



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00687

(22) Data de depozit: 17/09/2018

(41) Data publicării cererii:
30/08/2019 BOPI nr. 8/2019

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN
BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• VELESCU BRUNO ȘTEFAN,
STR.NEAGOE VODĂ NR.53, BACĂU, BC,
RO;
• UIVAROSI VALENTINA,
BD. ALEXANDRU OMBREGIA NR. 31, BL. 15,
SC. 2, ET. 4, AP. 49, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ANUȚA VALENTINA, STR.ROTUNDĂ
NR.4, BL.Y1, SC.Z, ET.1, AP.10, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• ȘEREMET OANA CRISTINA,
CALEA GIULEȘTI, NR.43, BL.14A, SC.1,
ET.6, AP.23, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• NIȚULESCU GEORGE MIHAI,
ȘOS.OLTENIȚEI NR.40-44, BL.6A, SC.4,
ET.7, AP.145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• LUPULIASA DUMITRU,
STR. GEN. IOAN CULCER NR. 28A,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ARSENE ANDREEA LETIȚIA,
STR.ÎNVIŢĂTORILOR NR.19, ET.1, AP.2,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• DINU PÂRVU CRISTINA ELENA,
STR. GH.LAZĂR, NR.10, ET.1, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPLEX DE RUTENIU (III) CU ACȚIUNE
ANTIINFLAMATOARE, ȘI PROCEDEU DE SINTEZĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui complex Ruteniu (III)-feronă cu acțiune antiinflamatoare. Procedeu conform invenției constă în dizolvarea ligandului în apă, la care se adaugă o soluție apoasă saturată de $\text{RuCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$, în raport molar ligand:ion metalic de 1:2, și o soluție 2M NaOH, pentru ajustarea valorii pH la 8, răcirea amestecului pe baie de gheață, adăugarea de etanol, menținerea la temperatura de 4°C timp de 2 h, după însămânțare, filtrarea

precipitatului, urmată de spălare și uscare la exicator, rezultând un complex Ru (III)-feronă într-un raport de combinare 1:2, cu formula $\text{Ru}(\text{C}_9\text{H}_5\text{INO}_4\text{S})_2\text{Cl}$ și masa $M = 836,72 \text{ g/mol}$, având efect de reducere semnificativă a proceselor globale inflamatorii.

Revendicări: 3
Figuri: 3



COMPLEX DE RUTENIU(III) CU ACȚIUNE ANTIINFLAMATOARE ȘI PROCEDEU DE SINTEZĂ

Velescu Bruno Ștefan, Uivarosi Valentina, Anuța Valentina, Șeremet Oana Cristina,
Nițulescu George Mihai, Lupuliasa Dumitru, Arsene Andreea Letiția, Dinu Pîrvu Cristina
Elena

Invenția se referă la un compus de ruteniu(III), procedeu de sinteză și acțiunea antiinflamatoare cu potențial terapeutic.

Inflamația este un simptom asociat bolilor cu prevalență ridicată [Paoletti R și colab., *Vasc Health Risk Manag.*, **2006**; 2(2):145-152.]. Terapiile medicamentoase adresate acestor afecțiuni sunt însoțite de reacții adverse care creează disconfort pacienților, reduc calitatea vieții și pot conduce la întreruperea tratamentului [Roman G și colab., *Acta Endo(Buc)*, **2015**; 11(1):64-72].

Numeroase studii demonstrează efectul antiinflamator al unor complecși cu metale tranziționale, cel mai cunoscut exemplu fiind cel al compușilor cu aur (aurotiomalat de sodiu, aurotioglucoza și aurotiopropanol sulfonat de sodiu), utilizați în artrita reumatoidă [Rafique S și colab., *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **2010**; 5(2):38-45], dar care datorită toxicității renale crescute sunt din ce în ce mai puțin folosiți. Dintre complecșii metalelor tranziționale, cei ai ruteniului prezintă toxicitate scăzută [Allardyce CS și colab., *Platinum Metals Rev.*, **2001**; 45(2):62-69] deoarece prin complexare cu diverse substanțe active, se reduc reacțiile adverse (de exemplu complexul diruteniu-ibuprofen cu activitate antiinflamatoare similară cu cea a ibuprofenului, prezintă avantajul diminuării semnificative a reacțiilor adverse digestive [Andrade S și colab., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2000**; 81:23-27]). De asemenea, asocierea ruteniului cu liganzi lipsiți de proprietăți antiinflamatoare permite obținerea de complecși cu astfel de acțiune biologică (complecși de ruteniu cu acid nicotinic/izonicotinic) [Freitas CS și colab., *J Med Chem.*, **2015**; 58(11):4439-4448].

Invenția de față se referă la sinteza și caracterizarea unui complex nou al ruteniului(III) cu acidul 8-hidroxi-7-iodo-5-chinolinsulfonic (ferona) și la evaluarea proprietăților antiinflamatoare în vederea utilizării ca tratament în patologii cu astfel de componentă. Obiectul invenției constă într-un procedeu de sinteză, caracterizarea fizico-chimică a complexului și evaluarea activității antiinflamatoare prin model experimental pe șobolan.

Complexul, conform invenției, se prezintă ca o pulbere verde-brună, microcristalină, solubilă în apă.

Procedeul de sinteză conform invenției presupune încălzire și evaporare aproape de sec a amestecului de reacție, urmată de precipitare cu ajutorul unui solvent de polaritate diferită.

Pentru caracterizarea fizico-chimică s-au folosit analiza elementală (C, H, N, S) și metode spectrale (spectrometrie infraroșu (IR), UV-Vis, de masă). Acțiunea antiinflamatoare a fost evaluată prin metoda pletismometrică, în două modele experimentale de inducere a inflamației la șobolani (caraghenan și caolin).

Avantajele aplicării invenției sunt:

- complex nou ruteniu(III)-feronă, hidrosolubil
- procedeu de sinteză care utilizează solvenți netoxici pentru om și nepoluanti;
- valorificarea unui complex nou al ruteniului cu ferona, ce prezintă proprietăți antiinflamatoare evidente;

Descrierea pe scurt a figurilor:

- fig.1 - 2 prezintă spectrele IR, UV-Vis ale complexului ruteniu(III)-feronă
- fig.3 prezintă evaluarea acțiunii antiinflamatoare a complexului ruteniu(III)-feronă.

În continuare invenția este ilustrată printr-un exemplu nelimitativ de realizare.

Materiale

Materiale: $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Ferona, Etanol, NaOH. Reactivii prezintă puritate de analiză

Metoda de sinteză

2 mmoli feronă se dizolvă într-o cantitate corespunzătoare de apă, după care se adaugă o soluție apoasă saturată de 1 mmol $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Amestecului i se ajustează valoarea pH-ului la 8, cu ajutorul unei soluții 2M NaOH, se aduce aproape de sec pe baie de apă, este răcit pe baie de gheață și apoi se adaugă o cantitate de aprox. 20 mL etanol. După însămânțare, se lasă la rece (4°C) timp de 2 ore. Precipitatul obținut se filtrează la vid și se spală cu etanol până când apele de spălare sunt incolor. Produsul final este uscat la exicator.

Caracterizarea fizico-chimică

Analiza elementală C, H, N, S (Perkin-Elementer 2400 Series II CHNS/O Analyzer)

Ru(III)-ferona raport de combinare 1:2. Calculat (%): C 25,84, H 1,21, N 3,35, S 7,66. Găsit: C 25,80, H 1,28, N 3,29, S 7,68. Formulă identificată: $\text{Ru}(\text{C}_9\text{H}_5\text{INO}_4\text{S})_2\text{Cl}$ ($M = 836,72$ g/mol).

Analiza spectrală

Spectrele IR (Spectrometru Jasco 4200 FTIR)

Atribuirea principalelor benzi caracteristice

Compus	C-O fenolic	C-O fenolic	SO ₃ H	SO ₃ H	C-I	C=N-C (aromatic)
Ferona	1458	1211	1041	1297	530	1619
Ru(III)-ferona	1440	1230	1040	1307	534	1697

Se observă coordinare prin N și legătura prin atomul de O deprotonat (absentă banda 3300)

Spectrele UV-Vis (Spectrometru Jasco V 650)

Tabel II

Poziția benzilor de absorbție în spectrele UV-Vis ale feronei și complexului cu Ru(III)

Compusul	λ_{max} (nm)			
Feronă	252	312 (umăr)	379,5	
Ru(III)-feronă	258	314 (umăr)	400-900 nm bandă largă	

Spectrul UV-Vis al feronei prezintă maxime de absorbție la 252 nm, 312 nm (umăr) și 379,5 nm, datorate tranzițiilor $\pi - \pi^*$. În spectrul complexului banda de la 252 nm prezintă o deplasare batocromică de 6 nm, în timp ce umărul de la 312 nm este prezent aproape nemodificat. Principala modificare în spectrul complexului comparativ cu spectrul ligandului o constituie prezența unor benzi largi în domeniul vizibil, cu maxime la 420-447 nm. Acestea rezultă prin suprapunerea benzilor datorate tranzițiilor $\pi - \pi^*$ cu cele datorate transferului de sarcină. În spectrul complexului Ru(III) feronă, umărul de intensitate mai redusă de la 733 nm se poate atribui tranziției interzise de spin $^2T_2 \rightarrow ^4T_1$.

Spectrele de masă (Thermo Finnigan MAT-900S mass spectrometer with FAB (Cs-gun, Thermo-Finnigan) au fost realizate utilizând o sursă de ionizare pozitivă.

Tabel III

Valorile nominale m/z în urma ionizării în mod pozitiv a complexului Ru(III)-feronă

Valoare nominală m/z	Ion pozitiv
352,12	$[\text{Hferron} + \text{H}]^+$
486,62	$[\text{Ru}(\text{ferron})\text{Cl}]^+$
504,63	$[\text{Ru}(\text{ferron})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$
522,64	$[\text{Ru}(\text{ferron})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_2]^+$
540,65	$[\text{Ru}(\text{ferron})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_3]^+$
663,4	$[\text{Ru}(\text{ferron}-\text{SO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^+$

Evaluarea proprietăților antiinflamatoare

Pentru evaluarea *in vivo* a proprietăților antiinflamatoare ale complexului Ru(III)-feronă, s-a utilizat metoda pletismometrică de evaluare a edemului labei de șobolan, indus cu 2 agenți inflamatori (carrageenan și caolin) [Olar R și colab., *JTAC*, **2017**; 127(1):685-696; Hovaneț MV și colab., *Farmacia*, **2016**; 64(5):802-808]), care după administrarea intraplanară produc inflamație prin mecanisme distincte. Edemul rezultat după administrarea intraplanară a carrageenanului este datorat eliberării, la locul de administrare, a prostaglandinelor proinflamatorii [Hovaneț MV și colab., *Farmacia*, **2016**; 64(5):802-808]. Edemul rezultat după administrarea intraplanară a caolinului are la bază eliberarea de citokine proinflamatoare (interleukina (IL)-1 β , IL-6 și factorul de necroză tumorală (TNF) α) [Camargo LL și colab., *Neuroimmunomodulation*, **2015**; 22(6):373-384].

Descrierea materialelor și a metodei de inducere a inflamației

Materiale:

Soluții și reactivi:

- Soluție carrageenan 1% (λ Carrageenan, Sigma(R));
- Suspensie caolin 10% (Caolin, Health Chemicals Co., Ltd. (China));
- Soluție diclofenac sodic 1% (Diclofenac, Sigma(R))
- Soluție uretan 13% (Uretan, Sigma(R));
- Complex Ru(III)-ferona.

Aparatură:

Pletismometru : Ugo Basile Plethysmometer Cat. No. 7140

Specificații ale aparatului: cuve cu apă: 3,5cm pentru șobolani; rezoluția aparatului: 0,01 mL.

Animale:

Au fost folosiți 48 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu greutatea 212 ± 48 g.

Animalele aduse din crescătorie au fost lăsate timp de 3 zile să se obișnuiască cu noul habitat. Hrana (granule pentru rozătoare, Institutul Cantacuzino, București) a fost administrată *ad libitum*. Apa a fost administrată *ad libitum*, din biberoane.

Animalele au fost ținute în condiții de umiditate și temperatură monitorizate cu un termohigrometru. Valorile înregistrate au fost cuprinse între 35-45% pentru umiditate și 20-22°C pentru temperatură.

Inducerea inflamației:

S-au utilizat doi agenți de inducere a inflamației cu carrageenan și, respectiv, caolin, care s-au administrat intraplanar, în laba dreaptă a animalelor.

Înainte și la 1, 2, 3, 4, 5 și 24 de ore de la inducerea inflamației s-a determinat volumul labei șobolanilor, respectiv a edemului indus.

Protocolul de lucru:

48 de șobolani masculi, sușa Wistar, cu greutatea 212 ± 48 g, au fost împărțiți în 6 loturi de 8 animale, care au primit următoarele tratamente:

- **Lotul 1-car:** apă distilată, în volum de 1 mL/100g corp, intraperitoneal.
- **Lotul 2-car:** diclofenac, în doză de 50 mg/kg corp, soluție 0,5%, intraperitoneal.
- **Lotul 3-car:** complex ruteniu(III)-feronă, 50 mg/kg corp, sol 0,5%, intraperitoneal.
- **Lotul 1-ca:** apă distilată, în volum de 1 mL/100g corp, intraperitoneal.
- **Lotul 2-ca:** diclofenac, în doză de 50 mg/kg corp, soluție 0,5%, intraperitoneal.
- **Lotul 3-ca:** complex ruteniu(III)-feronă, 50 mg/kg corp, sol 0,5%, intraperitoneal.

După administrarea substanțelor, animalele au fost anesteziate cu uretan 1,3 g/kg corp, administrat i.p., sub formă de soluție apoasă de concentrație 13%.

După instalarea anesteziei generale s-a determinat volumul inițial al labei șobolanilor.

Următorul pas al protocolului a fost inducerea inflamației labei șobolanului prin administrarea intraplantară de 0,2 mL agent inflamator.

După administrarea agentului inflamator s-a urmărit evoluția edemului indus la următorii timpi: 1, 2, 3, 4, 5, 24 ore.

Pentru evaluarea acțiunii antiinflamatoare a complexului ruteniu(III)-feronă s-a folosit ca substanță de referință diclofenacul (antiinflamator nesteroidian eficient în inflamația indusă cu carrageenan sau caolin [Olar R și colab., *JTAC*. **2017**;127(1):685-696; Hovaneț MV și colab., *Farmacia*, **2016**; 64(5):802-808]).

Calculul statistic:

Rezultatele sunt exprimate ca Medie $\pm$ Deviație Standard.

Analiza statistică s-a realizat cu ajutorul programului GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Interpretarea statistică a rezultatelor s-a realizat după următorul algoritm:

1. S-a verificat dacă distribuția rezultatelor este normală (gaussiană):
 - a. Dacă distribuția rezultatelor a fost normală s-a trecut la pasul 2;

28

b. Dacă distribuția rezultatelor nu a fost normală s-a aplicat testul de excludere a valorilor extreme prevăzut în Farmacopeea Română Ed. X (FRX) (xxx. Farmacopeea Română, ediția a X-a, Editura Medicală, București, 1993.).

2. Pentru interpretarea statistică a setului de date rezultat în urma verificării normalității, s-au aplicat teste parametrice (t-student, ANOVA pe o cale) de evidențiere a diferențelor dintre medii.

Rezultatele testelor statistice de discriminare aplicate prezintă un interval de încredere de 95%, iar semnificația statistică a fost considerată pentru $p < 0,05$.

Evoluția procentuală a inflamației s-a calculat după formula următoare:

$$\% = \frac{V_{xh} - V_0}{V_0} \times 100,$$

unde V_0 este volumul inițial al labei de șobolan, iar V_{xh} este volumul labei de șobolan la momentul determinării.

Rezultatele evaluării acțiunii antiinflamatoare a Complexului Ru(III)-feronă

În tabele IV și V sunt prezentate rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor față de valorile inițiale, înainte de administrarea agentului inflamator, pentru carrageenan și respectiv caolin.

Tabel IV

Rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor față de valorile inițiale (înainte de administrarea carrageenanului)

	V0 (mL)	V1h (mL)	V2h (mL)	V3h (mL)	V4h (mL)	V5h (mL)	V24h (mL)
Lot 1-car	1,31±0,11	1,89±0,18	1,92±0,14	1,90±0,15	1,99±0,14	2,12±0,24	1,95±0,15
Test t, p		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Lot 2-car	1,28±0,11	1,78±0,22	1,79±0,15	1,79±0,20	1,80±0,20	1,83±0,22	1,77±0,27
Test t, p		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Lot 3-car	1,27±0,16	1,61±0,21	1,49±0,19	1,42±0,18	1,52±0,11	1,43±0,18	1,48±0,11
Test t, p		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Tabel V

Rezultatele determinărilor pletismometrice și interpretarea statistică a rezultatelor față de valorile inițiale (înainte de administrarea caolinului)

	V0 (mL)	V1h (mL)	V2h (mL)	V3h (mL)	V4h (mL)	V5h (mL)	V24h (mL)
Lot 1-caol	1,28±0,10	1,70±0,29	1,84±0,27	1,80±0,29	1,84±0,34	1,90±0,32	1,74±0,27
Test t, p		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Lot 2-caol	1,24±0,07	1,70±0,10	1,78±0,11	1,74±0,10	1,87±0,10	1,91±0,06	1,78±0,17
Test t, p		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Lot 3-caol	1,35±0,19	1,67±0,25	1,59±0,22	1,56±0,25	1,55±0,20	1,59±0,23	1,72±0,19
Test t, p		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Pe tot parcursul experimentului volumul edemului indus nu revenit la valorile bazale.

Evoluția comparativă a procesului inflamator este redată în figura 3 A și B.

Procesele globale inflamatorii au diferit (ANOVA, $p < 0,05$) indicând mecanisme diferite de acțiune pentru substanțele testate față de lotul martor.

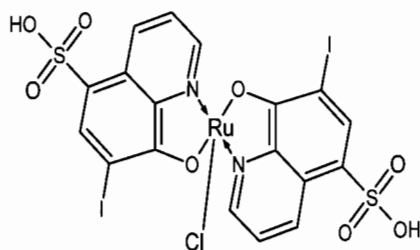
În urma analizei statistice a evoluției % comparative pentru cele două procese inflamatorii se constată efect antiinflamator pentru loturile de animale care au primit complexul Ruteniu(III)-feronă, pe toată durata experimentului. Semnificație statistică a fost înregistrată pentru:

- carrageenan
 - pe toată durata experimentului (test t, $p < 0,05$) față de lotul martor tratat cu apă distilată
 - 1, 2, 3, 4 și 5 ore (test t, $p < 0,05$) față de lotul de referință tratat cu diclofenac
- caolin
 - 2, 3, 4 și 5 ore (test t, $p < 0,05$) față de lotul martor tratat cu apă distilată
 - 1, 2, 3, 4 și 5 ore (test t, $p < 0,05$) față de lotul de referință tratat cu diclofenac

Reducerea semnificativă a edemului local de către complexul ruteniu(III)-feronă presupune o intervenție în expresia prostaglandinelor și citokinelor proinflamatorii.

REVENDICĂRI

1. Complex ruteniu(III)-ferona, cu structura:



2. Procedeu de sinteză pentru compusul definit la revendicarea 1, caracterizat de faptul că ligandul se dizolvă într-o cantitate corespunzătoare de apă, la care se adaugă o soluție apoasă saturată de $\text{RuCl}_3 \cdot x \text{nH}_2\text{O}$, în raport molar ligand:ion metallic: 1:2. Amestecului i se ajustează valoarea pH-ului la 8, cu ajutorul unei soluții 2M NaOH, se aduce aproape de sec pe baie de apă, este răcit pe baie de gheață și apoi se adaugă o cantitate de aprox. 20 mL etanol. După însămânțare, se lasă la rece (4°C) timp de 2 ore. Precipitatul obținut se filtrează la vid și se spală cu etanol până când apele de spălare sunt incolore. Produsul final este uscat la exicator.

3. Complex Ruteniu(III)-feronă, conform revendicărilor 1 și 2 cu efect antiinflamator.

Figura 1. Spectre FTIR suprapuse (Feronă - roșu, complex Ru(III)-feronă - albastru)

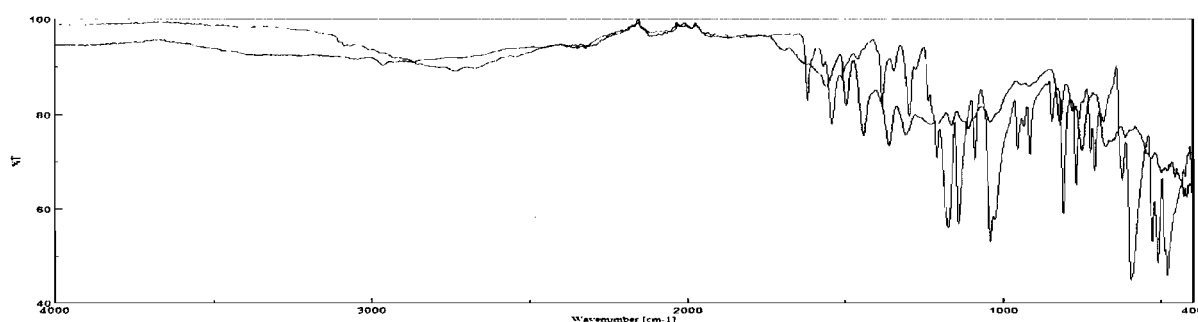


Figura 2. Spectre UV-Viz suprapuse (Feronă – verde, complex Ru(III)-feronă-albastru)

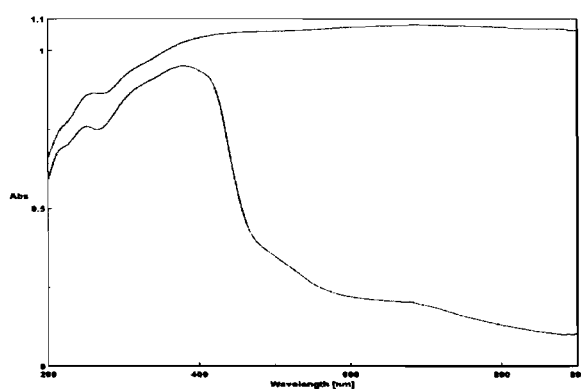
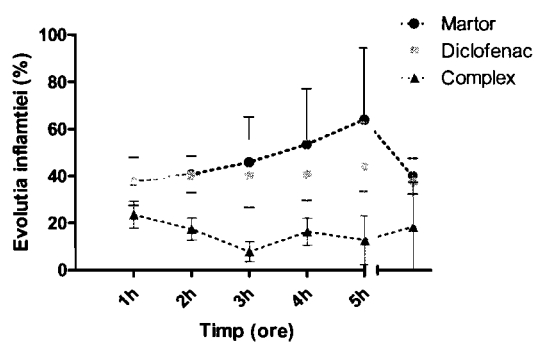
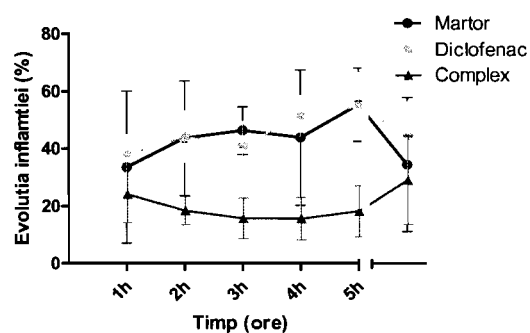


Fig. 3. Efectul complexului ruteniu(III)-feronă asupra inflamației generate de carrageenan (A) și de caolin (B) comparativ cu lotul tratat cu diclofenac: 1 - lotul tratat cu apă; 2 - lotul tratat cu diclofenac; 3 - lotul tratat cu ruteniu(III)-feronă.



A



B