



MD 4190 B1 2012.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4190** (13) **B1**

(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 49/78 (2006.01)
C07C 49/807 (2006.01)
C07C 49/92 (2006.01)
C07C 333/22 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/055 (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07C 45/77 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2011 0065 (22) Data depozit: 2011.06.16	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2012.12.31, BOPI nr. 12/2012
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; BÎRSĂ Mihail, RO; GÎNJU Dumitru, RO; JALBĂ Angela, MD; GRAUR Vasile, MD; JULEA Felicia, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Inhibitor al leucemiei mieloidă umane în bază de {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru}

(57) Rezumat:

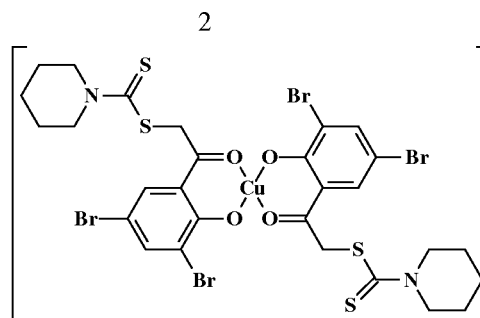
1

Invenția se referă la chimie, și anume la sinteza compușilor coordinativi din clasa o-acetilfenolaților metalelor de tranziție și poate găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratamentul leucemiei mieloidă umane.

Esența invenției constă în aceea că în calitate de inhibitor al leucemiei mieloidă umane (celule HL-60) se propune un compus nou {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru} cu formula:

5

10



Compusul revendicat se manifestă ca un inhibitor efectiv al leucemiei mieloidă umane comparativ cu tiosemicarbazonații de cupru, în special, în intervalul de concentrații 10^{-6} ... 10^{-7} mol/L.

Revendicări: 2

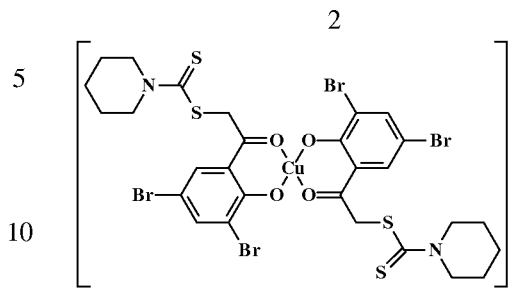
MD 4190 B1 2012.12.31

(54) Inhibitor of human myeloid leukemia based on {bis[2-(3,5-dibrom-2-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl-piperidin-1-carbodithioato(1-)-O,O']copper}

(57) Abstract:

The invention relates to chemistry, namely to the synthesis of coordinative compounds from the class of o-acetylphenolates of transition metals and can be used in medicine for the prevention and treatment of human myeloid leukemia.

Summary of the invention consists in that as inhibitor of human myeloid leukemia (HL-60 cells) is proposed a new compound {bis[2-(3,5-dibrom-2-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl-piperidin-1-carbodithioato(1-)-O,O']copper} of formula:



The claimed compound exhibits itself as an effective inhibitor of human myeloid leukemia compared to thiosemicarbazones of copper, especially in the concentration range of $10^{-6} \dots 10^{-7}$ mol/L.

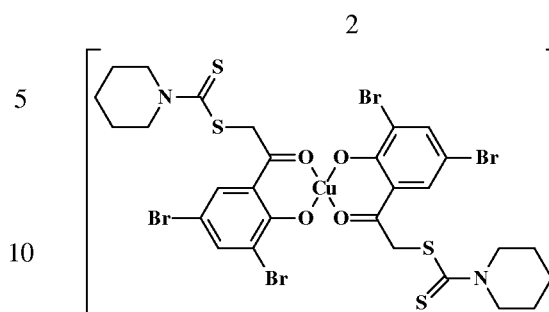
Claims: 2

(54) Ингибитор миелоидной лейкемии человека на основе {бис[2-(3,5-дибром-2-гидроксифенил)-2-оксоэтил-пиперидин-1-карбодитиоато(1-)-O,O']меди}

(57) Реферат:

Изобретение относится к химии, а именно к синтезу координационных соединений из класса о-ацетилфенолятов 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 новое соединение {бис[2-(3,5-дибром-2-гидроксифенил)-2-оксоэтил-пиперидин-1-карбодитиоато(1-)-O,O']меди} формулы:



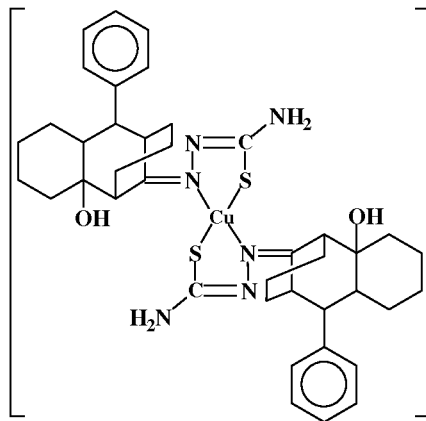
Заявляемое соединение проявляет себя как эффективный ингибитор миелоидной лейкемии человека по сравнению с тио-семикарбазонатами меди, особенно в интервале концентраций $10^{-6} \dots 10^{-7}$ моль/л.

П. формулы: 2

Descriere:

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

- 5 Compusul coordinativ revendicat se aseamănă după structură cu bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazono)cupru (analogul proxim și analogul structural [1]) cu formula:



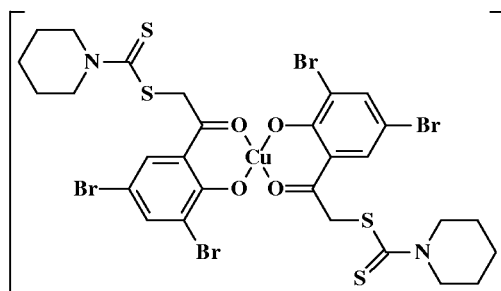
- 10 Complexul dat inhibă creșterea și multiplicarea celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane la concentrația 10^{-6} M.

Dezavantajul bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazono)cuprului constă în faptul că el nu posedă o activitate anticanceroasă suficient de înaltă, inhibând la concentrația dată numai 20% de celule.

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

Esența invenției constă în aceea că în calitate de inhibitor al leucemiei mieloide umane (celule HL-60) se propune {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru} cu formula:

20



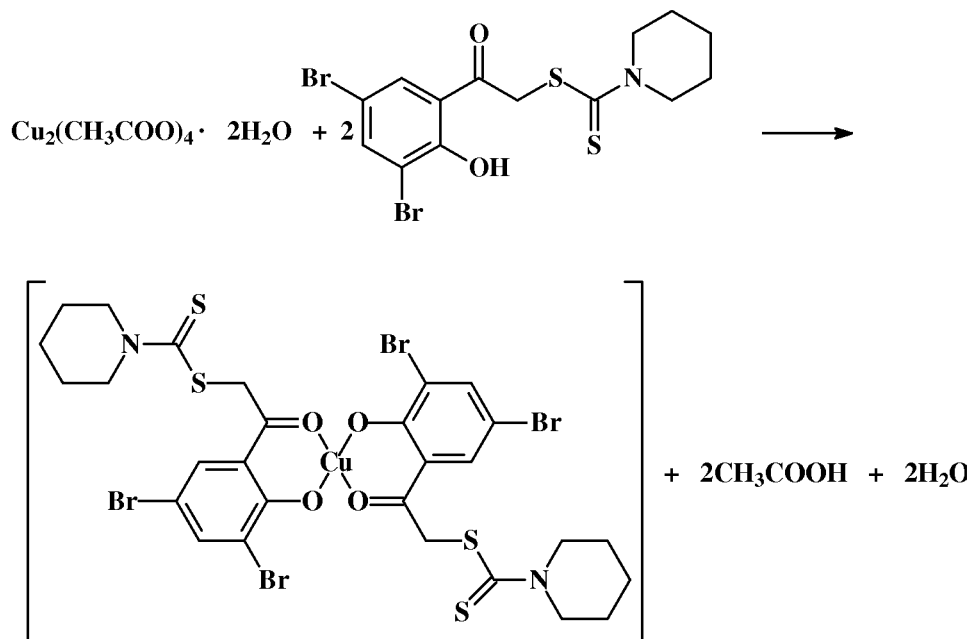
Complexul dat, proprietățile lui și procedeul de obținere nu sunt descrise în literatură.

- 25 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a unei activități anticanceroase, care depășește de 6,25 ori caracteristicile analoage ale bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.^{2,7}/tridecan-13-on-tiosemicarbazono)cupru (analogul proxim) [1]. Compusul revendicat se manifestă ca un inhibitor efectiv al leucemiei mieloide umane comparativ cu tiosemicarbazonatul de cupru sus-menționat, în special, în intervalul de concentrații $10^{-6} \dots 10^{-7}$ mol/L.

- 30 Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitor al leucemiei mieloide umane se propune {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru}, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

- 35 Compusul revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți ($50 \dots 55^\circ\text{C}$) de $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperi-

din-1-carboditioat, luate în raport molar de 1 : 4. Reacția decurge în 45...60 min conform următoarei scheme:



5

Mecanismul reacției date constă în aceea că în amestecul reactant în prezența ionului acetat, care joacă rol de reagent protono-acceptor, decurge deprotonizarea grupelor hidroxilice ale fragmentelor fenolice. Obținuți în acest mod, doi anioni ai carboditioatului, respectiv monodeprotonizați, coordonează la ionul de cupru(2+), având rolul de ligand O,O'-bidentat.

10

Exemplu de obținere a {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru}

Se amestecă 50 mL de soluție etanolică, care conține 10 mmol de 2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioat (Ciobanu A.S., Goanta M., Birsă A., Asaftei I.V., and Birsă M. L. Synthesis of Mesoionic 4-Methyl-2-(1,3-dithiol-2-ylum-4-yl)phenolates, Anal. Științ. Univ. Al.I. Cuza, Iași, (2008) 16, 61-75) cu 2,5 mmol de $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, suspensie în 30 mL de alcool. Amestecul reactant este încălzit la 50...55°C și amestecat continuu cu ajutorul unui agitator magnetic timp de 45...60 min. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare verde-întunecată, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu etanol, eter și uscate la aer.

20

S-a determinat, %: C – 34,50; H – 2,74; Br – 32,81; Cu – 6,72; N – 2,59; S – 13,07.

Pentru $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{Br}_4\text{CuN}_2\text{O}_4\text{S}_4$ s-a calculat, %: C – 34,74; H – 2,92; Br – 33,02; Cu – 6,57; N – 2,89; S – 13,25.

Procedeeul de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 71% față de cel calculat teoretic. Acest complex este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcooli alifatici, bine solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.

25

Valoarea conductivității molare ($4 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) a {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru} indică faptul că el este ne-electrolit.

30

Cercetarea magnetochimică la temperatura camerei (294 K) a complexului revendicat a demonstrat că valoarea obținută a momentului lui magnetic efectiv este apropiată de valoarea de spin pentru un electron necuplat [$\mu_{\text{ef}} = 1,78 \text{ m. B}$]. Faptul acesta ne permite să presupunem, că substanța cercetată are structură monomerică.

35

În scopul determinării modului de coordinare a fenolatului la ionul de cupru(2+) a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru} și 2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioatului. S-a stabilit că fenolatul în complexul revendicat se comportă ca un ligand bidentat monodeprotonizat, coordinand la ionul central prin intermediul atomului de oxigen fenolic deprotonizat și al oxigenului carbonilic al

40

fenolatului, formând un metalociclu din șase atomi. În favoarea acestui fapt vorbește dispariția din spectrele IR ale substanței revendicate a benzii de absorbție $\delta(\text{OH})$, care în fenolatul mezoionic liber se observă la 1229 cm^{-1} . În afară de aceasta, în spectrul IR al complexului revendicat banda de absorbție $\nu(\text{C}=\text{O})$ se deplasează cu 18 cm^{-1} spre frecvențe mai mici [în 2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioatul inițial $\nu(\text{C}=\text{O})$ se observă la 1641 cm^{-1}]. În favoarea modului sus-numit de coordinare a fenolatului vorbește și faptul apariției la 470 și 465 cm^{-1} a două benzi de absorbție noi, care conform datelor din literatură, se atribuie benzilor $\nu(\text{Cu}-\text{O})$.

Valoarea energiei de tranziție d-d ($^2\text{B}_2 \rightarrow ^2\text{A}_1$) pentru banda 12610 cm^{-1} , obținută din spectrul electronic al {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru}, sugerează o înconjurare tetraedrică distorsionată a ionului de metal.

Valoarea g , obținută din spectrul RES complexului revendicat ($g_x = 2,030$, $g_y = 2,110$ și $g_z = 2,220$), confirmă simetria uniaxială, care corespunde următoarei secvențe: $g_z > g_y$; $g_z > g_x$. Nu s-a observat semnal RES la jumătatea câmpului ($\approx 1600\text{ G}$) caracteristic pentru dimerul cuprului.

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

Exemplu de utilizare a {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru} în calitate de inhibitor al 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 bovine, 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 de compartimente (2 cm^2 /celulă) la densitatea inițială de $1 \cdot 10^5$ 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 studiul proprietăților anticanceroase ale {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-OO']cupru} demonstrează (tab.) că la concentrația 10^{-5} M el inhibă creșterea și multiplicarea a 95%, la 10^{-6} – a 98%, iar la concentrația 10^{-7} – a 25% de celule HL-60 ale leucemiei mieloide umane. Datele obținute indică faptul că acest complex de cupru(2+), după activitatea anticanceroasă, depășește de 6,25 ori caracteristicile analoage ale analogului proxim.

Tabel

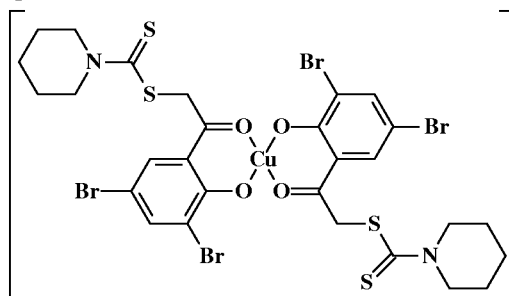
40 Partea de celule inhibitate ale leucemiei mieloide umane HL-60, %

Compusul	Concentrație, mol/L		
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0. ^{2,7} /tridecan-13-on-tiosemicarbazono)cupru [1] (analogul proxim)	100	20	0
{Bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru}	95	98	25

Proprietățile depistate ale {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']cupru} prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori ai leucemiei mieloide umane.

1. MD 3655 G2 2008.07.31

1. {Bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2-oxoetil-piperidin-1-carboditioato(1-)-O,O']-cupru} cu formula:



2. Compus conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** posedă proprietăți de inhibitor al leucemiei mieloide umane.

JUSTIN Viorel

JOVMIR Tudor

CANTER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii	
(21) Nr. depozit: a 2011 0065	(32) Data de prioritate recunoscută: N/A
(22) Data depozit: 2011.06.16	Raport de documentare internațională: N/A
(54) Titlul: Inhibitor al leucemiei mieloidă umane în bază de {bis[2-(3,5-dibromo-2-hidroxifenil)-2--oxoetil-piperidin-1-carboditioato(-1)]cupru}	
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(51) (Int.Cl): Int.Cl: C07F 1/08 (2006.01) A61K 31/30 (2006.01) C07C 49/78 (2006.01) A61K 31/055 (2006.01) C07C 49/807 (2006.01) A61K 31/27 (2006.01) C07C 49/92 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01) C07C 333/22 (2006.01) C07C 45/77 (2006.01)	
II. Condiții de unitate a invenției: X satisface ☐ nu satisface Note:	
III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere X satisface ☐ nu satisface Note:	
IV. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative). Dacă nu e specificat – KW pentru T/ABS, indicii de clasif. - IPC MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): vide supra Int.Cl. ; leucem ; cupru AND cancer ; "Worldwide" (Espacenet): (cancer* OR anticancer*) ; (antiproliferat* OR proliferat*) ; «HL-60» ; copper AND / leukem* /antileukem* /proliferat* /antiproliferat* /antineoplastic / tumor*/antitumor*/ (cancer* OR anticancer*) / hydroxyacetophenone/hydroxyphenyl* AND A61K/ C07C39 AND C07F1/08 ; A61K31/27 AND A61P35 AND C07F1/08 ; A61K31/30 AND A61P35 AND C07F1/08 ; C07F1/08 AND / leukem*/antileukem*/(cancer* OR anticancer*)/cyto*/tumor*/antitumor* / antineoplastic/ (proliferat* OR antiproliferat* / «HL-60» /hydroxyphenyl* AND A61K/ hydroxyphenyl* AND oxoethyl*/ ; C07C49/825 AND / leukem*/antileukem*/cyto*/tumor*/antitumor* / antineoplastic/ proliferat* / «HL-60» /hydroxyphenyl* AND A61K/ hydroxyphenyl* AND oxoethyl*/ ; carbodithioate* AND A61K ; EA, CIS (Eapatis) : медь AND /лейкем*/противорака*/противоопухол*/опухол*/рак/ противорака*/ пролифера*/цитотокс*/злокачествен*/гидроксиацетофенон/ гидроксифенил*/ карбодитио*/ Alte BD – RUPTO : медь AND /лейкем*/противорака*/противоопухол*/опухол*/рак/ противорака*/ пролифера*/цитотокс*/злокачествен*/гидроксиацетофенон/ гидроксифенил*/ карбодитио*/	
V. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate	

FreeFullPDF (copper chelate* cancer* hydroxyacetophenone) ;
(copper chelate* tumor* hydroxyacetophenone) ;
(copper chelate* cancer* hydroxyaryl*) ;
(copper chelate* cancer* hydroxyphenylketone*) ;
(copper chelate* cancer* 3,3-dibromo-2-hydroxyphenyl*) ;

VI. 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	1,2
A, C	MD 3655 G2 2008.07.31	1,2
A	MD 3890 G2 2009.04.30	1,2
A	US5565491 A 1996-10-25 Descriere, col. 2 randul 31; col. 3, randul 13, 16	1,2
A	CN10159410 A 2009-09-02	1,2
A	CN101857583 A 2010-10-13	1,2
A	Tripathi Laxmi et al. Role of chelates in treatment of cancer. Indian Journal of Cancer, April-June 2007, vol. 44, issue 2, pag. 62-71 (regăsit în Internet la 2011.08.11, url: http://www.bioline.org.br/pdf?cn07011)	1,2
A	Ananda Mookerjee, Jayati Mookerjee Basu, Surajit Majunder et al. "A novel copper complex induces ROS generation in doxorubicin antioxidant enzymes in vital organs in vivo". BMC Cancer 2006, 6:267 doi: 10.1186/1471-2407-6-267 Open Access, (regăsit în Internet la 2012.10.17, url: http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2407-6-267.pdf)	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 2012.10.17

Examinator JOVMIR Tudor