



MD 4668 B1 2019.12.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4668** (13) **B1**
(51) Int.Cl: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07C 47/56 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

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

(21) Nr. depozit: a 2019 0019
(22) Data depozit: 2019.02.11
(67) Numărul cererii transformate și data transformării: s 2019 0009; 2019.04.04(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
2019.12.31, BOPI nr. 12/2019

(71) Solicitanți: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD

(72) Inventatori: GUDUMAC Valentin, MD; GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; PANTEA Valeriana, MD; USATAIA Irina, MD; GRAUR Vasilii, MD; SARDARI Veronica, MD

(73) Titulari: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD

(74) Mandatar autorizat: COȘNEANU Elena

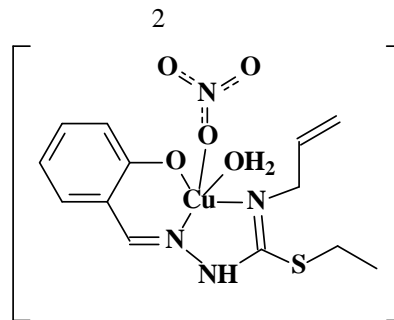
(54) Nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carboimidoil]hidraziniliden} metil)fenolato]aquacupru in calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ de cupru din clasa izotiosemicarbazidaților metalelor de tranziție, care poate fi utilizat în medicină în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi în organism.

Compusul conform invenției nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carboimidoil]-hidraziniliden} metil)fenolato]aquacupru are formula:



Compusul revendicat posedă o activitate biologică înaltă de inhibiție a radicalilor superoxizi.

Revendicări: 2

Figuri: 1

(54) Nitrato-[2-({2-[(ethylsulfanyl)(prop-2-en-1-yl)carboimidoil]-

MD 4668 B1 2019.12.31

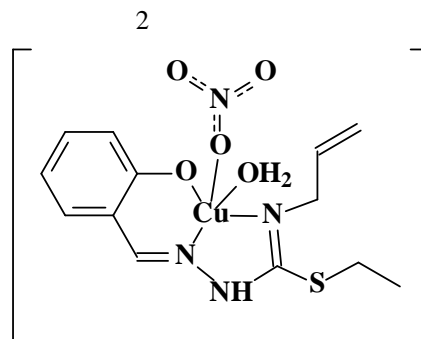
hydrazineilidene)methyl)phenolato]aquacopper as an inhibitor of superoxide radicals

(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and medicine, namely to a coordination compound of copper from the class of transition metal isothiosemicarbazidates, which can be used in medicine as an inhibitor of superoxide radicals in the body.

The compound, according to the invention, nitrate-[2-({2-[(ethylsulfanyl)(prop-2-en-1-yl)carboimidoil]-hydrazineilidene)methyl)phenolato]aquacopper has the formula:



The claimed compound has a high biological activity of inhibition of superoxide radicals.

Claims: 2

Fig.: 1

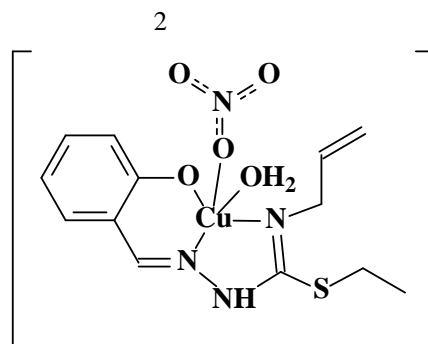
(54) Нитрато-[2-({2-[(этилсульфанил)(проп-2-ен-1-ил)карбоноимидоил]-гидразинилиден}метил)фенолято]аквамедь в качестве ингибитора супероксидных радикалов

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к координационному соединению меди класса изотиоосемикарбазидатов переходных металлов, которое может быть использовано в медицине в качестве ингибитора супероксидных радикалов в организме.

Соединение согласно изобретению нитрато-[2-({2-[(этил-сульфанил)(проп-2-ен-1-ил)карбоноимидоил]-гидразинилиден}метил)фенолято]аквамедь имеет формулу:



Заявляемое соединение обладает высокой биологической активностью ингибирования супероксидных радикалов.

П. формулы: 2

Фиг.: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

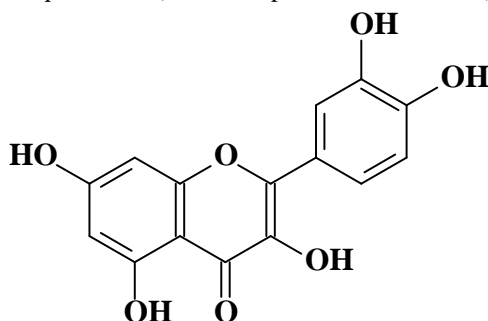
5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ de cupru biologic activ din clasa izotiosemicarbazidaților metalelor de tranziție. Acest complex inhibă exacerbarea proceselor de afectare a moleculelor organice cu radicali superoxizi în organism. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi în organism, prevenind astfel dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, ateroscleroza și carcinogeneza.

10 În patologia bolilor cronice și degenerative (celor mai răspândite boli) un rol important se atribuie radicalilor liberi ai oxigenului (RLO), în special, radicalului superoxid $O_2^{\cdot -}$ (RSO), care se formează prin captarea unui electron la activarea O_2 . Datorită marii reactivități RSO este responsabil de multiple acțiuni nocive asupra organismului (Maan Hayyan, Mohd Ali Hashim, Inas M. AlNashef. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. Chem. Rev., 2016, vol.116, nr. 5, p. 3029–3085), cum ar fi inflamația, leziuni de reperfuzie, leziuni prin radiație, tulburări metabolice, îmbătrânire celulară, ateroscleroză și carcinogeneza.

15 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 (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, v. 23(1), p. e98-e117).

25 Respectiv, una din direcțiile prioritare ale chimiei aplicative moderne reprezintă sinteza noilor compuși, care captează și neutralizează RSO, în special, radicalul superoxid, prevenind astfel dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, inclusiv, procesele inflamatorii în organismul uman, ateroscleroza și carcinogeneza.

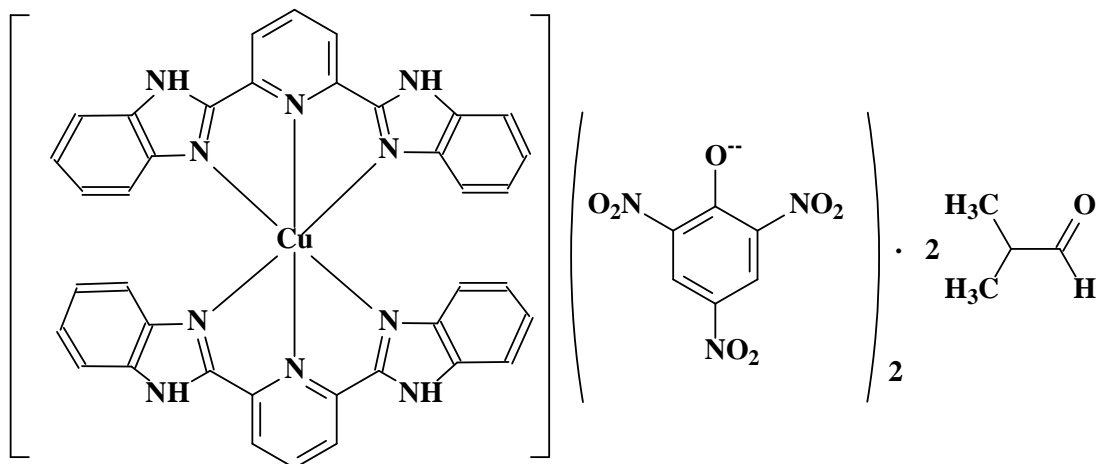
În calitate de etalon pentru determinarea activității de captare a radicalilor superoxizi se utilizează quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxiflavona) cu formula:



30 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}) constituind 16-35 $\mu\text{mol/L}$), precum și că ea poate provoca efecte secundare.

35 Din compușii chimici sintetici, care manifestă o activitate antiradicalică înaltă, descriși în literatură, cel mai înalt efect inhibitor asupra 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 [2] cu formula:

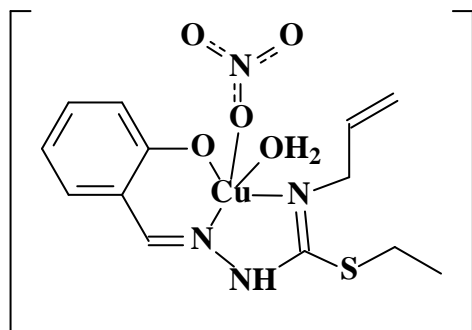


Compusul dat are concentrația semimaximală de inhibare a radicalilor superoxizi $IC_{50} = 0,99 \mu\text{mol/L}$.

5 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 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.

10 Esența invenției constă în obținerea unui inhibitor sintetic al radicalilor superoxizi în baza nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)-carbonoimidoil]-hidraziniliden}metil)fenolato]aqua-cupru cu formula:



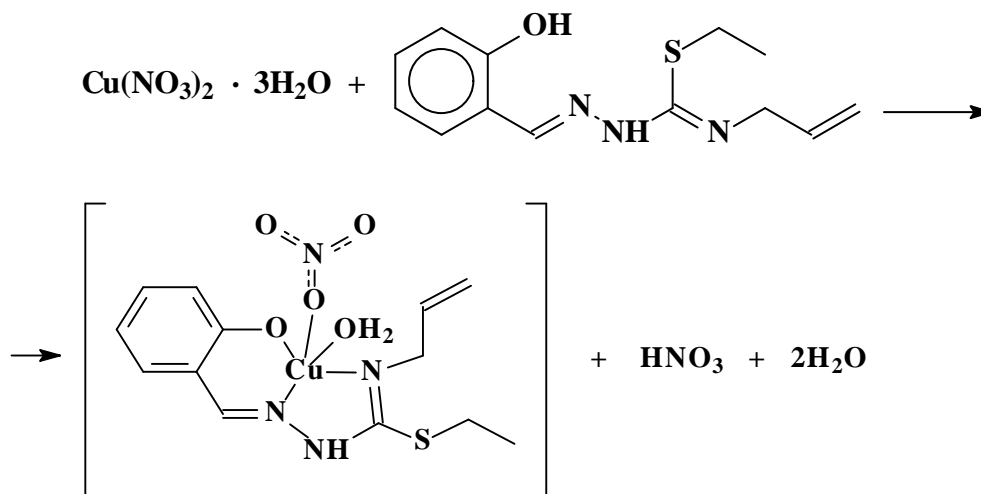
Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de sinteză nu sunt descrise în literatură.

15 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității anti-radicalice cu IC_{50} egală cu $0,86 \mu\text{mol/L}$, care este de 71,1 ori mai înaltă decât activitatea quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a radicalilor superoxizi și este de 1,15 ori mai efectiv decât soluția cea mai apropiată. Proprietatea stabilită a nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]-hidraziniliden}metil)fenolato]aqua-cupru susnumit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.

20 Analiza comparativă a nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbono-imidoil]hidraziniliden}metil)fenolato]aqua-cupru cu soluția cea mai apropiată demonstrează că ei se deosebesc prin aceea că aparțin diferitor clase de compuși coordinativi ai cuprului(II) și în compusul revendicat se realizează o combinație nouă de legături chimice.

25 Nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden}-metil)fenolato]aqua-cupru revendicat se obține la interacțiunea soluției etanolice fierbinți ($50-55^{\circ}\text{C}$) a trihidratului nitratului de cupru(II) cu etil-2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbimidotoat [4-alil-S-etilizotiosemicar-bazona 2-hidroxibenzaldehidei], luate în raport molar de 1:1. Reacția decurge în 50-60 min conform următoarei scheme:

30



Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul că în timpul sintezei, în amestecul reactant, are loc adiția la ionul de cupru(2+) a moleculei de 4-alil-S-etilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei, care joacă rolul de ligand-O,N,N tridentat monodeprotonat. Al patrulea loc în sfera internă este ocupat de atomul de oxigen al moleculei de apă, iar al cincilea loc este ocupat de un atom de oxigen al nitrat-ionului monodentat.

Exemplu de obținere a nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru.

Se amestecă 20 ml de soluție etanolică, care conține 10 mmol de etil-2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-etilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei] 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 întunecată, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu o cantitate mică de etanol, eter și uscate la aer. Randamentul produsului final alcătuiește 75% de la cel calculat teoretic.

S-a determinat, % : C -38,54; H -4,30; Cu -15,47; N -13,87; S -7,77.

Pentru $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{CuN}_4\text{O}_5\text{S}$ s-a calculat, % : C -38,47; H -4,47; Cu -15,65; N -13,80; S -7,90.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm^{-1} : 3407 ($\nu(\text{OH})$, H_2O); 3080 ($\nu(\text{N}^2\text{H})$); 1642 ($\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{ar}}$); 1600, 1548 ($\nu(\text{C}=\text{N})$); 1214 ($\nu(\text{C}-\text{O})$); 1119 ($\nu(\text{CH}_2-\text{S})$); 655 ($\nu(\text{C}-\text{S})$); 529, 510, 486, 478 ($\nu(\text{M}-\text{N})$; $\text{M}-\text{O}$).

$\mu_{\text{ef}} = 1,83$ m. B. (294K)

Procedeele de obținere a compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. Etil-2-(2-hidroxi-benziliden)-N-(prop-2-en-1-il)hidrazincarbimidotioat [4-alil-S-etilizotiosemicarbazona 2-hidroxibenzaldehidei] a fost sintetizată după metoda descrisă în (Pahontu E., Usataia I., Graur V., Chumakov Yu., Petrenk, 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, Nr. 12, p. 4544).

Complexul revendicat este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcooli alifatici, este solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.

La recristalizarea hidratului de nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru 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- $K\alpha$. Procedeele 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 patratelor 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 ($d_{\text{CH}} = 0,96$ 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 $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{ClCuN}_6\text{O}_6\text{S}_2$, grupa spațială P-1, parametrii

celulei elementare, [A]: $a = 7,4464(9)$; $b = 9,9324(7)$, $c = 12,1455(9)$; $\alpha = 92,397(6)^\circ$, $\beta = 101,133(8)^\circ$, $\gamma = 105,318(8)^\circ$.

A fost stabilit că nodul coordinativ al compusului complex investigat are structură tetragonal-piramidală distorsionată (Figura: Structura nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru).

În sfera internă a atomului central se află o moleculă de izotiosemicarbazonă tridentată, care coordonează la atomul de cupru prin atomii de oxigen fenolic deprotonat [$d(\text{Cu-O}) = 1,895 \text{ \AA}$], atomii de azot azometinic [$d(\text{Cu-N}) = 1,939 \text{ \AA}$] și azot tiocarnamic N^4 [$d(\text{Cu-N}^4) = 1,963 \text{ \AA}$], formând două metalocicluri din șase și cinci atomi. În favoarea coordinării azometinei prin atomul de azot tiocarnamic N^4 vorbește și distanța $d(\text{C-S}) = 1,748 \text{ \AA}$. Legătura dublă în molecula de izotiosemicarbazonă coordinată se află între atomii de carbon și azot N^4 [$d(\text{C}^3 - \text{N}^4) = 1,287 \text{ \AA}$]. Distanța între atomii de carbon și azot N^3 este mai lungă [$d(\text{C}^3 - \text{N}^1) = 1,362 \text{ \AA}$]. Al patrulea loc în sfera internă a atomului de cupru îl ocupă atomul de oxigen al moleculei de apă [$d(\text{Cu} - \text{O}_w) = 1,981 \text{ \AA}$], iar al cincilea loc în sfera internă a complexului este ocupat de atomul de oxigen al nitratiunii cu distanța $d(\text{Cu-O}) = 2,453 \text{ \AA}$. Alte distanțe interatomice și unghiurile de valență sunt standarde pentru compușii din această clasă.

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 nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.

Activitatea de captare a radicalului superoxid a fost determinată prin metoda spectrofotometrică, descrisă în (Fontana M., Mosca L. and Rosei M.A. Interaction of enkephalines with oxyradicals. Biochemical Pharmacology, 2001, Vol. 61. p 1253-1257; Robak J. and Gryglewski R. J. Flavonoids Are Scavengers of Superoxide Anions. Biochemical Pharmacology, 1988, Vol. 37, Nr. 5, p. 837-841) cu unele modificări.

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.

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 dublicat. 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 dublicat. Se amestecă și se măsoară absorbanta la 560 nm [A_0]. 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 [A_1]. 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:

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

Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților inhibitoare ale nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden}metil)-fenolato]aquacupru sunt prezentate în Tabel, din care se observă, că el manifestă activitate anti-radicalică cu IC_{50} egală cu 0,86 $\mu\text{mol/L}$, care este de 71,1 ori mai înaltă decât a quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a radicalilor superoxizi și este de 1,15 ori mai efectiv decât soluția cea mai apropiată.

Proprietățile depistate ale nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carbonoimidoil]hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori sintetici ai radicalilor superoxizi.

55

Activitatea anti-radicalică a compusului revendicat în comparație cu quercetina și soluția cea mai apropiată

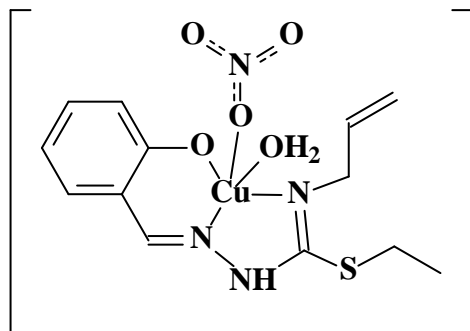
Compusul	IC ₅₀ , μmol/L
Quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxiflavona) [1]	61,86
Bis(2,4,6-trinitrofenolatului) de bis[2,2'-piridin-2,6-diil-kN)-bis-1H-benzimidazol]-cupru(II) bis(N,N-dimetilformamid) solvatul (prototipul)	0,99
Nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carboimidoil]-hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru	0,86

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

- 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, v. 64(24), p. 4383-4396
- Khanduja K.L., Bhardwaj A. Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids. *Indian J.Biochem.Biophys.*, 2003, v. 40, p. 416-422

(57) Revendicări:

- Compusul nitrato-[2-({2-[(etilsulfanil)(prop-2-en-1-il)carboimidoil]hidraziniliden}metil)fenolato]aquacupru cu formula:



- Compus conform revendicării 1, care manifestă activitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.

