



MD 4581 B1 2018.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4581** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07C 337/08* (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

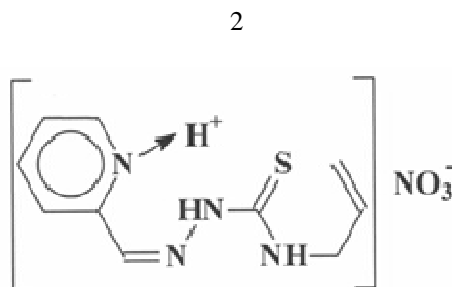
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2017 0084 (22) Data depozit: 2017.10.06	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.07.31, BOPI nr. 7/2018
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; GRAUR Vasilii, MD; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Compus nitrat de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil)hidrazino]metil]piridiniu cu proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa tiosemicarbazidelor și poate fi utilizată pentru profilaxia și tratamentul leucemiei mieloide umane.

Conform invenției se revendică compusul nitrat de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil)hidrazino]metil] piridiniu cu formula:



care manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

Revendicări: 2

Figuri: 1

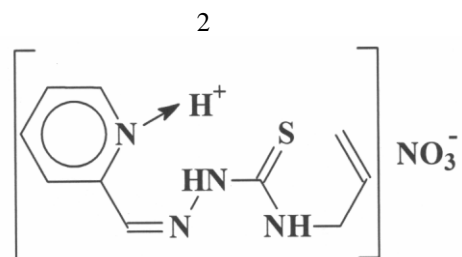
MD 4581 B1 2018.07.31

(54) 2-[[Prop-2-en-1-ylcarbamothioyl]hydrazino]methyl} pyridinium nitrate compound having human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitor properties

(57) Abstract:

The invention relates to chemistry and medicine, in particular to a biologically active organic compound of the thiosemicarbazide class and can be used for preventing and treating human myeloid leukemia.

According to the invention, claimed is 2-[[prop-2-en-1-ylcarbamothioyl]hydrazino]methyl} pyridinium nitrate compound of formula:



which has human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitor properties.

Claims: 2

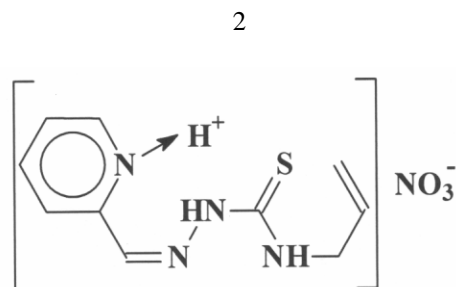
Fig.: 1

(54) Соединение нитрат 2-{{(проп-2-ен-1-илкарбамотиоил)гидразино}метил}пиридиния обладающее свойствами ингибитора пролиферации клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека

(57) Реферат:

Изобретение относится к химии и медицине, в частности к биологически активному органическому соединению класса тиосемикарбазидов и может быть использовано для профилактики и лечения миелоидной лейкемии человека.

Согласно изобретению заявляется соединение нитрат 2-{{(проп-2-ен-1-илкарбамотиоил)гидразино}метил} пиридиния формулы:



которое обладает свойствами ингибитора пролиферации клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека.

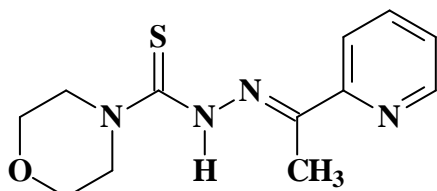
П. формулы: 2

Фиг.: 1

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

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa tiosemicarbazidelor și poate fi aplicat pentru profilaxia și tratamentul leucemiei umane mieloide.

Din toți compușii organici, care conțin în componența sa fragmentul tiosemicarbazidic și care inhibă creșterea și multiplicarea celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloide, cel mai înalt efect canceristic a fost obținut în cazul N'-[1-(2-
10 piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei (prototipul) cu formula:

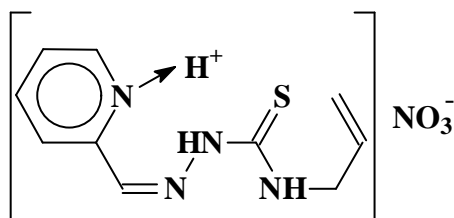


Compusul dat la concentrația 10^{-5} mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 94,2%, la 10^{-6} mol/L – 82,85%, iar la concentrația 10^{-7} mol/L - 77,1% de celule HL-60 ale leucemiei umane mieloide [1].

15 Dezavantajul compusului cunoscut constă în faptul, că el nu posedă o activitate anticancerigenă suficient de înaltă, având concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50}) egală cu 0,2 μ mol/L și până acum nu a găsit o aplicare în medicină.

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

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloide a nitratului de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil]hidrazino]metil]piridinium cu formula :

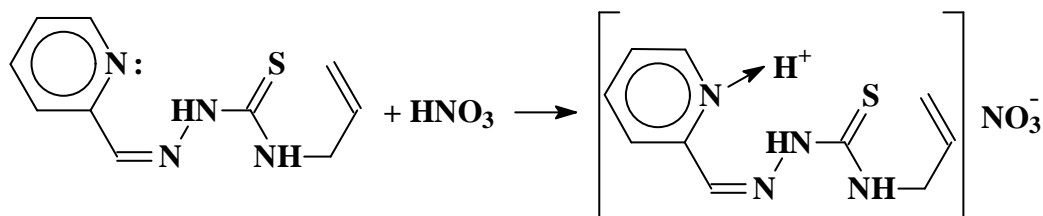


25 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anticancerigene, care are concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50}) egală cu 0,1 μ mol/L și este de două ori mai efektiv decât cea mai apropiată soluție. Proprietatea stabilită a nitratului de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil]hidrazino]metil]piridinium este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al creșterii și multiplicării celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloide.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul, că pentru prima dată în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloide se propune nitratul de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil]hidrazino]metil]-piridinium, care
30 conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

35 Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

Nitratul de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil]hidrazino]metil]piridinium revendicat se obține conform următoarei scheme :



Sinteza (N-(prop-2-en-1-il)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbotoioami-dului (4-alitiosemicarbazonei 2-formilpiridinei) inițial a fost efectuată după metodele standarde descrise în literatură (Pretsch E., Clerc Th., Seibl J., Simon W. Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989. 416 p). Puritatea compusului revendicat a fost confirmată cromatografic, prin analiza elementală și spectrală (^1H și ^{13}C -RMN și IR).

Exemplu de obținere al nitratului de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil]hidrazino]metil}piridinium.

La suspensia obținută din 1,1 g (5 mmol) 4-alitiosemicarbazonei 2-formilpiridinei și 10,0 ml etanol se adaugă 0,35mL soluție de acid azotic concentrat (5mmol) ($\omega = 64\%$, $\rho = 1,39 \text{ g/cm}^3$). Are loc dizolvarea completă a azometinei inițiale și se obține o soluție transparentă, la evaporarea careia se obțin 1,27 g (91%) de produs final. El se filtrează, se spală pe filtru cu o cantitate mică de etanol și se usucă în aer. Compoziția substanței a fost stabilită în baza rezultatelor analizei elementelor.

Determinat, % : C - 42,19; H - 4,37; N - 24,50; S - 11,09. Calculat pentru compusul $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$, % : C - 42,40; H - 4,63; N - 24,72; S - 11,32.

^1H RMN (DMSO- d_6 , δ (ppm)): 12,30 (br, 1H, NH); 9,17 (br, 1H, NH); 8,83 (d, 1H, CH aromatic); 8,46 (m, 2H, CH aromatic); 8,16 (s, 1H, CH=N); 7,86 (d, 1H, CH aromatic); 5,93 (m, 1H, CH alilic); 5,17 (dd, 2H, $\text{CH}_2=\text{C}$); 4,28 (m, 2H, CH_2-N).

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , δ (ppm)): 178,28 (C=S); 148,53; 134,54; 126,27; 124,90; 124,84 (C aromatic); 144.44 (C=N - azometinic); 134,82 (CH alilic); 116,50 ($\text{CH}_2=$); 46,42 (CH_2-N).

Datele spectrelor RMN corespund cu datele din literatura specializată [2] pentru compuși cu atomul de azot piridinic protonat.

Datele IR (cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3240, 3131, 3091; $\nu(\text{C=N})$ 1622, 1616; $\nu(\text{NO}_3^-)$ 1409, 820, 697; $\nu(\text{C=S})$ 1314.

$$\mu_{1000}^{20} (\text{H}_2\text{O}) = 96 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}.$$

$$P. t. = 190 \dots 192^\circ\text{C}$$

Procedeele de obținere al compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile (Zeglis B. M., Davilov V., Lewis J. Role of Metalation in the topoisomerase-II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic- N^4 -substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. J. Med. Chem., 2011, Vol. 54, p. 2391-2398. dx.doi.org/10.1021/jm101532u). Nitratul de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil]hidrazino]metil}piridinium este stabil în contact cu aerul, bine solubil în apă, alcoolii, dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă.

La recristalizarea nitratului de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil]hidrazino]metil}piridinium din soluție etanolică au fost obținute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu razele X. Măsurările 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- $K\alpha$. 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 idealizate ($d_{\text{CH}} = 0.96 \text{ \AA}$) utilizând modelul pivot cu fixarea parametrilor isotropici de deplasare la valoare de 120% față de valorile respective ale atomilor de carbon cu care sunt legați. Formula empirică a compusului investigat $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$, grupa spațială $P 2_1/C$, parametrii celulei elementare [A] : $a = 5,1190(5)$; $b = 16,353(2)$, $c = 15,968(2)$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90,081(9)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; volumul celulei elementare $1336,66 \text{ \AA}^3$. A fost stabilit (fig.), că în celula elementară a acestui compus se află o moleculă de azometină, care are structură practic planară, cu excepția fragmentului alilic. Distanțele interatomice și unghiurile de valență în molecula investigată se află în limitele standarde, caracteristice pentru compuși din această clasă. Fragmentul tiosemicarbazidic în componența moleculei se află în formă tionică [$d(\text{C=S})$ 1,664 Å]. În sfera exterioară a compusului se află un nitrat-ion, legat cu intermediul legăturilor de hidrogen.

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

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Exemplu al utilizării nitratului de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil)-hidrazino]metil]piridinium în calitate de inhibitor 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, 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 streptomicină/ml și incubate în atmosferă umedă de 95% aer/5% CO₂ la temperatura de 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 x 10⁵ celule/ml/compartiment și tratate cu soluții de diferită concentrație ale compusului revendicat 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 nitratului de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil)hidrazino]metil]piridinium sunt prezentate în tabel, din care se observă, că la concentrația 10⁻⁵ M el inhibă creșterea și multiplicarea a 97,0 %, la 10⁻⁶ M –95,1%, iar la concentrația 10⁻⁷ M - 84,2% de celule HL-60 ale leucemiei umane mieloide și are IC₅₀ egal cu 0,1 μmol/L. În tabel sunt prezentate și datele experimentale care caracterizează (N-(prop-2-en-1-il)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazincarbotoamida - precursorul compusului revendicat ((Pretsch E., Clerc Th., Seibl J., Simon W. Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1989. 416 p). Compusul, de asemenea, manifestă proprietăți antiproliferative la concentrații 10⁻⁵ și 10⁻⁶ mol/L. Dar la concentrația 10⁻⁷ mol/L acest compus inhibă creșterea și multiplicarea numai 1,8 % de celule HL-60 ale leucemiei umane mieloide și are IC₅₀ = 0,38 μmol/L (de 1,9 ori mai puțin activ decât soluția cea mai apropiată). Se poate de presupus, că nitratul de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil)-hidrazino]metil]piridinium fiind mai solubil decât precursorul, mai ușor ajunge la celulele canceroase și inhibă mai bine multiplicarea lor. Datele experimentale obținute indică, că acest compus, după activitatea anticancerigenă este de două ori mai efectiv decât prototipul și de 3,8 ori mai activ decât compusul din care a fost obținut.

Proprietățile depistate ale nitratului de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil)-hidrazino]metil]piridinium prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai leucemiei umane mieloide.

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

Tabel

40

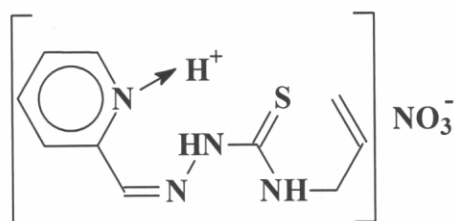
Compusul	Concentrație, mol/L			IC ₅₀ , μmol/L
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazida	94,2	82,85	77,1	0,2
(N-(prop-2-en-1-il)-2-(piridin-2-ilmetiliden)hidrazin-carbotioamidă	100,0	100,0	1,8	0,38
Nitratul de 2-[[prop-2-en-1-ilcarbamotioil)-hidrazino]metil]piridinium	97,0	95,1	84,2	0,1

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 4434 B1 2016.09.30

(57) Revendicări:

1. Compus nitrat de 2-[[[(prop-2-en-1-ilcarbamotioil)hidrazino]metil]piridiniu cu formula:



2. Compus, conform revendicării 1, care manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

