



MD 4698 C1 2021.02.28

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4698** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/53 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

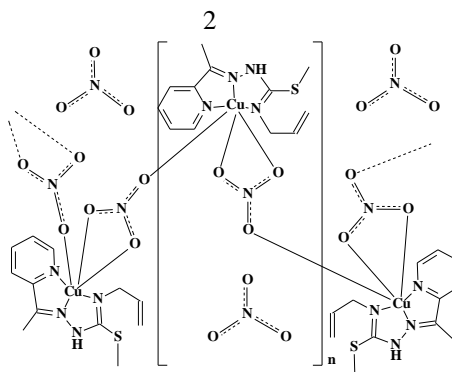
(21) Nr. depozit: a 2019 0006 (22) Data depozit: 2019.02.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.05.31, BOPI nr. 5/2020
(71) Solicitanți: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; GUDUMAC Valentin, MD; ISTRATI Dorin, MD; USATAIA Irina, MD; GRAUR Vasilii, MD; ȚAPCOV Victor, MD; ȘVEȚ Inna, MD; PANTEA Valeriana, MD	
(73) Titulari: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Nitrat de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O''-){metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ biologic activ de cupru din clasa izotiosemicarbazidaților metalelor de tranziție. Acest complex manifestă activitate antiradicalică, inhibând radicalii superoxizi în organism. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat care previne dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, ateroscleroza și carcinogeneza.

Conform invenției, se revendică compusul nitrat de catenă-(μ -nittrato-O,O'-O''-){metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) cu formula:

unde n este limitat de dimensiunile cristalului.

Compusul menționat extinde arsenalul de inhibitori ai radicalilor superoxizi sintetici cu activitate biologică înaltă.

Revendicări: 2

Figuri: 2

MD 4698 C1 2021.02.28

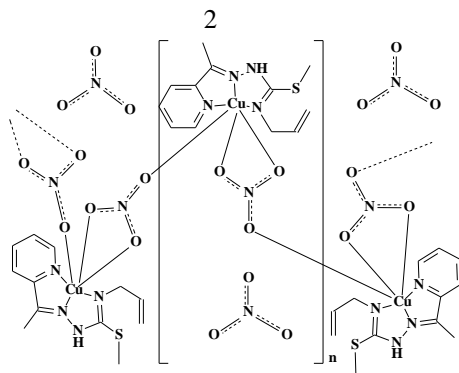
(54) Catena-(μ -nitrato-O,O'-O''-{methyl-N-(prop-2-en-1-yl)-2-[1-(pyridine-2-yl)ethylidene]hydrazinecarbimidothioate}copper(II) nitrate compound as superoxide radical inhibitors

(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and medicine, namely to a biologically active coordination compound of copper from the class of transition metal isothiosemicarbazidates. This complex exhibits antiradical activity, inhibiting superoxide radicals in the body. Due to these properties, it can be used in medicine as a drug that prevents the development of cellular and tissue lesions, atherosclerosis and carcinogenesis.

According to the invention, claimed is catena-(μ -nitrato-O,O'-O''-{methyl-N-(prop-2-en-1-yl)-2-[1-(pyridine-2-yl)ethylidene]hydrazinecarbimidothioate}copper(II) nitrate compound of the formula:



wherein n is limited by the size of the crystal.

The said compound expands the arsenal of synthetic superoxide radical inhibitors with high biological activity.

Claims: 2

Fig.: 2

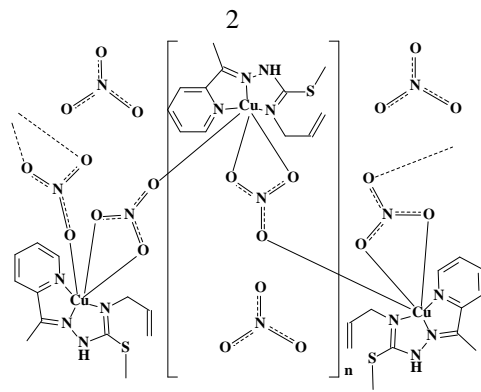
(54) Нитрат катена-(μ -нитрато-O,O'-O'')-{метил-N-(проп-2-ен-1-ил)-2-[1-(пиридин-2-ил)этилиден]гидразинкарбимидотиоат}медь(II) в качестве ингибитора супероксидных радикалов

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активному координационному соединению меди класса изотиосемикарбазидатов переходных металлов. Этот комплекс проявляет антирадикальную активность, ингибируя супероксидные радикалы в организме. Благодаря этим свойствам он может найти применение в медицине в качестве препарата который предотвращает развитие клеточных и тканевых поражений, атеросклероз и карциногенез.

Согласно изобретению, заявляется соединение нитрат катена-(μ -нитрато-O,O'-O'')-{метил-N-(проп-2-ен-1-ил)-2-[1-(пиридин-2-ил)этилиден]гидразинкарбимидотиоат}медь(II) формулы:



где n ограничен размерами кристалла.

Упомянутое соединение расширяет арсенал синтетических ингибиторов супероксидных радикалов с высокой биологической активностью.

П. формулы: 2

Фиг.: 2

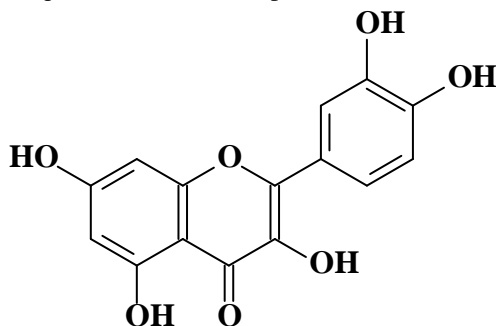
Descriere:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ biologic activ de cupru din clasa izotiosemicarbazidaților metalelor de tranziție. Acest complex manifestă activitate antiradicalică, inhibând radicalii superoxizi în organism. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat care previne dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, ateroscleroza și carcinogeneza.

Radicalul superoxid $O_2^{\cdot -}$ (RSO) este implicat în mai multe procese biologice dăunătoare, cum ar fi denaturarea proteinelor și peroxidarea lipidelor, în patogeneza bolilor umane, cum ar fi boala Parkinson, bolile cardiovasculare, cancerul [Maan Hayyan, Mohd Ali Hashim, Inas M. AlNashef. Superoxide Ion: generation and chemical implications. Chem. Rev., 2016, vol.116 (5), pag. 3029–3085]. Producția excesivă de RSO poate contribui la fibroză alveolară, displazie bronhopulmonară și sindrom de detresă respiratorie, dezvoltarea cataractei. În plus, RSO este implicat în etiologia îmbătrânirii. În afară de aceasta, RSO este o specie derivată din oxigen, care este potențial citotoxic și cauzează deteriorarea ADN-ului.

Prin urmare, inhibarea terapeutică a RSO este o contribuție nouă, deoarece compușii cu activitate antiradicalică manifestă un puternic efect curativ, prevenind dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, ateroscleroza și carcinogeneza [Babizhayev M.A., Yegorov Y. E. Reactive oxygen species and the aging eye: specific role of metabolically active mitochondria in maintaining lens function and in the initiation of the oxidation-induced maturity onset cataract- a novel platform of mitochondria-targeted antioxidants with broad therapeutic potential for redox regulation and detoxification of oxidants in eye diseases. Am . J. Ther., 2016, 23(1), e98-117].

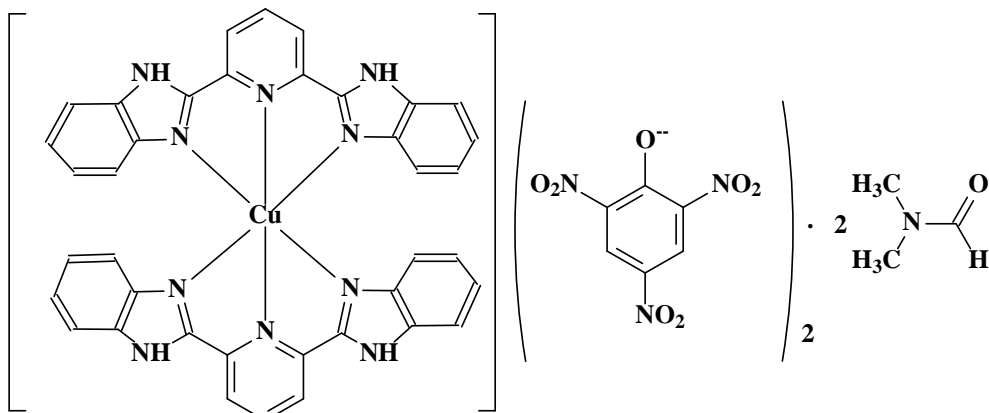
În calitate de etalon pentru determinarea activității inhibitoare a radicalilor superoxizi se utilizează quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxiflavona) cu formula:



care reprezintă un flavonol natural din grupa de flavonoizi polifenolici [1].

Dezavantajul quercetinei constă în faptul, că ea nu posedă o activitate antiradicalică înaltă [concentrația de inhibare semimaximală (IC_{50}) constituie doar 61,86 $\mu\text{mol/L}$], precum și în provocarea efectelor secundare.

Din compușii chimici sintetici, care manifestă o activitate antiradicalică înaltă, descriși în literatură, cel mai înalt efect inhibitor al radicalilor superoxizi a fost obținut în cazul bis(2,4,6-trinitrofenolatului) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvatului (prototipul) [2] cu formula:

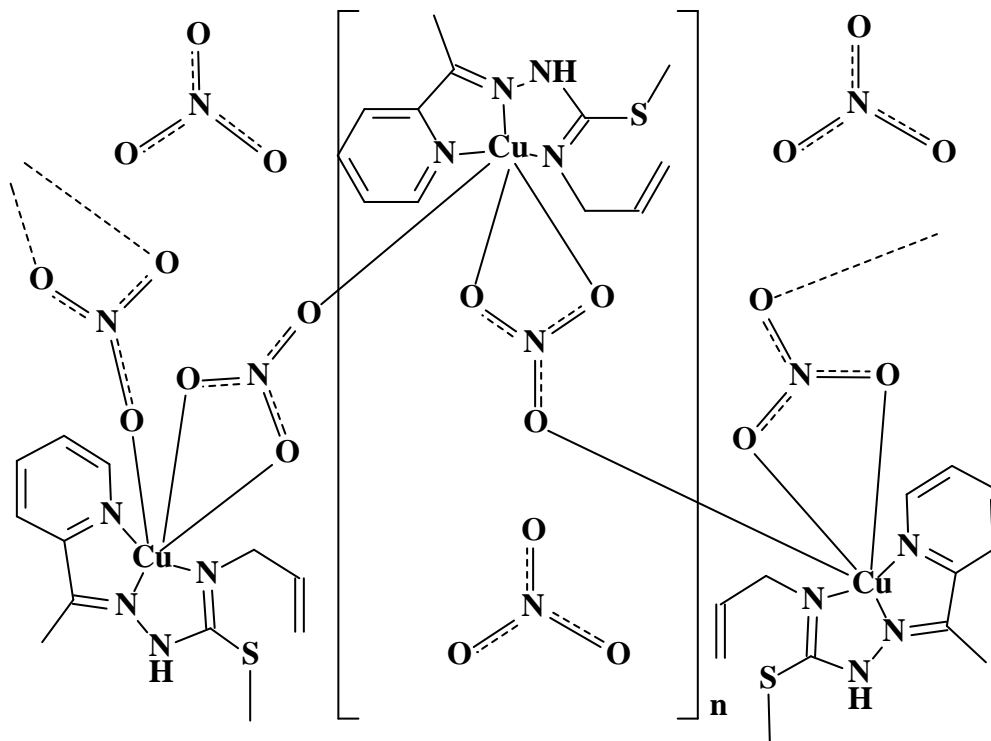


Compusul dat are concentrația semimaximală de inhibare a radicalilor superoxizi $IC_{50} = 0,99 \mu\text{mol/L}$.

Dezavantajul bis(2,4,6-trinitrofenolatului) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvatului (prototipului) [2] constă în faptul, că compusul dat nu posedă o activitate inhibitoare a radicalilor superoxizi suficient de înaltă și până acum nu a găsit aplicare în medicină.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui compus coordinativ nou, care extinde arsenalul de compuși cu activitate inhibitoare a radicalilor superoxizi înaltă.

Esența invenției constă în obținerea unui inhibitor sintetic al radicalilor superoxizi în baza nitratului de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) cu formula:



unde n este limitat de dimensiunile cristalului.

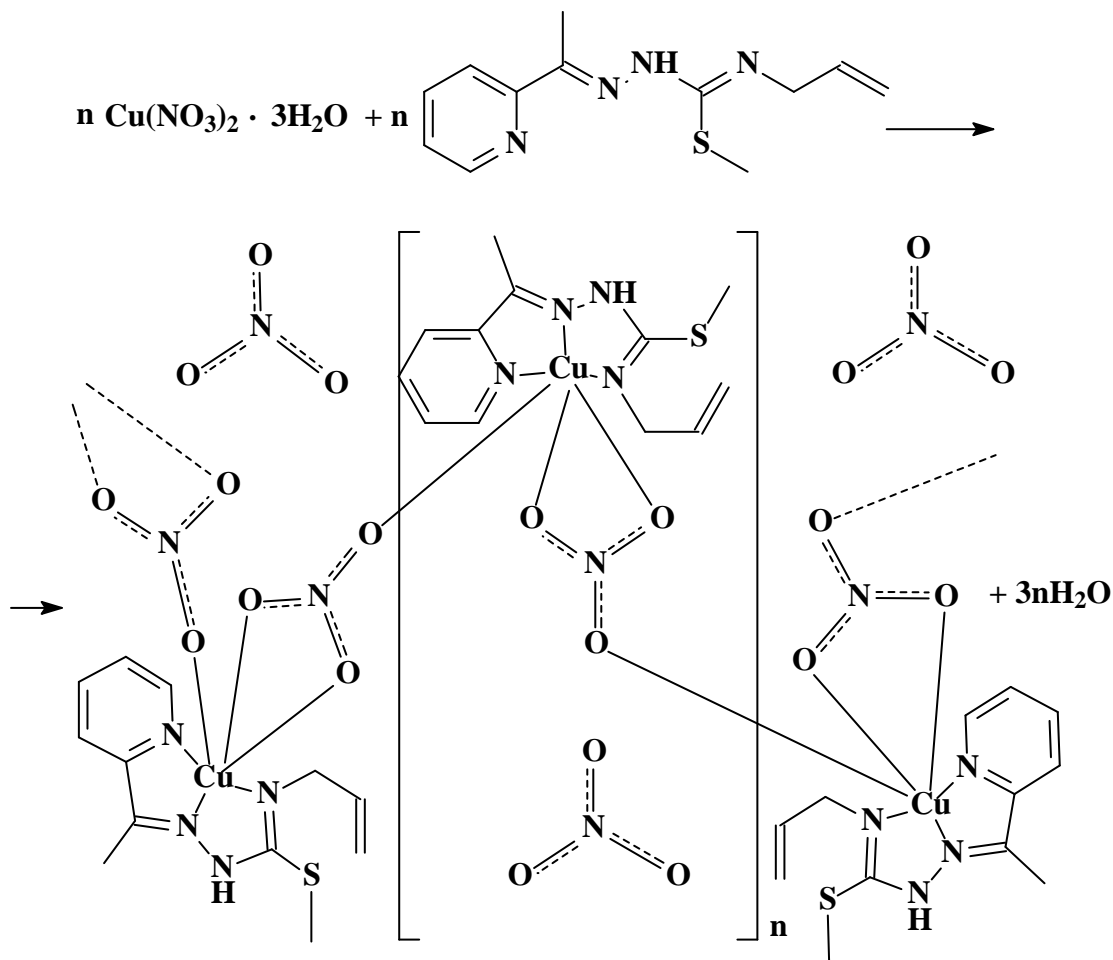
Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anti-radicalice cu IC_{50} egală cu $0,54 \mu\text{mol/L}$, care este de 114,6 ori mai înaltă decât activitatea quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a radicalilor superoxizi și este de 1,8 ori mai efectiv decât prototipul. Proprietatea stabilită a nitratului de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) sus-numit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.

Rezultatul tehnic obținut este cauzat de faptul că în compusul revendicat se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Nitratul de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți ($50...55^\circ\text{C}$) ale trihidratului nitratului de cupru(II) cu metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-metilzotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei], luate în raport molar 1:1. Reacția decurge în $50...60$ min conform următoarei scheme:

30



5 unde n este limitat de dimensiunile cristalului.

Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul, că în timpul sintezei, în amestecul reactant, are loc adățiia la ionul de cupru(2+) a moleculei de 4-alil-S-metilzotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei, care joacă rolul de ligand-N,N,N tridentat. Al patrulea și al cincilea loc în sfera internă a atomului central sunt ocupate de doi atomi de oxigen ai unui nitrat-ion, care îndeplinește funcția de punte în molecula de polimer coordinativ, unindu-se prin al treilea atom de oxigen cu atomul de cupru al moleculei vecine. Al șaselea loc în sfera internă este ocupat de un atom de oxigen al nitrat-ionului moleculei vecine. In rezultatul acestor procese are loc formarea cationului coordinativ polimeric, sarcina căruia se compensează cu nitrat-ionii din sfera externă.

15 **Exemplu de obținere a nitraturii de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-[metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat]cupru(II).** Se amestecă 20 mL de soluție etanolică, care conține 10 mmol de metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-metilzotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei] cu 10 mmol de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, dizolvat în 10 mL de alcool. Amestecul reactant este încălzit (50...55°C) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 50...60 min. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare verde intunecată, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu o cantitate mică de etanol, eter și uscate la aer. Randamentul produsului final alcătuiește 77% de la cel calculat teoretic.

S-a determinat, % : C -35,87; H -4,39; Cu -13,47; N- 12,87; S - 6,70.

25 Pentru $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{CuN}_6\text{O}_6\text{S}$ s-a calculat, % : C -36,09; H - 4,76; Cu -13,64; N- 18,04; S - 6,88.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm^{-1} : 3088 $\nu(\text{N}^2\text{H})$; 1639 $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{alil}})$; 1600, 1558, 1526 $\nu(\text{C}=\text{N})$; 1109 $\nu(\text{CH}_3-\text{S})$; 644 $\nu(\text{C}-\text{S})$; 535, 516, 475, 468, 447, 412 $\nu(\text{M}-\text{N})$.

Compusul complex revendicat are $\mu_{\text{ef}} = 1,82$ m. B. (293K).

Invenția se explică cu ajutorul deseneilor din fig. 1 și 2, care reprezintă:

– fig. 1, structura fragmentului elementar al nitratului de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II);

– fig. 2, structura nitratului de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II).

5 Procedeul de obținere a compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. Metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat [4-*alil*-S-metilzotiosemicarbazona 2-acetilpiridinei] a fost sintetizat după metoda descrisă în sursa: Pahontu E., Usataia I., Graur V., Chumakov Yu., Petrenko P., Gudumac V., Gulea A. Synthesis, characterization, crystal structure of novel Cu(II), Co(III), Fe(III) and Cr(III) complexes with 2-hydroxybenzaldehyde-4-allyl-S-methylisothiosemicarbazone: Antimicrobial, antioxidant and *in vitro* antiproliferative activity. Appl Organomet Chem., 2018, vol 32 (12), pag. 4544e. Complexul revendicat este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcoolii alifatici, este solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubil în eter.

10 La recristalizarea nitratului de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) 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 difractor de tip Xcalibur E CCD Oxford-Diffraction cu monocromator de grafit înzestrat cu sursă de raze X de tip Mo-K α . Procedeul de determinare a 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 pătratelor minimale în cadrul programului SHELXL-97 în varianta anizotropică pentru toți atomii cu masă molară mai mare decât a atomului de hidrogen. Atomii de hidrogen au fost introduși în poziții idealizate ($d_{CH} = 0,96$ Å) utilizând modelul pivot cu fixarea parametrilor izotropici de deplasare la valoarea de 120% față de valorile respective ale atomilor de carbon cu care sunt legați. Formula empirică a compusului investigat C₁₄H₂₂CuN₆O₆S, grupa spațială P 2₁/n, parametrii celulei elementare, [A]: a = 9,1955(5); b = 8,7084(5), c = 22,2895(9); $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 91,488(4)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.

15 A fost stabilit (fig. 1, fig. 2), că compusul investigat reprezintă un polimer coordinativ, în care fragmentul elementar este un cation complex de cupru(II) cu structură tetragonal-bipiramidală distorsionată. În sfera internă a atomului central se află o moleculă de S-metilzotiosemicarbazona tridentată, care coordonează la atomul de cupru prin atomii de azot piridinic [$d(\text{Cu-N}) = 2,005$ Å], azometinic [$d(\text{Cu-N}) = 1,928$ Å] și tiocarbamidic N⁴ [$d(\text{Cu-N}^4) = 1,969$ Å], formând două metalocicluri din cinci atomi. În favoarea coordinării azometinei prin atomul de azot tiocarbamidic N⁴ vorbește și distanța $d(\text{C-S}) = 1,748$ Å. Legătura dublă în molecula de izotiosemicarbazona coordonată se află între atomii de carbon și azot N⁴ [$d(\text{C}^3 - \text{N}^4) = 1,283$ Å]. Distanța între atomii de carbon și azot N³ este mai lungă [$d(\text{C}^3 - \text{N}^1) = 1,371$ Å]. Al patrulea și al cincilea loc în sfera internă a atomului de cupru îl ocupă doi atomi de oxigen ai nitrato-ionului cu distanțele $d^1(\text{Cu-O}) = 1,899$ Å și $d^2(\text{Cu-O}) = 1,982$ Å. Al șaselea loc în sfera internă a atomului central este ocupat de atomul de oxigen din nitrato-ionul central vecin cu distanța $d^3(\text{Cu-O}) = 2,344$ Å. În sfera exterioară a cationului complex polimeric se află al doilea nitrato-ion. Alte distanțe interatomice și unghiurile de valență sunt standarde pentru compușii din această clasă.

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

25 Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

30 **Exemplu al utilizării nitratului de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.**

35 Activitatea de captare a radicalului superoxid a fost determinată prin metoda spectrofotometrică, descrisă în [1] și [Fontana M., Mosca L., Rosei, M.A. Interaction of enkephalins with oxyradicals. Biochemical Pharmacology, 2001, vol. 61, pag. 1253-1257] cu unele modificări.

40 Metoda se bazează pe generarea radicalilor superoxizi de către sistemul fenazin metosulfat/nicotinamidă adenină dinucleotid redusă (FMS/NADH) prin oxidarea NADH, iar radicalii superoxizi reduc sarea de tetrazoliu - nitro blue tetrazolium (NBT) în formazan de culoare albastră-purpurie.

45 Metoda se efectuează în felul următor: se pregătesc diluțiile de lucru ale substanțelor testate în soluție de DMSO în concentrațiile 0,1; 1,0; 10,0; 100 $\mu\text{M/L}$. Apoi, se pipetează câte 20 μL de fiecare diluție de lucru ale substanțelor testate în godeurile microplăcii cu 96 godeuri. Fiecare

diluție se toarnă în duplicat. După aceasta se adaugă câte 180 μL de mediu (amestec) de reacție ce conține soluție de 20 mM tampon fosfat (pH 7,4), NADH (0,1 mM) și NBT (0,09 mM). Proba de control se montează la fel ca și proba de cercetat, dar în loc de diluții ale substanțelor de testat se toarnă o cantitate echivalentă de soluție de 20 mM tampon fosfat (pH 7,4). Se pregătește în

5 duplicat. Se amestecă și se măsoară absorbanta la 560 nm [Ao]. Apoi, în toate godeurile se adaugă câte 20 μL de soluție de 8,0 μM fenazin metosulfat (FMS), se agită 10...15 s și se incubează la temperatura camerei 5 min. Se măsoară din nou absorbanta Abs la 560 nm [A₁]. În calitate de

substanță de referință se folosește quercetina în concentrațiile 0,1; 1,0; 10,0; 100 $\mu\text{M/L}$.

Activitatea de captare a radicalilor superoxizi (ACRS) se calculează (%) după formula:

$$10 \quad \text{ACRS (\%)} = [100 - (A_1/A_0)] \times 100$$

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților inhibitoare ale nitratului de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) sunt prezentate în tabel, din care se observă, că el manifestă activitate antiradicalică cu IC₅₀ egală cu 0,54 $\mu\text{mol/L}$, care este de 114,6 ori mai înaltă

15 decât activitatea quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a radicalilor superoxizi și este de 1,8 ori mai efectiv decât prototipul.

Proprietățile depistate ale nitratului de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori sintetici ai radicalilor superoxizi.

20 Tabel

Activitatea antiradicalică a compusului revendicat în comparație cu quercetina și prototipul

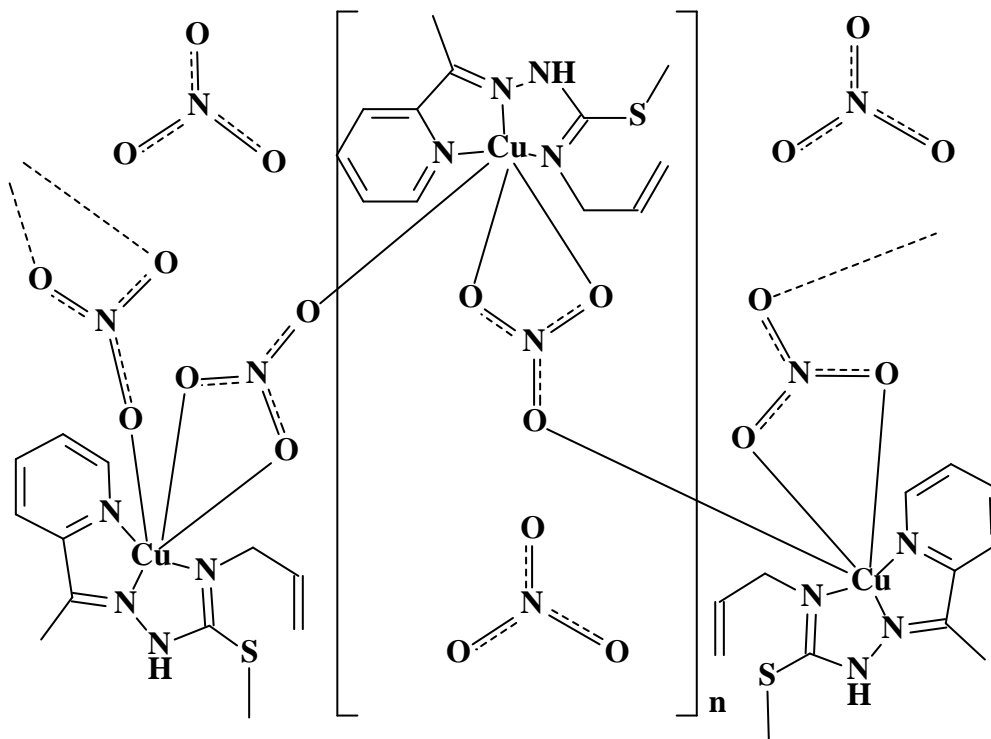
Compusul	IC ₅₀ , $\mu\text{mol/L}$
Quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxi flavona) [1]	61,86
Bis(2,4,6-trinitrofenolatul) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvat (prototipul) [2]	0,99
Nitratul de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II)	0,54

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Robak J., Gryglewski R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 1988, vol. 37 (5), pag. 837-841
2. Hui-Lu Wu, Xingcai Huang, Bin Liu, Fan Kou, Fei Jia, Jingkun Yuan, Ying Bai. Copper(II) complex based on a V-shaped ligand, 2,6- bis (2-benzimidazolyl)pyridine: synthesis, crystal structure, DNA-binding properties, and antioxidant activities. *Journal of Coordination Chemistry*, 2011, vol. 64 (24), pag. 4383-4396

(57) Revendicări:

1. Nitrat de catenă-(μ -nitrato-O,O'-O'')-{metil-N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbimidotioat}cupru(II) cu formula:



unde n este limitat de dimensiunile cristalului.

2. Compus, conform revendicării 1, care manifestă activitatea de inhibare a radicalilor superoxizi.

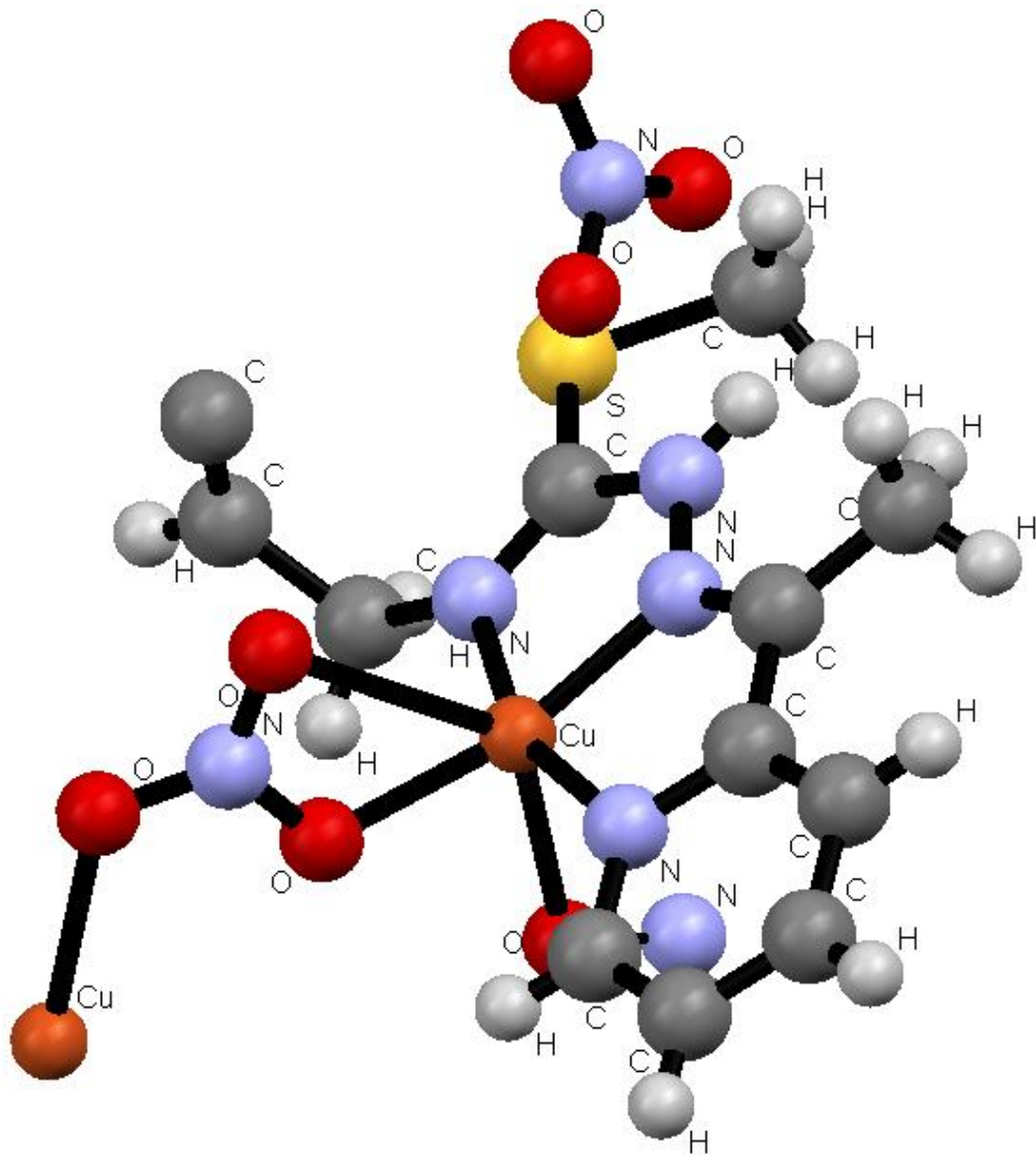


Fig. 1

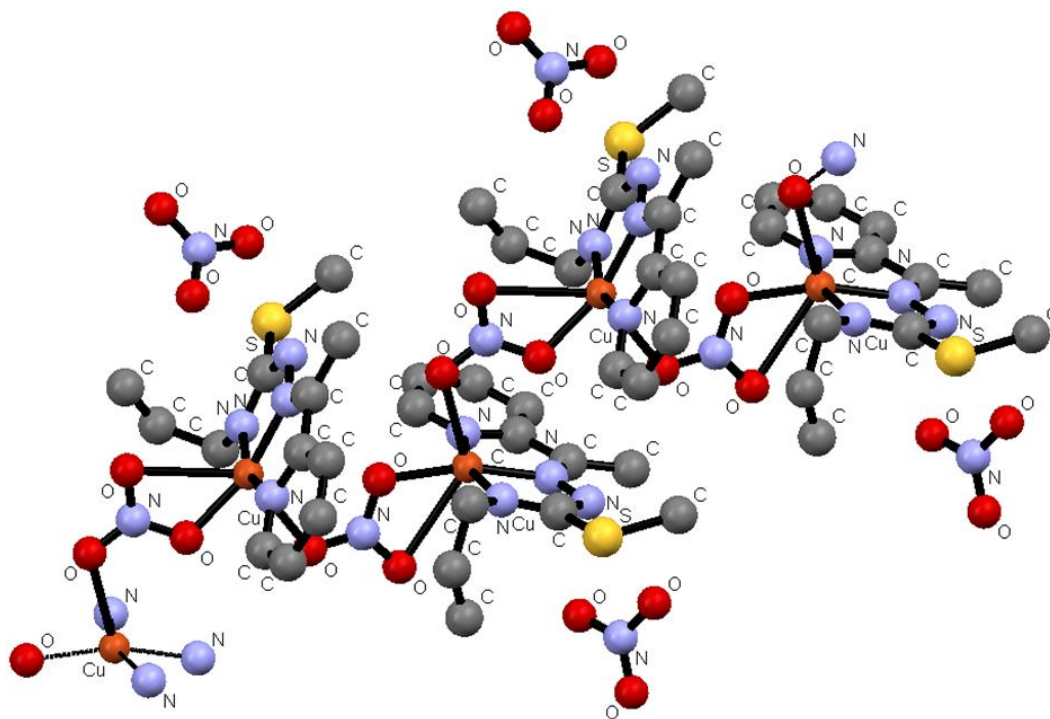


Fig. 2