



MD 4434 C1 2017.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4434** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 31/4433* (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

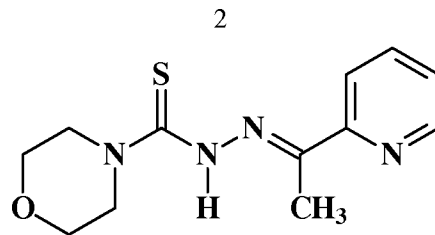
(21) Nr. depozit: a 2015 0097 (22) Data depozit: 2015.10.09	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.09.30, BOPI nr. 9/2016
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: PAHOLNIȚCAIA Anastasia, MD; POIRIER Donald, CA; ȚAPCOV Victor, MD; GULEA Aurelian, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Utilizarea N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei in calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea unui compus organic din clasa tiosemicarbazonelor in calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane și poate găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratarea leucozelor.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane a N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei cu formula:



Compusul dat posedă o activitate citostatică semnificativă, inclusiv la concentrații de 10^{-7} mol/L, față de celulele HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

Revendicări: 1

MD 4434 C1 2017.04.30

(54) Use of N'-[1-(2-pyridyl)ethylidene]morpholin-4-carbothiohydrazide as a human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitor

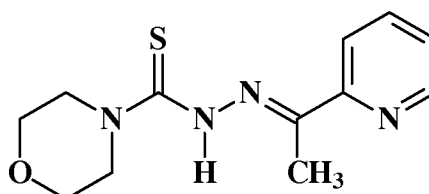
(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and medicine, namely to the use of an organic compound from the class of thiosemicarbazones as a human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitor and can be used in medicine in the prevention and treatment of leukoses.

Summary of the invention consists in the use as a human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitor of N'-[1-(2-pyridyl)ethylidene]morpholin-4-carbothiohydrazide of formula:

2



This compound has a significant cytostatic activity, inclusively at a concentration of 10^{-7} mol/L, with respect to human myeloid leukemia HL-60 cells.

Claims: 1

(54) Использование N'-[1-(2-пиридил)этилиден]морфолин-4-карботиогидразида в качестве ингибитора пролиферации клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека

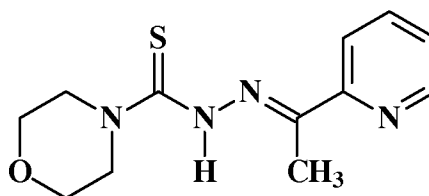
(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к применению органического соединения класса тиосемикарбазонов в качестве ингибитора пролиферации клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека и может найти применение в медицине при профилактике и лечении лейкозов.

Сущность изобретения заключается в применении в качестве ингибитора пролиферации клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека N'-[1-(2-пиридил)этилиден]морфолин-4-карботиогидразида формулы:

2



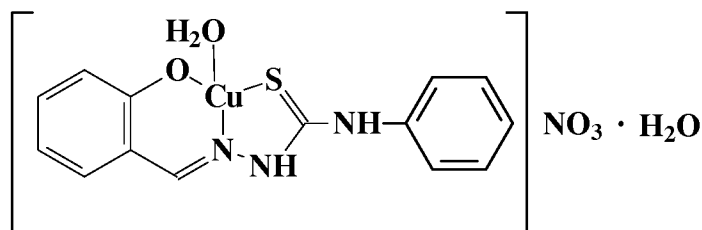
Данное соединение обладает существенной цитостатической активностью, включительно при концентрации 10^{-7} моль/л, по отношению к клеткам HL-60 миелоидной лейкемии человека.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea unui compus organic din clasa tiosemicarbazonelor în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloidă umane și poate găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratarea leucozelor.

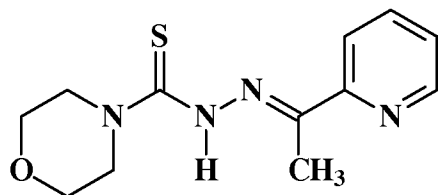
Din compușii chimici, care conțin în componența sa fragmentul tiosemicarbazidic, care inhibă leucemia mieloidă umană, descriși în literatură, cel mai înalt efect cancerostatic a fost obținut în cazul hidratului nitrat de saliciliden-4-feniltiosemicarbazido(1-)aqua cupru(2+) [1] cu formula:



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

Dezavantajul hidratului nitrat de saliciliden-4-feniltiosemicarbazido(1-)aqua cupru(2+) constă în faptul că el nu posedă o activitate anticanceră suficient de înaltă și nu inhibă proliferarea celulelor canceroase la o concentrație mai mică de 10^{-6} mol/L.

Este cunoscut compusul organic N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazida cu formula:



Procedul de sinteză a lui și proprietățile fizico-chimice sunt descrise în literatura științifică [2]. Totodată a fost stabilit că acest compus manifestă proprietăți antimicrobiene, dar din cauza activității joase nu a găsit deocamdată aplicare în medicină.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloidă umane cu activitate citostatică înaltă, inclusiv la concentrații de 10^{-7} mol/L.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloidă umane a N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei.

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul dat a unei activități citostatice semnificative la concentrații de 10^{-7} mol/L față de celulele HL-60 ale leucemiei mieloidă umane.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloidă umane se propune un compus organic, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Exemplu de utilizare a N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei în calitate de inhibitor al leucemiei mieloidă umane

Celulele leucemiei mieloidă umane HL-60 obținute din Colecția Americană a Culturilor Tip (*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 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 compartimente (2 cm²/celulă) la densitatea inițială de 1·10⁵ celule/mL/compartiment și tratate cu soluții de diferită concentrație ale compusului revendicat în apă sterilă. Fiecare procedură de

5

tratate cu aceeași concentrație a fost efectuată în câte trei compartimente. Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților anticanceroase ale N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei sunt prezentate în tabel, din care se observă că la o concentrație de 10⁻⁵ mol/L se inhibă creșterea și multiplicarea a 94,2%, la 10⁻⁶ mol/L – 82,85%, iar la o concentrație de 10⁻⁷ mol/L - 77,1% de celule HL-60 ale

10

leucemiei mieloide umane. Datele obținute indică faptul că acest compus organic posedă o activitate anticanceroasă semnificativă la concentrația de 10⁻⁷ mol/L, spre

deosebire de analogul proximal, care este inactiv la această concentrație.

Proprietățile depistate ale N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de

15

inhibitori ai leucemiei mieloide umane.

Tabel

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

Compusul	Concentrație, mol/L		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Hidratul nitrat de saliciliden-4-feniltiosemicarbazido(1-)aqua-cupru(2+) (analogul proximal)	100	100	0
N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidă	94,2	82,85	77,1

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. MD 3890 B1 2009.04.30
2. Kasuga N.C., Onodera K., Nakano S., Hazashi K., Nomiya K. Synthesis, crystal structures and antimicrobial activities of 6-coordinate antimony(III) complexes with tridentate 2-acetylpyridine thiosemicarbazone, bis(thiosemicarbazone) and semicarbazone ligands. J. Inorg. Biochem. 2006 July, **100**, p. 1176-1186 DOI: 10.1016/j.inorbio.2006.01.037

(57) Revendicări:

Utilizare a N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

Șef adjunct Direcție Brevete:

IUSTIN Viorel

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

JOVMIR Tudor

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2015 0097 (32) Data de prioritate recunoscută: **N/A**
 (22) Data depozit: 2015.10.09 Raport de documentare internațională: **Nu**
 (71) Solicitant: **UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD**
 (54) **Titlul: Utilizarea N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotiohidrazidei in calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** **A61K 31/4433** (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern «Documentare Invenții» (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

Full-text/Descriere: morfolin AND thiosemicarbaz ; piridil etiliden ;
 piridiletiliden ; piridin 2 etiliden ; HL-60 ;

"Worldwide", inclusiv fulltext (Espacenet): hapmotsc ; hapmtsc ; morfoline ; "morpholine 4 carbothioamide" ; morpholine AND thiosemicarbaz* ; "morpholine N thiohidrazide" ; "morpholine N thiohidrazone" ; "4 carbothiohidrazide" ; "morpholine 4" AND "acetylpyridine" ; "2 acylpyridine thiosemicarbazone" thiosemicarbaz* AND (acetylpyridine OR ("acetyl pyridine")) ; "4 morpholyl 3 thiosemicarbazone" ; "4 morpholine 3 thiosemicarbazone" morpholylthiosemicarbazone ; "morpholyl thiosemicarbazone" ; "ring incorporated thiosemicarbazones" ; "heteroaryl thiosemicarbazones" ; "N heterocyclic thiosemicarbazones" ; "morpholine 4" AND "HL 60" ; "HL 60" ; hl60 ; (cancer OR anticancer) ; (tumor OR antitumor*) ; leukem* OR antileukem* ; leukaem* OR antileukaem* ; (proliferat* OR antiproliferat*) ;

Alte BD – **PATENTSCOPE** EN_CL: (acetylpyridine thiosemicarbazone) ;
 EN_CL: (pyridine-2-ylethylidene thiosemicarbazone) ;
 EN_CL: (pyridylethylidene) ; EN_CL: ((2-pyridyl)ethylidene) ;
 EN_CL: (pyridine-2 carbothiohidrazide)
 EN_CL: (morpholyl thiosemicarbazone) ; EN_CL: (morpholine thiosemicarbazone) ;
 EN_CL: (thiosemicarbazone leukemia) ; EN_CL: (thiosemicarbazone antiproliferat*) ;

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

Google ; Google Scholar : thiosemicarbazone* AND morpholin* ;
 "morpholine N thiocarbohidrazone" ; "morpholine thiocarbohidrazide" ;
 «morpholine-4-carbothiohidrazide» AND (cancer OR «HL-60») ;
 «morpholine-4» AND acetylpyridine ; Kalinowski AND thiosemicarbazones AND morpholin* ;
 antitumor AND morpholine AND thiosemicarbazone AND acetylpyridine ;
PubChem: Hapmotsc (PubChem **CID 5488565**) ;
PubMed: MeSH unique ID: C524577 ;

Europe PMC: leukemia AND thiosemicarbazones ; HL AND thiosemicarbazones ;
NIGMA.RU: acetylpyridine AND thiosemicarbazone AND morpholine AND tumor ;

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	MD 3890 B1 2009.04.30	1
A, C	MD 2011 0040 A1 2012-11-30 Descrierea, tabelul 3.	1
A	MD 4215 C1 2013.04.30 documentul integral	1
A, E	MD 4393 B1 2016.01.31 documentul integral	1
A, E	MD 4407 B1 2016-03-31 Descrierea	1
A	WO85/00955 A1 1985-03-14 Description, pag. 13, compound nr. 28;	1
A	US 2003166658 A1 2003-09-04 Description: pag. 1, paragraphs /0005/ - /0007/; pag. 4, TABLE 1, compounds 1a-4,5,6; pag. 7, TABLE 3	
A	US 5281715 A 1994-01-25 Description, columns 17-19, examples LIII-LIX	1
A	US 5721259 A 1998-02-24 Description, columns 17-18, Examples LIII-LIX; Claims 1-10	1
A	US 4596798 A 1986.06.24 Description: col.6, row 63 "(5) morfolino..."	1
A	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, Data publicare: 2015-05-22, regasit la 2016.07.18, url: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-20052015-154103/publico/AmandhaKaiserdaSilvarevisado.pdf pag. 31	1
A	ARORA Sh., AGARVAL Sh., SINGHAL Sh. Anticancer activities of thiosemicarbazides/thiosemicarbazones: a Review. Int. J. Pharmacy and Pharmaceutical sciences, vol. 6, Issue 9, 2014. Regăsit în Internet la 2016.07.21, url: http://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/1837 pag.1-2	1
A	D.KOVALA-DEMERTZI et al. In vitro and in vivo antitumor activity of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones derived from 2-formyl and 2-acetyl pyridine and containing ring incorporated at N(4)-position: synthesis, spectroscopical study and crystal structure of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones, potential anticancer agents. Eur. J. Med. Chem., v. 44, p. 1296-1302, 2009. Regăsit în Internet la 2016.07.20, url: https://www.researchgate.net/profile/Alexandros_Alexandr	1

	<p>atos2/publication/230792819 <u>In vitro and in vivo antitumor activity of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones derived from 2-formyl and 2-acetyl pyridine and containing ring incorporated at N(4) position</u> <u>Synthesis spectroscopic study and crystal structure of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones potential anticancer agents/links/0912f504724d66065a000000.pdf</u> pag.1299, Table 4, compound (2).</p>	
A	<p>Serda M. et al. (2014) Exploring the Anti-Cancer Activity of Novel Thiosemicarbazones Generated through the Combination of Retro-Fragments: Dissection of Critical Structure-Activity Relationships. PLOS ONE 9(10): e110291. doi: 10.1371/journal.pone.0110291. Published October 16, 2014. Regăsit în Internet la 2016.07.18 url: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110291 page 6 Figure5, chelator 1c; pag. 7 Table 1, chelator 1c</p>	1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția	
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet	
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție	
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete	
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri	
Data finalizării documentării 2016.07.25		
Examinator JOVMIR Tudor		