



MD 4614 B1 2019.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4614** (13) **B1**
(51) Int.Cl: C07C 337/08 (2006.01)
C07F 3/06 (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

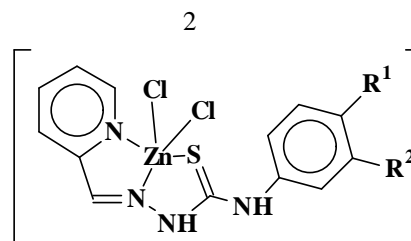
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2017 0083 (22) Data depozit: 2017.09.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.01.31, BOPI nr. 1/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; MITKEVICH Natalia, RU; ȚAPCOV Victor, MD; GUDUMAC Valentin, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamid]zinc și dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamid]zinc în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la compușii coordinațivi biologic activi din clasa tiosemicarbazidaților metalelor de tranziție și poate găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratarea leucemiei mieloide umane.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane a doi compuși coordinațivi noi: dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamid]zinc (I) și dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamid]zinc (II) cu formula generală:



(I, II),

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

Compușii revendicați extind arsenalul de inhibitori ai celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane cu activitate biologică înaltă.

Revendicări: 2

Figuri: 1

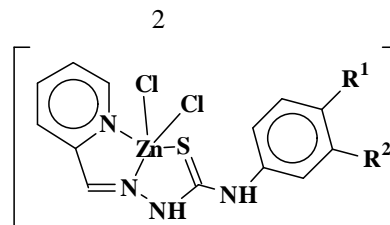
MD 4614 B1 2019.01.31

(54) Dichloro-[N-(3-methoxyphenyl)-2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazinecarbothioamide]zinc and dichloro-[N-(4-methoxyphenyl)-2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazinecarbothioamide]zinc as human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitors

(57) Abstract:

The invention relates to chemistry and medicine, namely to biologically active coordinative compounds from the class of thiosemicarbazidates 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 two new coordinative compounds are proposed as human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitors: dichloro-[N-(3-methoxyphenyl)-2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazinecarbothioamide]zinc (I) and dichloro-[N-(4-methoxyphenyl)-2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazinecarbothioamide]zinc (II) of the general Formula:



(I, II),

wherein I: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OCH}_3$; II: $R^1 = \text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$.

The proposed compounds expand the range of highly active inhibitors of human myeloid leukemia.

Claims: 2

Fig.: 1

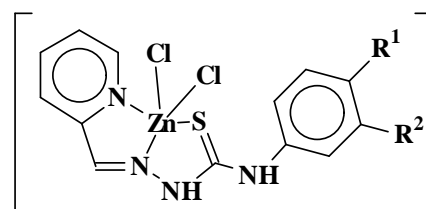
(54) Дихлоро-[N-(3-метоксифенил)-2-(пиридин-2-илметилен)-гидразинкарботиоамид]цинк и дихлоро-[N-(4-метоксифенил)-2-(пиридин-2-илметилен)-гидразинкарботиоамид]цинк в качестве ингибиторов роста и пролиферации клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека

(57) Реферат:

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активным координационным соединениям класса тиосемикарбазидатов переходных металлов и может найти применение в медицине для профилактики и лечения миелоидной лейкемии человека.

Сущность изобретения заключается в том, что в качестве ингибиторов роста и размножения клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека предлагаются два новых координационных соединения: дихлоро-[N-(3-метоксифенил)-2-(пиридин-2-илметилен)-гидразинкарботиоамид]цинк (I) и дихлоро-[N-(4-метоксифенил)-2-(пиридин-2-илметилен)-

гидразинкарботиоамид]цинк (II) общей формулы:



(I, II),

где I: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OCH}_3$; II: $R^1 = \text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$.

Предлагаемые соединения расширяют спектр высокоактивных ингибиторов миелоидной лейкемии человека.

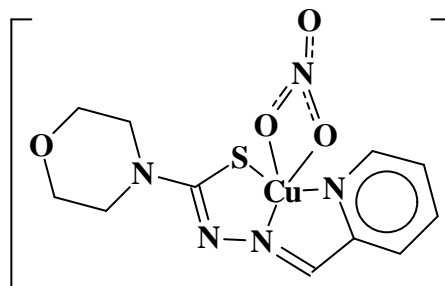
П. формулы: 2

Фиг.: 1

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

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la compușii coordinativi biologic activi din clasa tiosemicarbazidaților metalelor de tranziție și poate găsi aplicare în
medicină la profilaxia și tratarea leucemiei mieloide umane.

10 În literatură nu există date referitor la combinațiile coordinative ale zincului care manifestă activitate anticancer și prezintă interes practic. Din acest motiv, cel mai apropiat compușilor declarați după structură, esență tehnică și rezultatul obținut este nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru [1] (prototip și analog structural) cu formula:

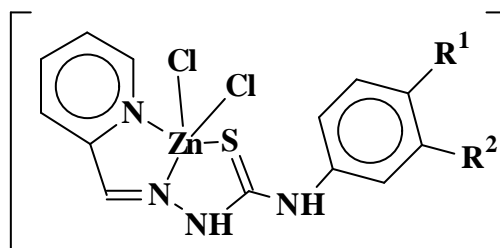


15 Compusul dat la concentrația 10^{-5} mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 97,25%, la 10^{-6} mol/L a 96,35%, iar la concentrația 10^{-7} mol/L a 71,7% de celule HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

Dezavantajul prototipului și analogului structural constă în faptul că el nu posedă o activitate anticancer suficient de înaltă, având concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50}) egală cu 0,2 $\mu\text{mol/L}$ și până acum nu a găsit o aplicare în medicină.

20 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane cu activitate citostatică înaltă.

25 Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane a dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamid]zincului și dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotioamid]zincului (corespunzător I și II) cu formula generală:



I și II

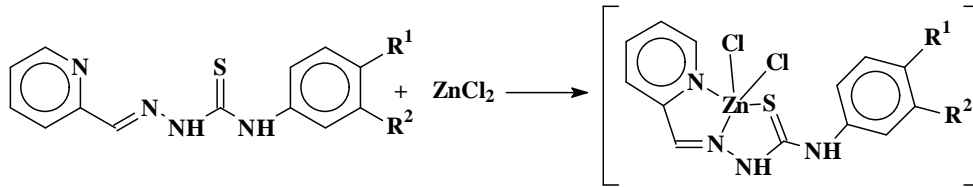
I : $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OCH}_3$; II : $R^1 = \text{OCH}_3$, $R^2 = \text{H}$.

30 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compușii revendicați I și II a activității anticancerigene, care în diapazonul concentrațiilor $10^{-5} \dots 10^{-7}$ mol/L posedă concentrația de inhibare semimaximală $IC_{50}=0,1 \mu\text{mol/L}$ și sunt de două ori mai efectivi decât prototipul și analogul structural. Proprietatea stabilită a compușilor I și II este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lor în calitate de inhibitori ai creșterii și multiplicării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

35 Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul, că pentru prima dată în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane se propun dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazin-carbotioamid]zinc și dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)hidrazin-carbotioamid]zinc, care conțin o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

40 Compușii dați, proprietățile lor și procedul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

Dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazin-carbotioamid]-zinc și dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazin-carbotioamid]-zinc revendicați se obțin conform următoarei scheme :



5

Mecanismul prezentei reacții date este legat de faptul, că în timpul sintezei în amestecul reactant are loc adiția la ionul de zinc a unei molecule de 3- sau 4-metoxifeniltiosemicarbazona a 2-formilpiridinei, care joacă rolul de liganzi-N,N,S tridentată. În rezultatul acestor procese are loc formarea complexilor I și II, în care atomul central are numărul de coordinare 5.

10

Invenția se explică cu ajutorul figurii, care reprezintă structura dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazin-carbotioamid]zincului.

15

Exemplu de obținere al dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazin-carbotioamid]zincului (compusului I).

Se amestecă 30 ml de soluție etanolică, care conține 10 mmol de 3-metoxifeniltiosemicarbazona 2-formilpiridinei cu 10 mmol de ZnCl₂, dizolvat în 10 ml de alcool. Amestecul reactant este încălzit (50...55° C) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 50-60 min. La răcire din soluție se depun 3,0 g (71%) de cristale mărunte de culoare albă gălbuie, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu etanol, eter și uscate la aer.

20

S-a determinat, %: C-39,54; H-3,12; Cl-16,57; N-13,01; S-7,37; Zn-15,20. Pentru C₁₄H₁₄Cl₂N₄OSZn s-a calculat, %: C-39,79; H-3,34; Cl- 6,78; N-13,26; S-7,59; Zn-15,47.

25

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm⁻¹: ν(C=N) = 1600, 1582; ν(C=S) + ν(C=N) = 775, 1280; ν(Zn-N) + ν(Zn-S) = 521, 480, 415.

Exemplu de obținere al dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazin-carbotioamid]zincului (compusului II).

Compusul coordinativ de culoare albă gălbuie se obține cu randamentul 73% de la cel calculat teoretic, după o metodă analogică, folosind în calitate de substanțe inițiale clorură de zinc și 4-metoxifeniltiosemicarbazona luate în raport molar 1:1.

30

S-a determinat, %: C-39,60; H-3,07; Cl-16,50; N-13,07; S-7,47; Zn-15,33. Pentru C₁₄H₁₄Cl₂N₄OSZn s-a calculat, %: C-39,79; H-3,34; Cl-16,78; N-13,26; S-7,59; Zn-15,47.

35

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm⁻¹: ν(C=N) = 1606, 1561; ν(C=S) + ν(C=N) = 774, 1279; ν(Zn-N) + ν(Zn-S) = 514, 482, 411.

Procecul de obținere a compușilor declarați I și II este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. Toți compușii sunt stabili în contact cu aerul, puțin solubili în apă și alcoolii alifatici, sunt solubili în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubili în eter.

40

La recristalizarea dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazin-carbotioamid]zincului din soluție etanolică au fost obținute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X. Măsurătorile cristalografice au fost efectuate utilizând un difractometru de tip Xcalibur E CCD Oxford-Diffraction cu monocromator de grafit înzestrat cu sursă de raze X de tip Mo-K_α. Procedeele de determinare a parametrilor celulei elementare și de integrare a datelor experimentale au fost efectuate cu ajutorul setului de programe "CrysAlis package Oxford Diffraction". Pentru structura cercetată soluția a fost determinată prin metoda directă cu ajutorul programului SHELXS-97 și fitată prin metoda patratelor minimale în cadrul programului SHELXL-97 în varianta anisotropică pentru toți atomii cu masă molară mai mare decât a atomului de hidrogen. Atomii de hidrogen au fost introduși în poziții edalizate (d_{CH} = 0.96 Å) utilizând modelul pivot cu fixarea parametrilor isotropici de deplasare la valoarea de 120% față de valorile respective ale atomilor de carbon cu care sunt legați. Formula empirică a

50

compusului investigat $C_{14}H_{14}Cl_2N_4OSZn$, grupa spațială I 2/C, parametrii celulei elementare [A]: $a = 16,1731(7)$; $b = 7,7159(4)$, $c = 27,8481(13)$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 92,129(5)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; volumul celulei elementare $3472,77 \text{ \AA}^3$. A fost stabilit (figură), că în celula elementară a acestui compus se află o moleculă de complex, care are structură piramidală pătrată distorsionată. Baza piramidei alcătuiesc atomii de azot piridinic, azometinic și atomul de sulf, care formează două metalocicluri din cinci atomi și ionul de clor cu distanțe interatomice și unghiurile de valență standarde pentru compușii din această clasă. În vârful piramidei se află al doilea atom de clor.

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

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Exemplu al utilizării dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamid]zincului și dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamid]zincului în calitate de inhibitori de proliferare a celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

Celulele leucemiei mieloide umane 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 IU penicilină/ml și 100 μg de streptomycină/ml și incubate în atmosferă umedă de 95% aer / 5% CO_2 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 compartimente ($2 \text{ cm}^2/\text{celulă}$) la densitatea inițială de $1 \cdot 10^5$ celule/ml/compartiment și tratate cu soluții de diferită concentrație ale compusului declarat în apă sterilă. Fiecare procedură de tratare cu aceeași concentrație a fost efectuată în câte trei compartimente.

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților anticanceroase ale dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamid]-zincului și dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamid]zincului sunt prezentate în Tabel, din care se observă, că la în diapazonul concentrațiilor 10^{-5} - 10^{-7}M ei inhibă creșterea și multiplicarea de la 100,0 % până la 61,9% de celule HL-60 ale leucemiei mieloide umane și ambii compuși au IC_{50} egal cu 0,1 $\mu\text{mol/L}$. Datele obținute indică, că acești compuși după activitatea anticancerigenă sunt de două ori mai efectivi decât prototipul și analogul lor structural.

Proprietățile depistate ale dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamid]-zincului și dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamid]zincului prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai leucemiei mieloide umane.

Tabel

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

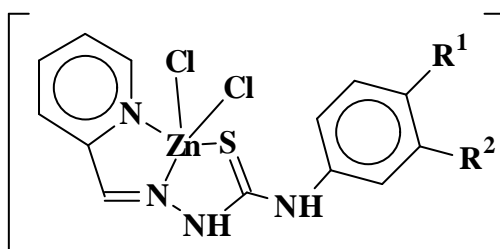
Compusul	Concentrație, mol/L			IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
Nitrato-[N-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotohidrazido(1-)]cupru (prototipul și analogul structural [1])	97,25	96,35	71,7	0,2
Dicloro-[N-(3-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamid]zinc	100,0	100,0	67,2	0,1
Dicloro-[N-(4-metoxifenil)-2-(piridin-2-ilmetilen)-hidrazincarbotoamid]zinc	100,0	96,7	61,9	0,1

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 4393 B1 2016.01.31

(57) Revendicări:

1. Compuși coordinativi cu formula generală:



(I, II),

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

2. Compuși, conform revendicării 1, pentru utilizare în calitate de inhibitori ai proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

