



MD 4613 B1 2019.01.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4613** (13) **B1**  
(51) Int.Cl: *C07C 337/08* (2006.01)  
*C07C 69/78* (2006.01)  
*A61K 31/175* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

### (12) BREVET DE INVENȚIE

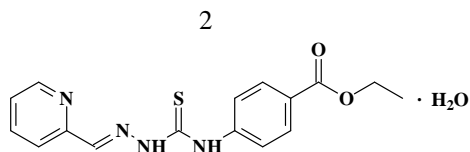
<b>In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului</b>	
(21) Nr. depozit: a 2017 0078 (22) Data depozit: 2017.09.11	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.01.31, BOPI nr. 1/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; RUSNAC Roman, MD; RUSNAC Anna, MD; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoil]amino}benzoat monohidrat care manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus organic biologic activ din clasa tiosemicarbazidelor, și poate găsi aplicare în medicină în profilaxia și tratarea leucemiei mieloide umane.

Esența invenției constă în aceea că se revendică un compus nou, etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoil]amino}benzoat ul monohidrat, cu formula:



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

Revendicări: 2

Figuri: 1

MD 4613 B1 2019.01.31

**(54) Ethyl-4-{2-[(pyridin-2-ylmethylidene)hydrazinocarbothioyl]amino benzoate monohydrate exhibiting properties of human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitor**

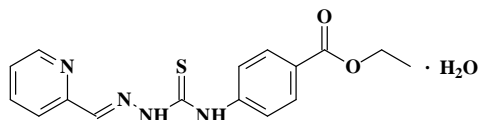
**(57) Abstract:**

1

The invention relates to chemistry and medicine, namely to a biologically active organic compound from the class of thiosemicarbazides, and may find application in medicine for the prevention and treatment of human myeloid leukemia.

Summary of the invention consists in that a new compound is claimed ethyl-4-{2-[(pyridin-2-ylmethylidene)hydrazinocarbothioyl]amino benzoate monohydrate of the Formula:

2



The compound exhibits properties of human myeloid leukemia HL-60 cell proliferation inhibitor.

Claims: 2

Fig.: 1

**(54) Этил-4-{2-[(пиридин-2-илметилиден)гидразинокарботиоил]амино}бензоат моногидрат проявляющий свойства ингибитора пролиферации клеток HL-60 миелоидной лейкемии человека**

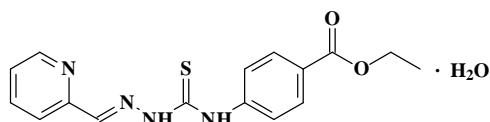
**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активному органическому соединению класса тиосемикарбазидов, и может найти применение в медицине для профилактики и лечения миелоидной лейкемии человека.

Сущность изобретения заключается в том что заявляется новое соединение моногидрат этил-4-{2-[(пиридин-2-илметилиден)гидразинокарботиоил]амино}бензоат формулы:

2



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

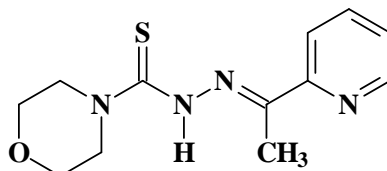
П. формулы: 2

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 găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratarea leucemiei mieloide umane.

10 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:

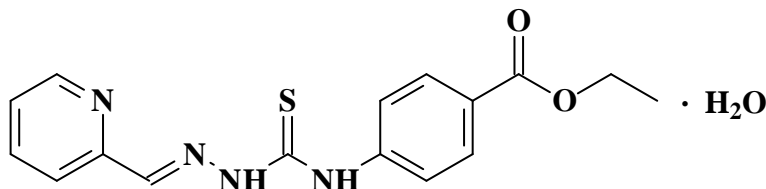


15 Compusul dat la concentrația  $10^{-5}$  mol/L inhibă creșterea și multiplicarea a 94,20%, la  $10^{-6}$  mol/L a 82,85%, iar la concentrația  $10^{-7}$  mol/L a 77,10% de celule HL-60 ale leucemiei mieloide umane.

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  $\mu$ 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.

20 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:

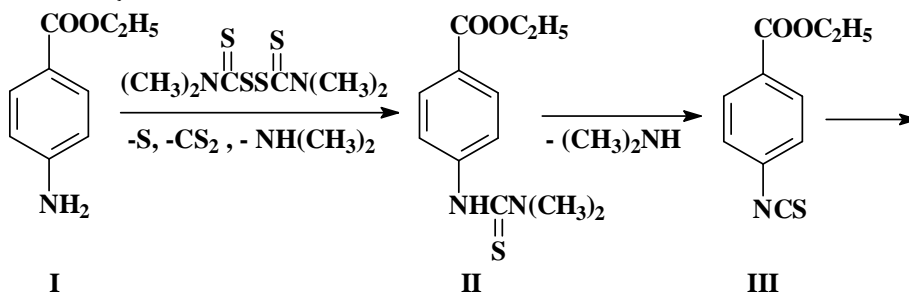


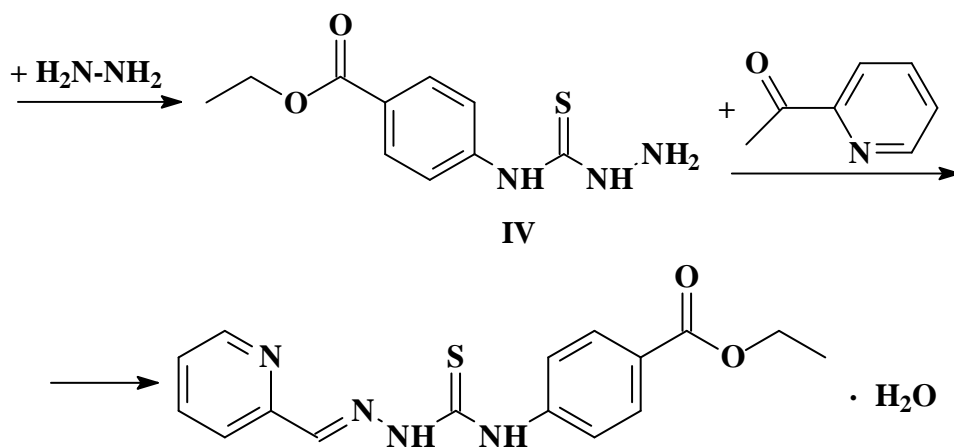
25 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anticancerigene, care în diapazonul concentrațiilor  $10^{-5}$ ... $10^{-7}$  mol/L are concentrația de inhibare semimaximală ( $IC_{50}$ ) egală cu 0,1  $\mu$ mol/L și este de două ori mai efectiv decât prototipul. 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.

30 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.

35 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 anestezin) 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (raportul molar al reagenților 1:1) în dioxan, cu formarea etil-4-izotiocianatobenzoatului III. Etil-4-[(hidrazinocarbotoiil)amino]benzoatul IV se obține prin picurarea soluției de izotiocianat (III) la exces de hidrat de hidrazină în dioxan. Astfel, se exclude adiția tiosemicarbazidei IV formate la izotiocianatul inițial. Etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoiil]amino}benzoatul monohidrat final se sintetizează prin condensarea tiosemicarbazidei IV cu 2-formilpiridina la încălzire într-un amestec de dimetilformamidă-etanol (1:3). Sinteza compușilor inițiali I-IV a fost efectuată după metodele standarde descrise în literatură (Barbă N. et al. Sinteza 3(4)-izotiocianatobenzoatilor 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 (<sup>1</sup>H și <sup>13</sup>C-RMN și IR).

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

Exemplu de obținere al etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoiil]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-[(hidrazinocarbotoiil)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 C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S, % : C-55,52; H-5,24; N-16,19; S-9,26.

P. t. = 155...157 °C. R<sub>f</sub> = 0,62 (eluent - etil acetat:benzen, 2:1).

RMN <sup>1</sup>H: (-CH<sub>3</sub>) 1,33; (-CH<sub>2</sub>-) 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 <sup>13</sup>C: (-CH<sub>3</sub>) 14,68; (-CH<sub>2</sub>-) 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<sup>-1</sup>: ν(N-H) = 3313, 3129; ν(C-H) = 3050, 2974, 2940; ν(C=O)<sub>din ester</sub> = 1713; ν(C=N) = 1540; ν(C-O)<sub>din ester</sub> = 1270 și 1148; ρ(C=S) = 1233; δ(C=S) = 869.

Procedul 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 alcooli, bine solubilă în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă.

La recristalizarea etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoiil]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 inzebrat cu sursă de raze X de tip Mo-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 ( $d_{CH} = 0,96$  Å) utilizand 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 C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S, grupa spațială P 2<sub>1</sub>/C, parametrii celulei elementare [A]: 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<sup>3</sup>. 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 compușii din această clasă. Fragmentul tiosemicarbazidic în componența moleculei se află în forma tionică [d(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)hidrazinocarbotioil]amino}benzoatului monohidrat in calitate de inhibitor de proliferare ai celulelor HL-60 ale leucemiei mieloido umane.

Celulele leucemiei mieloido 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  $\mu$ g de streptomycină/ml și incubate în atmosferă umedă de 95% aer / 5% CO<sub>2</sub> 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 cm<sup>2</sup>/celulă) la densitatea inițială de 1...10<sup>5</sup> 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 cate 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<sup>-5</sup>M el inhibă creșterea și multiplicarea a 100,0 %, la 10<sup>-6</sup>M a 85,1%, iar la concentrația 10<sup>-7</sup>M a 78,2% de celule HL-60 ale leucemiei mieloido umane și are IC<sub>50</sub> egal cu 0,1  $\mu$ mol/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 mieloido umane.

Tabel

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

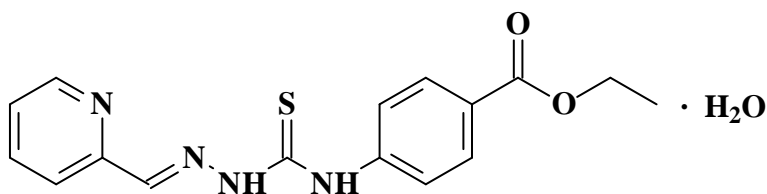
Compusul	Concentrație, mol/L			IC <sub>50</sub> $\mu$ mol/L
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
N'-[1-(2-piridil)etiliden]morfolin-4-carbotio-hidrazida (prototipul) [1]	94,2	82,85	77,1	0,2
Etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotioil]amino}benzoat monohidrat	100,0	85,1	78,2	0,1

**(56) Referințe bibliografice citate in descriere:**

1. MD 4434 B1 2016.09.30

**(57) Revendicări:**

1. Etil-4-{2-[(piridin-2-ilmetiliden)hidrazinocarbotoil]amino}benzoat monohidrat cu formula:



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

