



MD 4393 C1 2016.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4393** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07D 405/12* (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

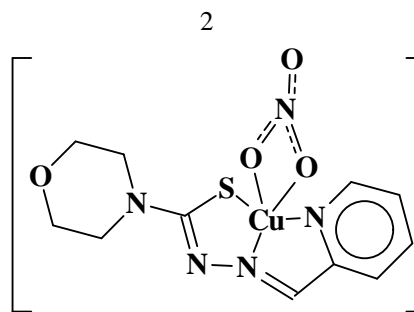
(21) Nr. depozit: a 2015 0083 (22) Data depozit: 2015.09.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.01.31, BOPI nr. 1/2016
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; PAHOLNIȚAIA Anastasia, MD; POIRIER Donald, CA; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Inhibitor al celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloide în baza nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție și poate găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratarea leucemiei umane mieloide.

Esența invenției constă în aceea că în calitate de inhibitor al leucemiei umane mieloide (celule HL-60) se propune nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru cu formula:



Compusul revendicat inhibă creșterea și multiplicarea a 72% de celule HL-60 ale leucemiei umane mieloide la o concentrație de 10^{-7} mol/L.

Revendicări: 2

Figuri: 1

MD 4393 C1 2016.08.31

(54) Inhibitor of human myeloid leukemia HL-60 cells based on nitrate-[N'-(1-pyridine-2-ylmethylidene)-morpholine-4-carbothiohydrazido(1-)]copper

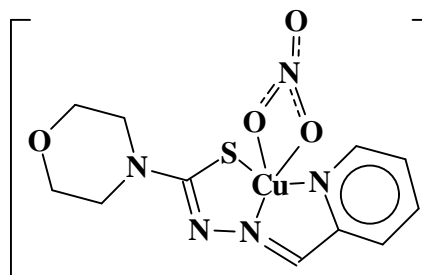
(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry, namely to the synthesis of coordinative compounds from the class of thiosemicarbazones of transition metals and can find application in medicine for the prevention and treatment of human myeloid leukemia.

Summary of the invention consists in that as an inhibitor of human myeloid leukemia (HL-60 cells) is proposed nitrate-[N'-(1-pyridine-2-ylmethylidene)-morpholine-4-carbothiohydrazido(1-)]copper of Formula:

2



The claimed compound inhibits the growth and reproduction of 72% of human myeloid leukemia HL-60 cells at a concentration of 10^{-7} mol/L.

Claims: 2

Fig.: 1

(54) Ингибитор клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека на основе нитрато-[N'-(1-пиридин-2-илметилен)морфолин-4-карботиогидразида(1-)]меди

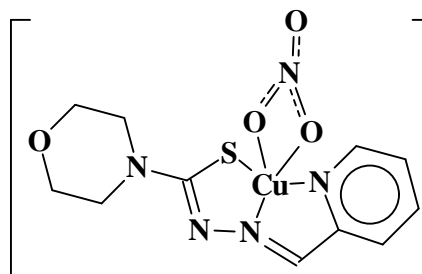
(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии, а именно к синтезу координационных соединений класса тиосемикарбазонатов переходных металлов и может найти применение в медицине для профилактики и лечения миелоидной лейкемии человека.

Сущность изобретения заключается в том, что в качестве ингибитора миелоидной лейкемии человека (клетки HL-60) предлагается нитрато-[N'-(1-пиридин-2-илметилен)морфолин-4-карботиогидразида(1-)]медь формулы:

2



Заявляемое соединение ингибирует рост и размножение 72% клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека при концентрации 10^{-7} моль/л.

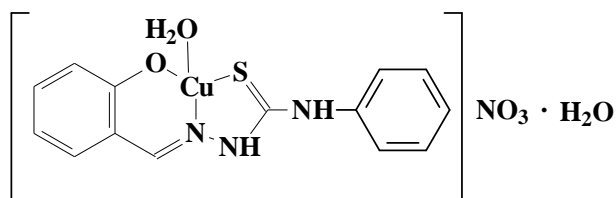
П. формулы: 2

Фиг.: 1

Descriere:

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție și poate găsi aplicare în
5 medicină la profilaxia și tratarea leucemiei umane mieloidă.

Dintre compușii coordinativi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție care inhibă leucemia umană mieloidă, descriși în literatură, cel mai înalt efect cancerostatic a fost obținut în cazul hidratului nitratului de saliciliden-4-feniltiosemicarbazido(1-)aquacupru(II) [1] cu formula :



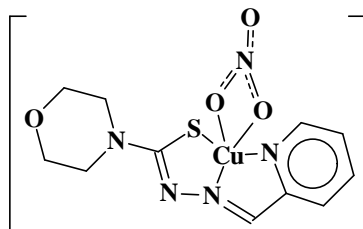
10

Complexul dat inhibă creșterea și multiplicarea a 100% de celule HL-60 ale leucemiei umane mieloidă la concentrații de 10^{-5} și 10^{-6} M.

Dezavantajul hidratului nitratului de saliciliden-4-feniltiosemicarbazido(1-)aquacupru(2+) constă în faptul că nu posedă o activitate anticancerigenă
15 suficient de înaltă și inhibă proliferarea celulelor canceroase numai la concentrația mai mare de 10^{-6} mol/L și până acum nu a găsit aplicare în medicină.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai leucemiei umane mieloidă cu activitate biologică înaltă.

20 Esența invenției constă în aceea că în calitate de inhibitor al leucemiei umane mieloidă (celule HL-60) se propune nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru cu formula:



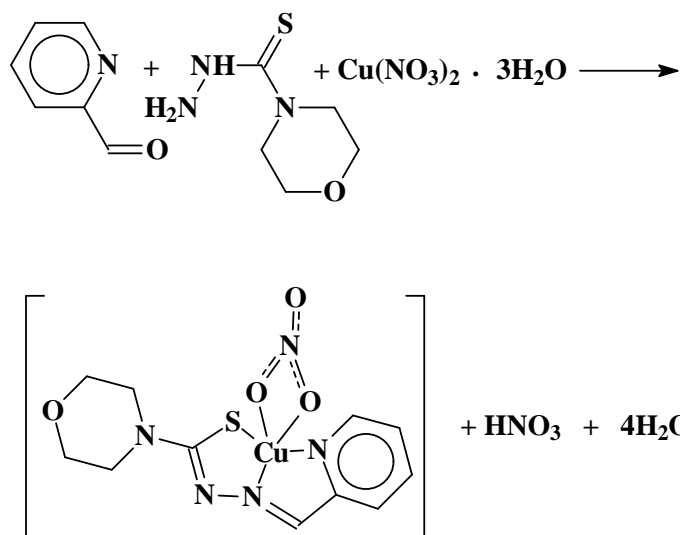
25

Compusul coordinativ dat, proprietățile lui și procedeul de obținere nu sunt descrise în stadiul tehnicii.

30 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anticancerigene, care inhibă creșterea și multiplicarea a 72% de celule HL-60 ale leucemiei umane mieloidă la o concentrație de 10^{-7} mol/L.

35 Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitor al celulelor HL-60 leucemiei umane mieloidă se propune compusul coordinativ al nitratului de cupru cu 4-morfolintiosemicarbazona 2-formilpiridinei, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți ($50 \dots 55^\circ\text{C}$) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 4-morfolintiosemicarbazona și 2-formilpiridină, luate în raport echimolar. Reacția decurge în $45 \dots 60$ min conform următoarei scheme:



5

Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul că în timpul sintezei în amestecul reactant are loc condensarea 2-formilpiridinei cu 4-morfolintiosemicarbazida și formarea 4-morfolintiosemicarbazonei 2-formilpiridinei ([N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)morfolin-4-carbotiohidrazida], care coordonează la ionul de cupru(2+) în forma tiolică monodeprotonată ca ligand tridentat-N,N,S. În afară de acest ligand în sfera internă intră și ionul nitrat.

Exemplu de obținere a nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru

4-Morfolintiosemicarbazida a fost sintetizată conform metodei descrise în literatură (Amandha Kaiser da Silva. Complexos Heterolepticos de Ouro(III) como Potenciais Antitumorais e Anti-*Trypanosoma cruzi*// Dissertacao apresentada ao Instituto de Quimica de Sao Carlos. P. 31 // Sao Carlos, 2015, url: <http://www.teses.usp.br/.../AmandhaKaiserdaSilvarevi/>).

Se amestecă 20 mL de soluție etanolică, care conține 10 mmol de 4-morfolintiosemicarbazidă și 10 mmol 2-formilpiridină cu 10 mmol de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, dizolvați în 10 mL de alcool. Amestecul reactant este încălzit la 50...55°C și amestecat în continuu cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 45...60 min. La răcire din soluție se depun cristale mici de culoare verde întunecată, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu etanol, eter și uscate în aer liber.

S-a determinat, %: C – 35,05; H – 3,31; Cu – 16,77; N - 18,50; S – 8,37. Pentru $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{CuN}_5\text{O}_4\text{S}$ s-a calculat, % : C – 35,25; H – 3,50; Cu – 16,95; N - 18,68; S – 8,55. Momentul magnetic efectiv $\mu_{\text{eff}} = 1,84$ M. B. (294K).

Procedeele de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 80% față de cel teoretic calculat. Complexul este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcoolii, bine solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.

La recristalizarea compusului revendicat din soluție etanolică au fost obținute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X (Formula empirică $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{CuN}_5\text{O}_4\text{S}$, grupa spațială P-1, parametrii celulei elementare [A]: a = 8,1655(7); b = 8,7809(7), c = 21,388(2); $\alpha = 89,140(7)^\circ$, $\beta = 80,813(7)^\circ$, $\gamma = 77,828(7)^\circ$; volumul celulei elementare 1479,58 Å³). A fost stabilită pentru complexul dat structura piramidală (vezi figura). Molecula de N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazidă din sfera internă se comportă ca un ligand tridentat coordonând la atomul central de cupru prin atomii de azot piridinic, azometinic și atomul de sulf al fragmentului tiosemicarbazidic, formând două metalocicluri din cinci atomi. Al patrulea și cincilea locuri în sfera internă este ocupat de doi atomi de oxigen ai ionului nitrat, care se comportă ca un ligand bidentat.

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

Exemplu de utilizare a nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru în calitate de inhibitor al leucemiei umane mieloide

5 Celulele leucemiei umane mieloide HL-60 obținute din Colecția Culturilor Tip American (*American Type Culture Collection, Rockville, MD*) au fost cultivate în formă de suspensie în mediul RPMI-1640 suplimentat cu 10% (V/V) ser embrionic de Sovine, 2 mM de L-glutamină, 100 UI penicilină/mL, 100 μg de streptomycină/mL și incubate în atmosferă umedă de 95% aer / 5% CO₂ la 10 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 compartimente (2 cm²/celulă) la densitatea inițială de 10⁵ celule/mL/compartiment și tratate cu soluții de diferită 15 concentrație ale compusului revendicat în apă sterilă. Fiecare procedură de tratare cu aceeași concentrație a fost efectuată în trei compartimente.

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților anticanceroase ale nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru sunt prezentate în tabel, din care se observă că la concentrația de 10⁻⁵ mol/L el 20 inhibă creșterea și multiplicarea a 97,25%, la 10⁻⁶ mol/L – 96,35%, iar la concentrația de 10⁻⁷ mol/L - 71,7% de celule HL-60 ale leucemiei umane mieloide. Datele obținute relevă faptul că acest complex de cupru, după activitatea anticancerigenă, depășește de 1,72 ori caracteristicile respective ale analogului proxim.

25 Proprietățile depistate ale nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai leucemiei umane mieloide.

Tabel

30 **Partea celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloide inhibitate, %**

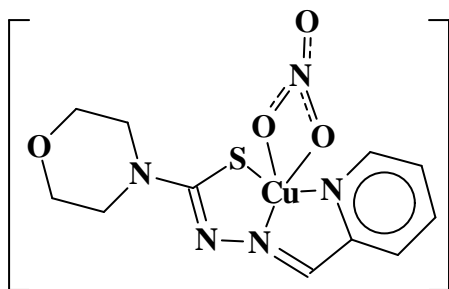
Compusul	Concentrația, mol/L		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Hidratul nitratului de saliciliden-4-feniltiosemicarbazido(1-)-aquacupru(2+) (analogul proxim)	100	100	0
Nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru	97,25	96,35	71,7

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. MD 3890 G2 2009.04.30

(57) Revendicări:

1. Nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido (1-)]cupru cu formula:



2. Compus coordinativ conform revendicării 1, în calitate de inhibitor al celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloide.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

JOVMIR Tudor

