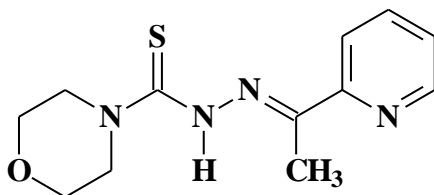


Descrierea se publică în redacția solicitantului

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa tiosemicarbazidelor și poate găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratarea leucemiei mieloide umane.

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

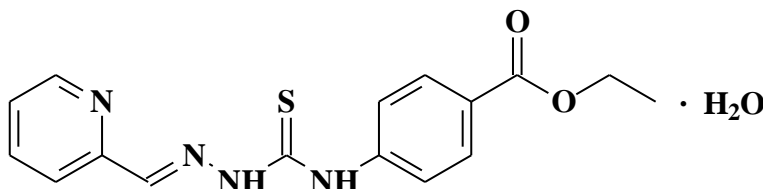


Compusul dat la concentrația 10^{-5} mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 94,20%, la 10^{-6} mol/L a 82,85%, iar la concentrația 10^{-7} mol/L a 77,10% de celule HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

Dezavantajul prototipului 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.

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.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane a etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotioil]amino}benzoatului monohidrat cu formula:

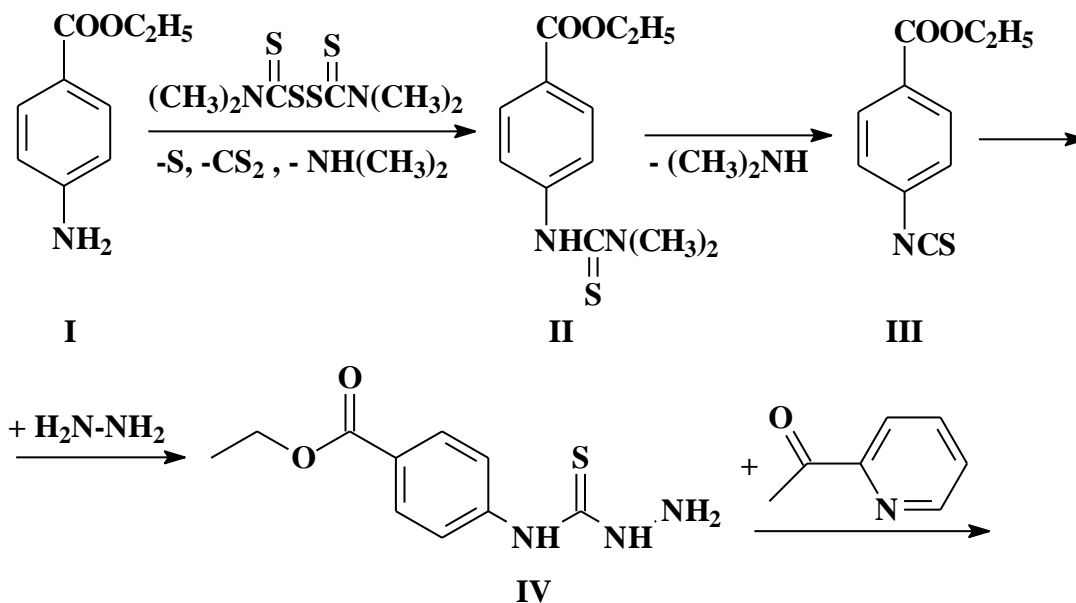


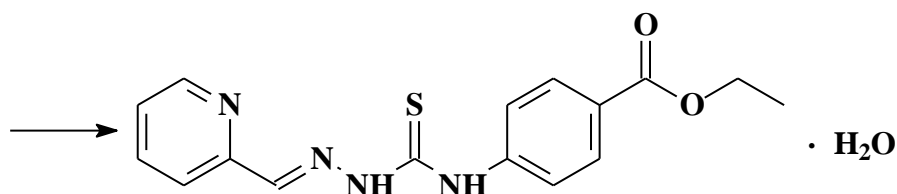
Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anticancerigene, care în diapazonul concentrațiilor $10^{-5} \dots 10^{-7}$ mol/L are concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50}) egală cu $0,1 \mu\text{mol/L}$ și este de două ori mai efectiv decât prototipul. Proprietatea stabilită a etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotioil]amino}benzoatului monohidrat revendicat este nouă, fiindcă, până în prezent nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al creșterii și multiplicării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul, că pentru prima dată în calitate de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane se propune etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotioil]amino}benzoatul monohidrat, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

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

Etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotioil]amino}benzoatul monohidrat revendicat se obține conform următoarei scheme:





Mecanismul prezentei reacții este următorul: la prima etapă de sinteză etil-4-aminobenzoatul (I, numit în medicină anestezic) reacționează cu dimetiltiouramul (DTMT) în raport molar 1:0,5 la încălzire în solvenți polari (etanol, dimetilformamidă sau dimetilsulfoxidă). La următoarea etapă, 4-N,N-dimetiltioureidobenzoatul de etil (II) obținut, se supune procesului dezaminării prin încălzirea compusului II cu H_2SO_4 (raportul molar al reagenților 1:1) în dioxan, cu formarea etil-4-izotiocianatobenzoatului III. Etil-4-[(hidrazinocarbotoil)amino]benzoatul IV se obține prin picurarea soluției de izotiocianat (III) la exces de hidrat de hidrazină în dioxan. Astfel, se exclude adăugarea tiosemicarbazidei IV formate la izotiocianatul inițial. Etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoil]amino}benzoatul monohidrat final se sintetizează prin condensarea tiosemicarbazidei IV cu 2-formilpiridina la încălzire într-un amestec de dimetilformamidă-etanol (1:3). Sinteza compuşilor inițiali I-IV a fost efectuată după metodele standard descrise în literatură (Barbă N. et al. Sinteza 3(4)-izotiocianatobenzoatelor de etil din esterii acizilor 3(4)-N,N-dimetiltioureidobenzoici. *Anale Științifice USM*, 2001, p. 221-223). Puritatea lor a fost confirmată cromatografic, prin analiza elementală și spectrală (^1H și ^{13}C -RMN și IR).

Invenția se explică cu ajutorul figurii, care reprezintă: structura etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoil]amino}benzoatului monohidrat.

Exemplu de obținere al etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoil]amino}benzoatului monohidrat

La soluția obținută din 0,32 g (0,003 mol) 2-formilpiridină și 2,0 ml etanol se adaugă 0,72 g (0,003 mol) etil-4-[(hidrazinocarbotoil)amino]benzoat (IV), dizolvat în 3 ml dimetilformamidă, apoi amestecul se încălzește la baie de apă timp de 1 oră. Sfârșitul reacției se determină cu ajutorul controlului cromatografic după consumul tiosemicarbazidei inițiale. După răcire produsul final se filtrează, se spală pe filtru cu etanol și se usucă. Se obțin 0,83 g (80%) de produs final. Compoziția substanței a fost stabilită în baza rezultatelor analizei elementelor.

Determinat, %: C-55,39; H-5,01; N-15,91; S-9,40. Calculat pentru compusul $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$, % : C-55,52; H-5,24; N-16,19; S-9,26.

P. t. = 155...157 °C. $R_f = 0,62$ (eluent - etil acetat:benzen, 2:1).

RMN ^1H : (- CH_3) 1,33; (- CH_2 -) 4,32; (- CH= din inelul piridinic) 8,60 8,43 8,23 7,42; (- CH= din inelul benzenic) 7,94 7,85; (-NH- legat de benzen) 12,22; (-NH- legat de azot) 10,42.

RMN ^{13}C : (- CH_3) 14,68; (- CH_2 -) 61,11; (-C=S) 176,47; (-O-C=O) 165,84; (-CH=N-) 156,42; (C aromatic) 149,89, 144,17, 143,84, 137,04, 129,66, 125,71, 125,38, 124,90, 120,26.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm^{-1} : $\nu(\text{N-H}) = 3313, 3129$; $\nu(\text{C-H}) = 3050, 2974, 2940$; $\nu(\text{C=O})_{\text{din ester}} = 1713$; $\nu(\text{C=N}) = 1540$; $\nu(\text{C-O})_{\text{din ester}} = 1270$ și 1148; $\rho(\text{C=S}) = 1233$; $\delta(\text{C=S}) = 869$.

Procedeele de obținere al compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. Tiosemicarbazona este stabilă în contact cu aerul, puțin solubilă în apă, mai bine solubilă în alcoolii, bine solubilă în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă.

La recristalizarea etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoil]amino}benzoatului monohidrat 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- $\text{K}\alpha$. Cristalele au fost plasate la o distanță de 40 mm față de detectorul CCD. Procedeele de determinare ai 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 edealizate ($d_{\text{CH}} = 0,96$ 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 compusului investigat $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$, grupa spațială $P 2_1/C$, parametrii celulei elementare [Å]: $a = 4,3332(7)$; $b = 29,719(5)$, $c = 13,5460(13)$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 98,840(15)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; volumul celulei elementare $1723,7$ Å 3 . A fost stabilit (Fig.), că în celula elementară a acestui compus se află o moleculă de azometină, care are o structură practic planară. Distanțele interatomice și unghiurile de valență se află în limitele standarde, caracteristice pentru compuşii din această clasă. Fragmentul tiosemicarbazidic în componența moleculei se află în forma tionică [$d(\text{C=S}) 1,70(2)$ Å]. În compoziția compusului investigat se conține o moleculă de apă, legată prin intermediul legăturilor de hidrogen cu atomii de azot ai fragmentului piridinic și azometinic ai moleculei de azometină.

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 etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoil]amino}benzoatului monohidrat în calitate de inhibitor de proliferare ai celulelor HL-60 ale leucemiei mieloidă 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% 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 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 etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotioil]amino}benzoatului monohidrat sunt prezentate în Tabel, din care se observă, că la concentrația 10⁻⁵M el inhibă creșterea și multiplicarea a 100,0 %, la 10⁻⁶M a 85,1%, iar la concentrația 10⁻⁷M a 78,2% de celule HL-60 ale leucemiei mieloide umane și are IC₅₀ egal cu 0,1 μmol/L. Datele obținute indică, că acest compus, după activitatea anticancerigenă este de două ori mai efectiv decât prototipul.

Proprietățile depistate ale etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotioil]amino}benzoatului monohidrat 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 μmol/L
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
N ⁻ [1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotio-hidrazida (prototipul) [1]	94,2	82,85	77,1	0,2
Etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotioil]amino}benzoat monohidrat	100,0	85,1	78,2	0,1