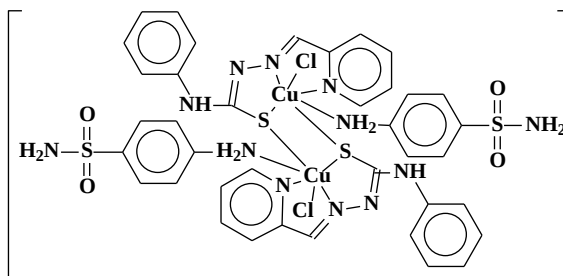
Dintre compușii coordinativi, care manifestă activitate anticancer, un spectru larg de acțiune citotoxică posedă cis-diclorodiaminplatina (II) (în continuare cisplatină) cu formula:



Acest citostatic sub forma medicamentului cisplatină, este larg folosit în practica medicală și ca standard în biochimie la studierea activității anticancerigene [1]. El este utilizat singur sau în chimioterapie complexă a diferitelor forme de cancer. Mecanismul lui de acțiune constă în blocarea funcțiilor ADN-ului, legate de formarea legăturilor coordinative între atomul de platină și două baze guaninice ale ADN-ului. Ca rezultat, în ADN se formează legături intra- și intercatenare, care duc la dereglarea replicării și transcripției, întârzierea diviziunii celulare și inducerea apoptozei.

Dezavantajul medicamentului cisplatină, constă în faptul, că el pătrunde greu în celule și prin transformări nefermentative rapid se metabolizează în metaboliți neactivi. Legarea acestui compus de proteine constituie, de obicei, nu mai mult de 90% și induce reacții adverse: greață, vomă, stomatită, crampe musculare, neuropatie, tahicardie și hipotensiune arterială.

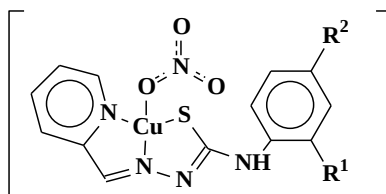
Dintre compușii coordinativi biologic activi de cupru din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție care manifestă activitate anticancer descriși în literatură, un spectru larg de acțiune citotoxică posedă di(μ-S)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}cupru (analogul structural) [2] cu formula:



Compusul coordinativ dat manifestă activitate anticancer, care depășește de 42,2-1,1 ori caracteristicile citostatice ale cisplatinei, dar până acum nu a găsit aplicare în medicină.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării unui spectru larg de linii celulare de cancer cu activitate citostatică înaltă.

Esența invenției constă în aceea că, se propun compușii coordinativi nitrato-{N-[(2-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru (compusul I) și nitrato-{N-[(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru (compusul II) cu formula generală:



I - II

I : R¹ = OCH₃, R² = H ; II : R¹ = H, R² = OCH₃

pentru utilizare în calitate de inhibitori de proliferare a celulelor cancerigene BxPC-3 ale cancerului pancreatic, RD ale rabdomiosarcomului uman, HeLa ale cancerului de col uterin, HL-60 ale leucemiei mieloide umane, LNCaP ale carcinomului prostatic uman, MCF-7 ale carcinomului mamar, HepG-2 ale carcinomului hepatocelular uman și K-562 ale leucemiei mieloide cronice.

Compușii coordinativi I și II, procedeul lor de sinteză, structura și proprietățile fizico-chimice sunt descrise în literatură [Mitchevici N., Cotovaia A., Țapcov V. și Gulea A. Compuși coordinativi ai unor metale 3d cu 4-(metoxifenil)-tiosemicarbazonele 2-formilpiridinelor substituie. Conferința științifică națională cu participare internațională. Integrare prin cercetare și inovare: Științe ale naturii și exacte, Chișinău, Republica Moldova, 2016. Rezumate ale comunicărilor, pag. 199-202]. A fost stabilit, că ei manifestă activitate antimicrobiană și antifungică selectivă, dar din cauza activității biologice joase până acum nu au găsit aplicare în medicină.

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compușii I și II a activității anticancer, care, în dependență de linia celulară depășește de 10 - 3 ori activitatea cisplatinei sau se află la nivelul activității citostatice a acesteia și de 30 - 1,1 ori depășește caracteristicile analoge ale analogului structural.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul, că pentru prima dată în calitate de inhibitori ai proliferării unui spectru larg de celule de cancer se propun doi compuși coordinativi de cupru, care conțin o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Exemplu al utilizării nitrato-{N-[(2-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru și nitrato-{N-[(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru în calitate de inhibitori de proliferare ai celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloide.

Celulele leucemiei umane mieloide HL-60 obținute din Colecția Culturilor Tip American (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) au fost cultivate în formă de suspensie în mediul RPMI-1640 suplimentat cu 10% (v/v) ser embrionic de bovine, 2 mM de L-glutamină, 100 IU penicilină/mL și 100 μg de streptomycină/mL și incubate în atmosferă umedă de 95% aer/5% CO₂ la 37°C. Celulele au fost amestecate de 2-3 ori pe parcursul săptămânii, pentru a le păstra în fază omogenă. După aceasta celulele au fost plasate în vase Falcon din plastic pentru culturi cu 24 de compartimente (2 cm²/celulă) la densitatea inițială de 1·10⁵ celule/mL/compartiment și tratate cu soluții de diferită concentrație ale compușilor declarați în apă sterilă. Fiecare procedură de tratare cu aceeași concentrație a fost efectuată în câte trei repetări.

Exemplu al utilizării nitrato-{N-[(2-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru (compusul I) și nitrato-{N-[(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru (compusul II) în calitate de inhibitori de proliferare ai celulelor HeLa ale cancerului de col uterin, B_xPC-3 ale cancerului pancreatic, RD ale rabdomiosarcomului uman, LNCaP ale carcinomului prostatic uman, MCF-7 ale carcinomului mamar, HepG-2 ale carcinomului hepatocelular uman și K-562 ale leucemiei mieloide cronice.

Celulele au fost cultivate ca monostrat în mediu nutritiv DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) și RPMI -1640 cu un conținut înalt de glucoză, L-glutamină, soluție tampon HEPES (acid N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etan sulfonic), penicilină, streptomycină, FBS (fetal bovine serum). Celulele au fost crescute în două flacoane T-75 și au fost incubate în termostat ce conține 2% CO₂, 98% aer la temperatura de 37°C. Mediul nutritiv se schimbă la fiecare 3-4 zile.

Proliferarea celulelor cu resazurină

Resazurina este un colorant indicator non-fluorescent, este transformat în rezorufină fluorescentă foarte roșie prin reacțiile de reducere a celulelor metabolice active. Cantitatea de fluorescență produsă este proporțională cu numărul de celule vii. Resazurina a fost dizolvată în soluție tampon fiziologică (rezultând o soluție albastru închisă) și adăugată omogen la celule. În prezența reducătorilor NADPH dehidrogenaza sau NADH dehidrogenaza ca enzime, resazurina este redusă până la rezorufină.

Celulele au fost tripsinizate prin adăugarea a 3 mL de tripsină- acid etilendiamintetraacetic (tripsină-EDTA) în flacoane de 50 mL și incubate timp de 5 minute la temperatura de 37°C, cu o agitare permanentă și vizualizare la microscop (OLYMPUS) pentru a vedea dacă celulele sunt aranjate într-un monostrat. Reacția de tripsinizare poate fi stopată prin adăugarea a 10 mL de mediu nutritiv ce conține 10% FBS. Celulele trebuie să fie distribuite într-o concentrație de 1x10⁵ celule/mL. Suspensia de celule rezultată a fost duplicată în placi de microtitrare cu 96 celule într-o cantitate de 90 μL și au fost incubate în termostat la temperatura de 37°C și 2% CO₂. După 4 ore de incubare, la celule se adaugă 10 μL de compus coordinativ, care a fost dizolvat în prealabil în DMSO.

Asupra celulelor s-a acționat cu diverse concentrații (100, 10, 1, 0,1 μmol/L) ale compușilor coordinativi (I) și (II). După 24 de ore în fiecare celulă a plășetei de microtitrare se adaugă 20 μL de resazurină și se incubează 4 ore la temperatura de 37°C. Dacă compusul posedă proprietăți anticancer are loc distrugerea celulelor de cancer.

Se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 570 nm și 600 nm cu aparatul Synergy H1, BioTek. Partea de celule inhibitate este calculată prin intermediul formulei:

$$100 - ((\text{Abs } 570\text{nm}_{\text{proba}} - \text{Abs } 600\text{nm}_{\text{proba}}) / (\text{Abs } 570\text{nm}_{\text{control}} - \text{Abs } 600\text{nm}_{\text{control}}) \times 100)$$

De asemenea, se calculează concentrația semimaximală de inhibare IC_{50} pentru fiecare probă.

Datele experimentale obținute privind studiul proprietăților citostatice ale nitrato-{N-[(2-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru (compusul I) și nitrato-{N-[(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru (compusul II) sunt prezentate în tabel, din care se observă, că în diapazonul concentrațiilor 10^{-5} - 10^{-7} mol/L compușii menționați manifestă activitate anticancer față de un spectru larg de celule de cancer și după caracteristicile citostatice, în dependență de linia celulară depășesc de 10 - 3 ori activitatea cisplatinei, sau se află la nivelul activității citostatice a ei și de 30 - 1,1 ori depășesc caracteristicile analoage ale analogului structural.

Proprietățile depistate ale nitrato-{N-[(2-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru și nitrato-{N-[(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai proliferării unui spectru larg de celule de cancer.

Tabel

Concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$) ale compușilor (I) și (II) în comparație cu prototipul și analogul structural

Compusul	Linii celulare ^{a)}							
	BxPC-3	RD	HeLa	HL-60	LNCaP	MCF-7	HepG-2	K-562
Prototipul ^{b)}	0,5	0,15	0,1	0,08	0,8	0,3	0,2	0,3
Analogul structural ^{c)}	1,7	1,3	0,9	0,9	d	d	d	d
I	0,1	0,1	0,8	0,03	0,8	0,1	0,4	0,5
II	0,1	1,2	1,1	0,03	0,3	0,6	0,6	0,03

*Notă : a) linii celulare: BxPC-3 – cancer pancreatic, RD – rabdomiosarcom muscular uman, HeLa – cancer de col uterin, HL-60 –leucemie mieloidă umană, LNCaP – carcinom prostatic uman, MCF-7 - carcinom mamar, HepG-2 - carcinom hepatocelular uman, K-562 - linia celulară de leucemie mieloidă cronică în măduva osoasă umană; b) Medicamentul cisplatina; c) Analogul structural - di(μ -s)-bis{(4-aminobenzensulfamid)-cloro-N-[fenil-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-1-carbotioamido(1-)]}cupru, d) activitatea anticancer analogului structural față de liniile celulare date nu a fost studiată.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства, М.: Новая волна, 2012, p.989-990.
2. MD 4620 B1 2019.02.28

(57) Revendicări:

Compușii coordinativi nitrato-{N-[(2-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru și nitrato-{N-[(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-il-metiliden)hidrazin-1-carbotioamido]}cupru pentru utilizare în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor cancerigene, unde celulele cancerigene sunt celulele BxPC-3 ale cancerului pancreatic, RD ale rabdomiosarcomului uman, HeLa ale cancerului de col uterin, HL-60 ale leucemiei mioide umane, LNCaP ale carcinomului prostatic uman, MCF-7 ale carcinomului mamar, HepG-2 ale carcinomului hepatocelular uman și K-562 ale leucemiei mioide cronice.