



MD 4741 C1 2021.09.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4741** (13) **C1**(51) Int.Cl.: A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/48 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

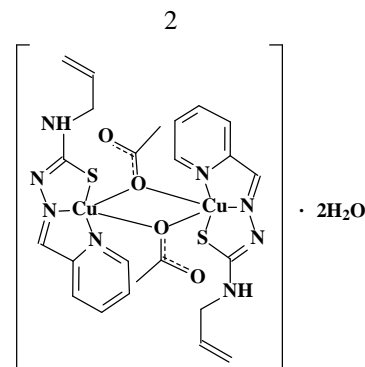
<p>(21) Nr. depozit: a 2019 0053 (22) Data depozit: 2019.06.24</p> <p>(41) Data publicării cererii: 2020.12.31, BOPI nr. 12/2020</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.02.28, BOPI nr. 2/2021</p>
<p>(71) Solicitanți: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: GUDUMAC Valentin, MD; GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; PANTEA Valeriana, MD; GRAUR Vasiliu, MD; ANDRONACHE Lilia, MD</p> <p>(73) Titulari: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

(54) Utilizarea bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi

(57) Rezumat:

Invenția se referă la medicină, și anume la utilizarea unui compus coordinativ de cupru biologic activ din clasa tiosemicarbazidaților metalelor de tranziție. Acest compus poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat care, inhibând radicalii superoxizi în organism, previne dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, ateroscleroza și carcinogeneza.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi a bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului cu formula:



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

Revendicări: 1

Figuri: 1

MD 4741 C1 2021.09.30

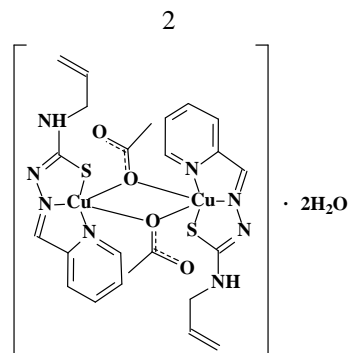
(54) Use of bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-yl-*N'*-(pyridin-2-ylmethylidene)carbamohydrazone]thioato}copper} dihydrate as an inhibitor of superoxide radicals

(57) Abstract:

1

The invention relates to medicine, namely to the use of a biologically active copper coordination compound from the class of transition metal thiosemicarbazidates. This compound can be used in medicine as a drug which, by inhibiting superoxide radicals in the body, prevents the development of cellular and tissue lesions, atherosclerosis and carcinogenesis.

Summary of the invention consists in the use as an inhibitor of superoxide radicals of bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-yl-*N'*-(pyridin-2-ylmethylidene)carbamohydrazone]thioato}copper} dihydrate of the formula:



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

Claims: 1

Fig.: 1

(54) Применение бис(μ_2 -ацетато-*O*)-бис{[*N*-проп-2-ен-1-ил-*N'*-(пиридин-2-илметилиден)карбамогидразонотиоато]медь} дигидрата в качестве ингибитора супероксидных радикалов

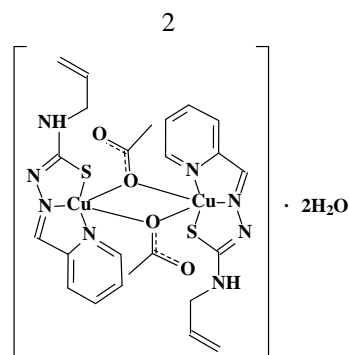
(57) Реферат:

1

Изобретение относится к медицине, а именно к применению биологически активного координационного соединения меди класса тиосемикарбазидатов переходных металлов. Это соединение может найти применение в медицине в качестве препарата который, ингибируя супероксидные радикалы в организме, предотвращает развитие клеточных и тканевых поражений, атеросклероз и карциногенез.

Сущность изобретения заключается в применении в качестве ингибитора супероксидных радикалов бис(μ_2 -ацетато-*O*)-

бис{[*N*-проп-2-ен-1-ил-*N'*-(пиридин-2-илметилиден)карбамогидразонотиоато]медь} дигидрата формулы:



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

П. формулы: 1

Фиг.: 1

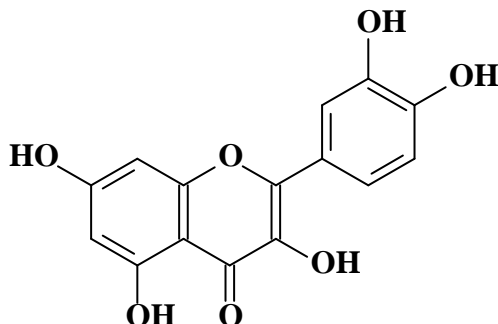
Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea complexului de cupru din
 clasa tiosemicarbazidaților metalelor de tranziție. Acest complex manifestă activitate antiradicalică
 și poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat care, inhibând radicalii superoxizi în
 organism, previne dezvoltarea leziunilor celulare și tisulare, ateroscleroza și carcinogeneza.

10 Radicalul superoxid O_2^- (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 și cancerul [Maan Hayyan, Mohd Ali Hashim, Inas
 M.AINashef. Superoxide Ion: Generation and chemical implications. Chem. Rev., 2016, vol.116
 (5), p. 3029-3085]. Excesul de RSO în organismul uman poate contribui la fibroză alveolară,
 displazie bronhopulmonară, sindrom de detresă respiratorie, dezvoltarea cataractei și în etiologia
 îmbătrânirii. În afară de aceasta, RSO este o specie derivată din oxigen, care este potențial
 15 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
 20 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].

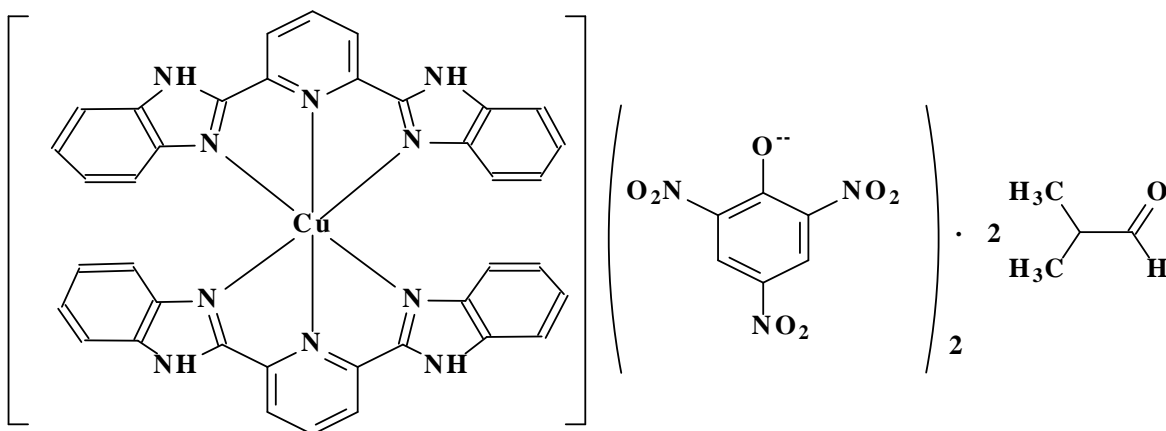
În calitate de etalon pentru determinarea activității inhibitoare a radicalilor superoxizi în
 medicină se utilizează quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxiflavona) cu formula:



25 care reprezintă un flavonol natural [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.

30 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:

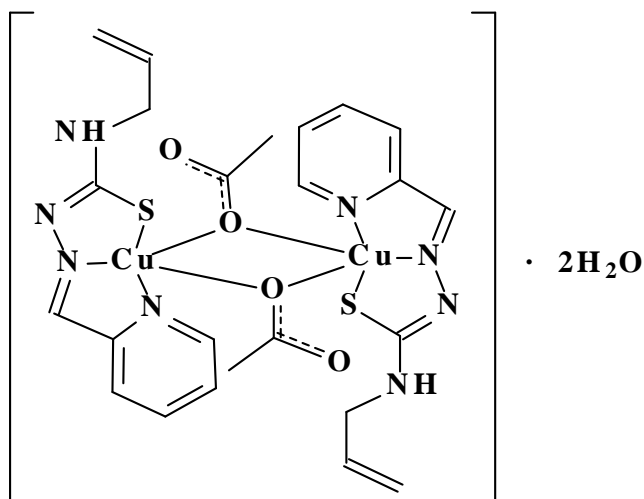


Compusul dat are concentrația semimaximală de inhibare a radicalilor superoxizi $IC_{50} = 0,99 \mu\text{mol/L}$.

Dezavantajul 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.

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

Esența invenției constă în utilizarea bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului cu formula:



10 in calitate de inhibitor sintetic al radicalilor superoxizi.

Compusul dat, proprietățile lui și procedeul de sinteză sunt descrise în literatură [Graur V. Designul și sinteza compușilor biologic activi ai metalelor 3d cu 4-alilcalcogensemicarbazone și derivații lor. Teză de doctor în științe chimice, Universitatea de Stat din Moldova, 2017, p. 89].

15 Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității antiradicalice cu IC_{50} egală cu $0,35 \mu\text{mol/L}$, care este de 176,7 ori mai înaltă decât activitatea quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a radicalilor superoxizi și este de 2,8 ori mai efektiv decât prototipul. Proprietatea stabilită a bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului sus-

20 numit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.

Analiza comparativă a bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului cu prototipul 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 deja cunoscute.

25 Procedeul de obținere al compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile [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), e4544]. Complexul revendicat este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcooli alifatici, este solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubil în eter.

35 A fost stabilit (figura, structura compusului coordinativ), că compusul investigat reprezintă un dimer coordinativ, în care fragmentul elementar reprezintă un complex de cupru(II) cu structură tetragonal-piramidală distorsionată. În sfera internă a atomului central se află o moleculă de tiosemicarbazonă tridentată, care coordonează la atomul de cupru prin atomii de azot piridinic [$d(\text{Cu-N}) = 2,059 \text{ \AA}$], azometinic [$d(\text{Cu-N}) = 1,970 \text{ \AA}$] și atomul de sulf în forma tiolică deprotonată [$d(\text{Cu-S}) = 1,736 \text{ \AA}$], formând două metalocicluri din cinci atomi. Legătura dublă în molecula de izotiosemicarbazonă coordonată este delocalizată între atomii de carbon și azot N^4 [$d(\text{C}^3 - \text{N}^4) = 1,337 \text{ \AA}$] și carbon și azot N^3 [$d(\text{C}^3 - \text{N}^3) = 1,334 \text{ \AA}$]. Al patrulea și al cincilea locuri

40 în sfera internă a atomului de cupru îl ocupă doi atomi de oxigen ai acetat-ionilor cu distanțele $d^1(\text{Cu-O}) = 1,954 \text{ \AA}$ și $d^2(\text{Cu-O}) = 2,429 \text{ \AA}$. În sfera exterioară a dimerului complex se află două molecule de apă de cristalizare, care formează legături de hidrogen cu dimerul coordinativ. Alte distanțe interatomice și unghiurile de valență sunt standarde pentru compușii din această clasă.

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

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

5 **Exemplu al utilizării al bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului în calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.**

10 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 enkephalines with oxyradicals. Biochemical Pharmacology, 2001, vol. 61, p. 1253-1257] cu unele modificări.

15 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.

20 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 μ M/L. Apoi, se pipetează câte 20 μ L 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 μ L 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 duplicat. Se amestecă și se măsoară absorbanta la 560 nm [A₀]. Apoi, în toate godeurile se adaugă câte 20 μ L de soluție de 8,0 μ M 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

25 substanță de referință se folosește quercetina în concentrațiile 0,1; 1,0; 10,0; 100 μ M/L.

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

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

30 Datele experimentale obținute privind studierea proprietăților inhibitoriale ale bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului sunt prezentate în Tabel, din care se observă, că el manifestă activitate antiradicalică cu IC₅₀ egală cu 0,35 μ mol/L, care este de 176,7 ori mai înaltă decât activitatea quercetinei, utilizată în calitate de etalon pentru determinarea activității de inhibare a radicalilor superoxizi și este de 2,8 ori mai efectiv decât prototipul.

Tabel

35 Activitatea antiradicalică a compusului revendicat în comparație cu quercetina și prototipul

Compusul	IC ₅₀ , μ mol/L
Quercetina (3,3',4,5,6-pentahidroxiflavona) [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) solvatul (prototipul) [2]	0,99
Bis(μ_2 -acetato- <i>O</i>)-bis{[<i>N</i> -prop-2-en-1-il- <i>N'</i> -(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidrat	0,35

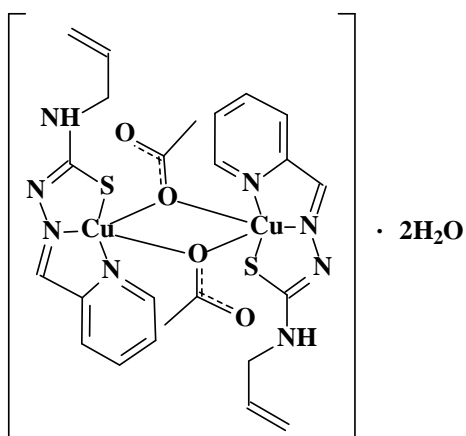
Proprietățile depistate ale bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului prezintă interes pentru medicină din punct de vedere al extinderii arsenalului de inhibitori sintetici ai radicalilor superoxizi.

(56) Referințe bibliografice citate in 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:

Utilizarea bis(μ_2 -acetato-*O*)-bis{[*N*-prop-2-en-1-il-*N'*-(piridin-2-ilmetiliden)carbamohidrazonotioato]cupru} dihidratului cu formula:



in calitate de inhibitor al radicalilor superoxizi.

