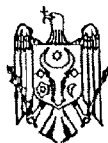




MD 4393 C1 2016.08.31

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

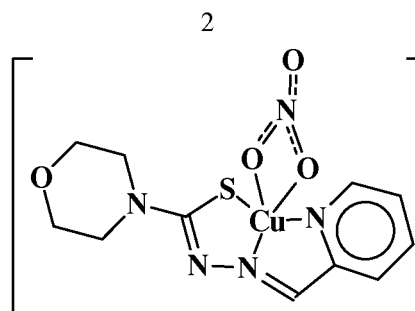
(21) Nr. depozit: a 2015 0083 (22) Data depozit: 2015.09.04	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.01.31, BOPI nr. 1/2016
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; PAHOLNIȚAIA Anastasia, MD; POIRIER Donald, CA; ȚAPCOV Victor, MD (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 nitrato-[N'-(1-pyridine-2-ylmethylidene)-morpholine-4-carbothiohydrazido(1-)]copper

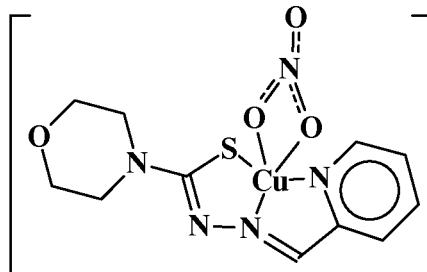
(57) Abstract:

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 nitrato-[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

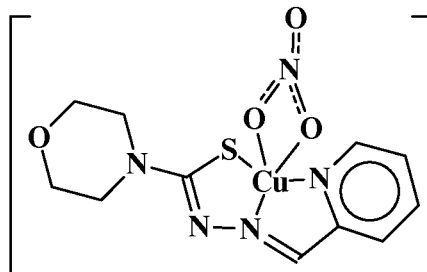
(57) Реферат:

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.

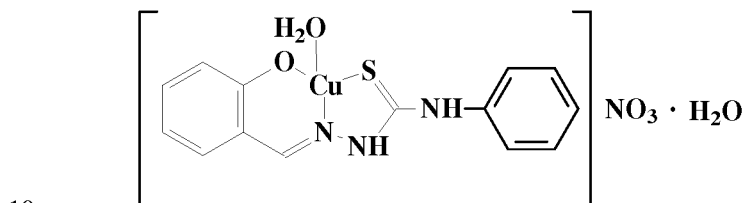
П. формулы: 2

Фиг.: 1

Descriere:

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

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-)aquaocupru(II) [1] cu formula :

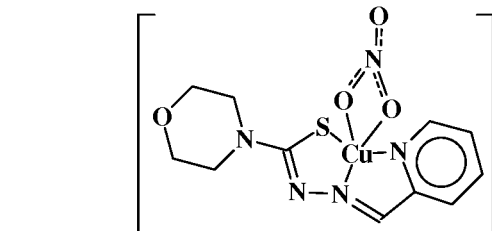


Complexul dat inhibă creșterea și multiplicarea a 100% de celule HL-60 ale
 leucemiei umane mieloide la concentrații de 10^{-5} și 10^{-6} M.

Dezavantajul hidratului nitratului de saliciliden-4-feniltiosemicarbazido(1-)-
 15 aquaocupru(2+) constă în faptul că nu posedă o activitate anticancerigenă
 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 mieloide cu activitate biologică înaltă.

20 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:

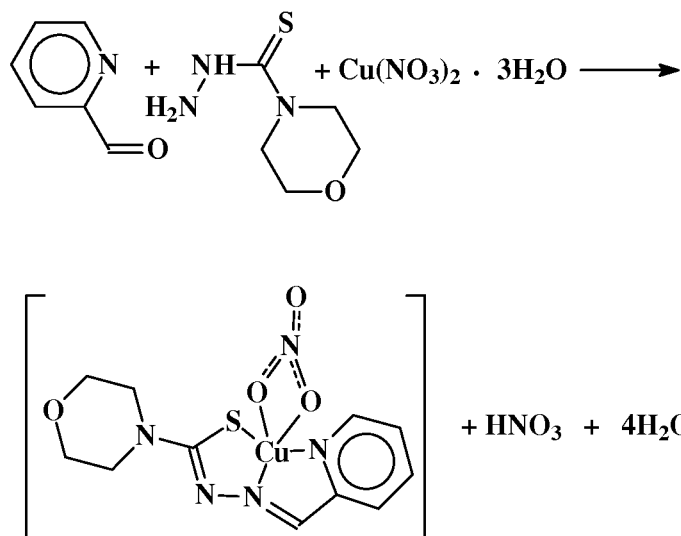


Compusul coordinativ dat, proprietățile lui și procedeul de obținere nu sunt
 descrise în stadiul tehnicii.

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 mieloide 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 mieloide 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 ($50...55^{\circ}\text{C}$) 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 $45...60$ 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 monodeprotonizată 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*/ Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos. P. 31 // São 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 $\text{Cu(NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 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).

Procedul 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 coordinând 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 studiarea 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, %**

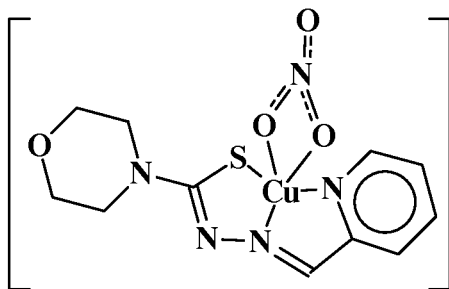
Compusul	Concentrația, mol/L		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Hidratul nitratului de saliciliden-4-feniltiosemicarbazido(1-)-aquacupru(2+) (analogul proxim)	100	100	0
Nitrato-[N'-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru	97,25	96,35	71,7

(56) Referințe bibliografice citate în 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:

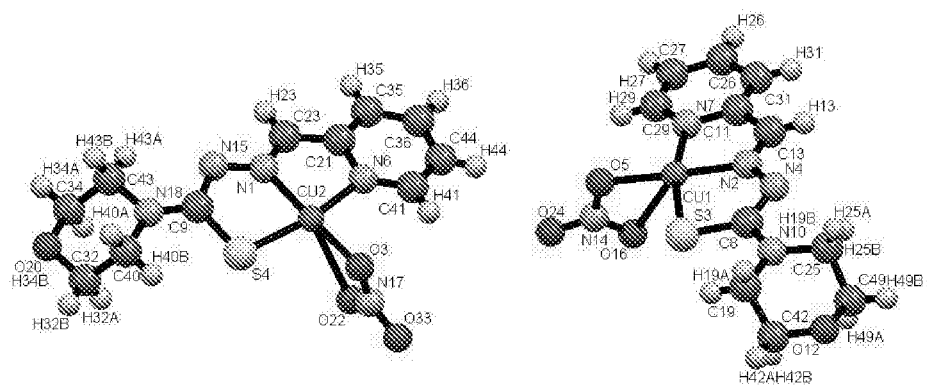
GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

JOVMIR Tudor



RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2015 0083 (32) Data de prioritate recunoscută: n/a
 (22) Data depozit: 2015.09.04 Raport de documentare internațională: Nu
 (71) Solicitant: **UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD**
 (54) **Titlul: Inhibitor al celulelor HL-60 ale leucemiei umane mieloidale in baza nitrato-[N`-(1-piridin-2-ilmetiliden)-morfolin-4-carbotiohidrazido(1-)]cupru**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** **C07D 405/12** (2006.01) **A61K 31/30** (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01) **A61K 31/175** (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01) **A61P 35/02** (2006.01)
C07C 47/56 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni(concepte) caracteristici, ecuații de căutare reprezentative; dacă nu este specificat – cuvintele-cheie/concepte sunt pentru rezumate+titluri, iar simbolurile de clasificare pentru CIB)

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

Titlu/rezumat: carbotiohidraz ; tiosemicarbaz ; leucem ;
 Full-text/descriere: (tiosemicarbaz AND cupru) ; (tiosemicarbaz AND leucem) ;

"Worldwide" (Espacenet): «HL 60» AND C07F1/08 ; «HL 60» AND (copper OR Cu OR metal) ;
 «HL 60» AND (thiosemicarbaz* OR carbothiohydraz* OR formylpyridine*) ;
 «HL 60» AND morpholin* ; thiosemicarbaz* AND (copper OR Cu) AND A61P35 ;
 thiosemicarbaz* AND (antitumo* OR leukem* OR anticancer OR antiproliferat*) ;
 thiosemicarbaz* AND formylpyridin* ;
 thiosemicarbaz* AND C07D405/12 ; (copper OR Cu OR complexes) AND C07D404/12 ;
 «N heterocyclic thiosemicarbazones» ;

EA, CIS (Eapatis): морфолинотисемикарбаз* ; формилпиридин* ; «HL 60» ;
 ((медь\AB AND лейкеми*\AB)) ; ((тиосемикарбаз*\AB) AND (лейкеми*\AB)) ;
 ((тиосемикарбаз*\AB) AND (противорак *\AB)) ;

Alte BD –

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

Google ; Google Prior Art Finder: «HL-60» ; morpholino+thiosemicarbazon*+ formylpyridine*+copper+anti* ;

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 3098 G2 2006.07.31 documentul integral	1, 2
A	MD 3655 G2 2008.07.31 documentul integral	1, 2
A, D	MD 3890 G2 2009.04.30 documentul integral	1, 2
A	MD 4190 C1 2012.12.31 documentul integral	1, 2
A	MD 4215 C1 2013.04.30 documentul integral	1, 2
A	MD 2011 0040 A1 2012.11.30 documentul integral	1, 2
A	US 5281715 A 1994-01-25 Description, columns 17-19, examples LIII-LIX	1, 2
A	US 5721259 A 1998-02-24 Description, columns 17-18, Examples LIII-LIX; Claims 1-10	1,2
A	GB1448295 A 1976-09-02 documentul integral	1,2
A	WO85/00955 A1 1985-03-14 Description, pag. 13, compound nr. 28, pag. 22, table IV, complexes No. 305; Claims 1	1
A	GB 1084700 A 1987-09-27 Description, pag. 4, bottomline thiosemicarbazone; pag. 6, Example 4; Claims 5	1
A	Felix Bacher et al. and Vladimir B. Arion. Strong effect of copper(II) coordination on antiproliferative activity of thiosemicarbazone-piperazine and thiosemicarbazone-morpholine hybrids. Dalton Trans., 2015, 44, 9071. Regăsit in Internet la 30.11.2015, url: http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2015/dt/c5dt01076d?page=search	1,2
A	Giorgio Pelosi. Thiosemicarbazone Metal Complexes: From Structure to Activity. The Open Crystallography Journal, 2010, 3 , 16-28. Ultima accesare la 2015.11.30, url: http://benthamopen.com/contents/pdf/TOCRYJ/TOCRYJ-3-16.pdf Chapter 2.1 Antitumor activity	1, 2
A, C	Chumakov, Yu. M.; Tsapkov, V.I.; Jeanneau, E.; Bairac, N.N.; Bocelli, G.; Poirier, D.; Roy, J.; Gulea, A.P. Crystal structures of copper(II) chloride, copper(II) nitrate complexes with pyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. Crystallography Reports, Vol. 53, Issue 5, pp. 786-792. Regăsit in Internet la 2015.11.28, url:	1, 2

	http://adsabs.harvard.edu/abs/2008CryRp..53..786C DOI: 10.1134/S1063774508050106 Abstract	
A	V.Graur, S. Savcin, V. Tsapkov, A Gulea. SYNTHESIS AND TUMOR ACTIVITY OF COPPER, NICKEL AND COBALT COORDINATION COMPOUNDS WITH 1-(2-HYDROXYPHENYL)ETHANONE N(4)-ALLYL-3-THIOSEMICARBAZONE. STUDIA UNIVERSITATIS MOLDAVIAE, 2015, nr.1(81). Seria "Stiinte reale si ale naturii", p.21--215 ISSN online 1857-498X (disponibil online 2015.08.22). Regăsit in Internet la 2015.12.08, url: http://oaji.net/articles/2015/2052-1438271355.pdf articolul integral	1, 2
A	V. Graur, E. Zariciuc, V. Tsapkov, A. Gulea. SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NICKEL AND COPPER COORDINATION COMPOUNDS OF 5-NITROFURAN-2-CARBALDEHYDE N(4)-ALLYL-3-THIOSEMICARBAZONE. STUDIA UNIVERSITATIS MOLDAVIAE, 2014, nr.6(76). Seria "Stiinte reale si ale naturii", p.119--123 ISSN online 1857-498X (publicat online 2014.12.23). Regăsit în Internet la 2015.12.08, url: http://studiamsu.eu/wp-content/uploads/19.-p.119-123-Chimie.pdf pag. 122, Table 3	1, 2

*** 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 2015.11.30

Examinator JOVMIR Tudor