



MD 4671 B1 2020.01.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4671** (13) **B1**
(51) Int.Cl: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07C 31/20 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

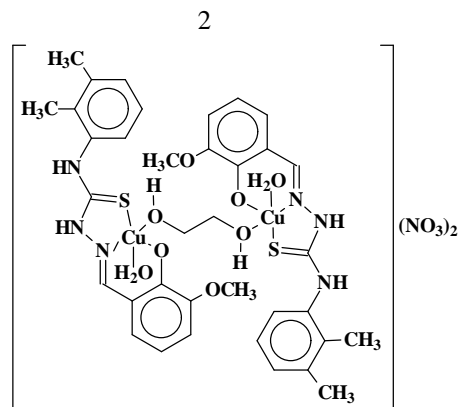
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2018 0084 (22) Data depozit: 2018.09.24	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.01.31, BOPI nr. 1/2020
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; CRUDU Valeriu, MD; ȚAPCOV Victor, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Inhibitor de proliferare a micobacteriilor tuberculozei H₃₇R_v in baza nitratului de (μ-etan-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimetilfenil)-2-(oxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbonotioamido(1-)]aquacupru(II)}

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină și anume la un compus coordinativ biologic activ de cupru din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acest complex inhibă procesele de proliferare a micobacteriilor tuberculozei H₃₇R_v și poate găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratarea tuberculozei.

Conform invenției, se revendică compusul nitratul de (μ-etan-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimetilfenil)-2-(oxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbonotioamido(1-)]aquacupru(II)} cu formula:



care inhibă procesele de proliferare a micobacteriilor tuberculozei H₃₇R_v.

Compusul extinde arsenalul de inhibitori ai proliferării *Mycobacterium tuberculosis* cu activitate biologică înaltă.

Revendicări: 2

Figuri: 1

MD 4671 B1 2020.01.31

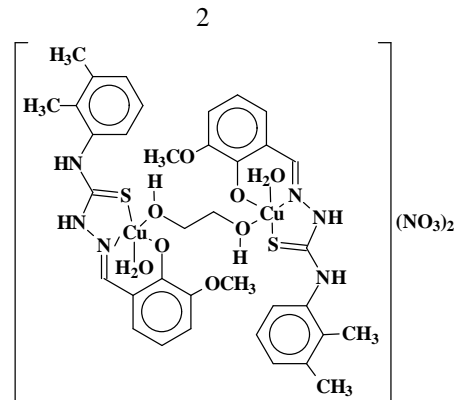
(54) Mycobacterium tuberculosis H₃₇R_v proliferation inhibitor based on (μ-ethane-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimethylphenyl)-2-(oxy-3-methoxybenzylidene)hydrazinecarbothioamido(1-)]aquacopper(II)} nitrate

(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 thiosemicarbazones. This complex inhibits the mycobacterium tuberculosis H₃₇R_v proliferation processes and can be used in medicine for the prevention and treatment of tuberculosis.

According to the invention, claimed is (μ-ethane-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimethylphenyl)-2-(oxy-3-methoxybenzylidene)hydrazinecarbothioamido(1-)]aquacopper(II)} nitrate compound of the formula:



which inhibits the mycobacterium tuberculosis H₃₇R_v proliferation processes.

The compound expands the arsenal of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation inhibitors with high biological activity.

Claims: 2

Fig.: 1

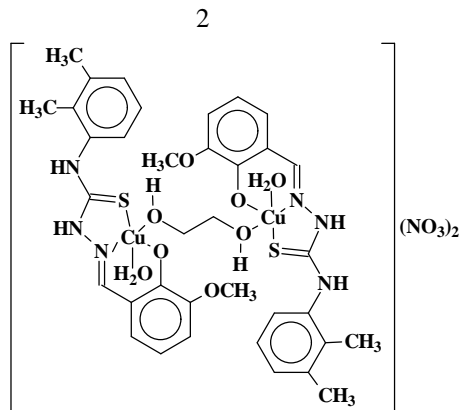
(54) Ингибитор размножения микобактерий туберкулеза H₃₇R_v на основе нитрата (μ-этан-1,2-диол-O,O')-бис{[N-(2,3-диметилфенил)-2-(окси-3-метоксибензилиден)гидразинкарботиоамидо(1-)]аквамеди(II)}

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активному координационному соединению меди класса тиосемикарбазонатов переходных металлов. Этот комплекс ингибирует процессы размножения микобактерий туберкулеза H₃₇R_v и может найти применение в медицине при профилактике и лечении туберкулеза.

Согласно изобретению, заявляется соединение нитрат (μ-этан-1,2-диол-O,O')-бис{[N-(2,3-диметилфенил)-2-(окси-3-метоксибензилиден)гидразинкарботиоамидо(1-)]аквамеди(II)} формулы:



которое ингибирует процессы размножения микобактерий туберкулеза H₃₇R_v.

Соединение расширяет арсенал ингибиторов размножения *Mycobacterium tuberculosis* с высокой биологической активностью.

П. формулы: 2

Фиг.: 1

Descriere:
(Descrierea se publică în redacția solicitantului)

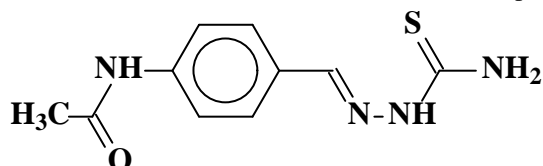
5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ biologic activ de cupru, din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acest complex inhibă procesele de proliferare a micobacteriilor tuberculozei H₃₇R_V și poate găsi aplicare în medicină la profilaxia și tratarea tuberculozei.

10 Deși agentul tuberculozei (*Mycobacterium tuberculosis*) a fost descoperit cu peste 100 ani în urmă, iar preparatele antituberculoase cu eficacitate mare sunt disponibile de peste jumătate de secol, infecția tuberculoasă rămâne și astăzi pentru cea mai mare parte a populației planetei un pericol de sănătate publică, fiind o boală cu o morbiditate și o letalitate înaltă. Suferințele cauzate populației de către *Mycobacterium tuberculosis* sunt extrem de mari și depășesc suma daunelor provocate de toate celelalte bacterii, luate împreună.

15 Tratamentul antituberculos, considerat ca una din metodele principale de prevenire a răspândirii infecției, tot mai des nu dă rezultatele așteptate și una din cauzele de bază a ineficienței terapeutice este rezistența *Mycobacterium tuberculosis* față de preparatele antituberculoase. Extinderea nivelului rezistenței primare și acumularea unui număr tot mai mare de tulpini de *Mycobacterium tuberculosis* rezistente la preparatele antituberculoase devine o problemă majoră în controlul acestei infecții la etapa actuală. Ca consecință a acestui fenomen este creșterea numărului de eșecuri terapeutice și a numărului de bolnavi cronici. Aceasta este o cauză destul de periculoasă, deoarece în viitor pot apărea tot mai frecvent forme de tuberculoză incurabilă, ori alte preparate antituberculoase nu se elaborează prea des.

20 Un nivel înalt al rezistenței micobacteriilor tuberculozei față de remediile specifice se observă nu numai în regiunile cu incidență sporită a acestei infecții, dar și în țările unde incidența tuberculozei este joasă. Organizația Mondială a Sănătății a declarat tuberculoza o urgență globală, iar fenomenul în cauză de o importanță primordială și recomandă ca cercetările efectuate în domeniul elaborării unor remedii noi, mai efective în tratamentul cazurilor de tuberculoză cu rezistență multiplă la medicamente, să fie apreciate ca direcție de studiu prioritar.

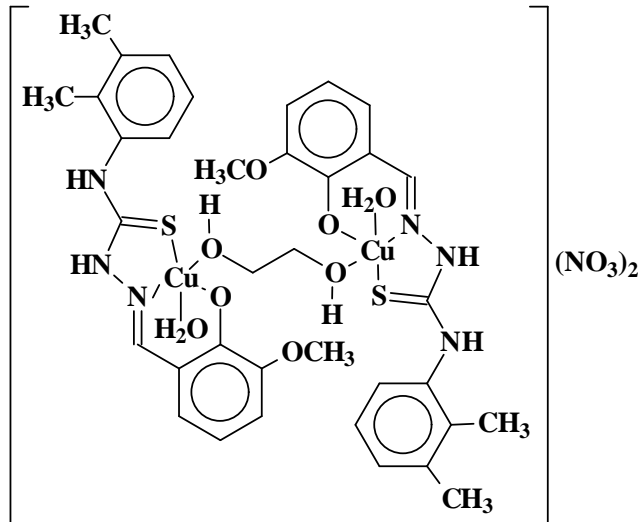
30 Din compușii chimici sintetici descriși în literatură și aplicați în medicină, care conțin în componența sa fragmentul tioamidic (tiosemicarbazidic) și care posedă activitate antituberculoasă, cel mai înalt efect a fost obținut în cazul tioacetazonei – N-{4-[(2-carbamotioilhidraziniliden)metil]fenil}acetamidei (prototipul) [1] cu formula:



35 Acest compus chimic manifestă activitate bacteriostatică față de micobacteriile tuberculozei și a leprei. Studiarea mecanismului de acțiune a arătat, că activitatea lui biologică se datorează capacității de a forma în organismul uman săruri complexe de cupru. El este eficace în cazul rezistenței *Mycobacterium tuberculosis* la principalele medicamente antituberculoase. Rezistența micobacteriilor tuberculozei la acest compus se dezvoltă relativ încet. Datorită acestor proprietăți tioacetazona găsește aplicare în medicină în terapia tuberculozei membranelor mucoase și seroase, limfadenitei, scrofulodermei și leprei (în special la etapele inițiale). Dezavantajul N-{4-[(2-carbamotioilhidraziniliden)metil]fenil}acetamidei constă în utilizarea limitată a ei în medicină din cauza eficienței reduse. De obicei ea se utilizează numai în combinație cu alte medicamente antituberculoase pentru creșterea efectului terapeutic și reducerea probabilității apariției formelor rezistente de *Mycobacterium tuberculosis*.

45 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai micobacteriilor tuberculozei H₃₇R_V cu activitate bacteriostatică înaltă.

Esența invenției constă în sinteza și utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_V a nitratului de (μ-etan-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimetilfenil)-2-(oxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoiamido(1-)]aquacupru(II)} cu formula:

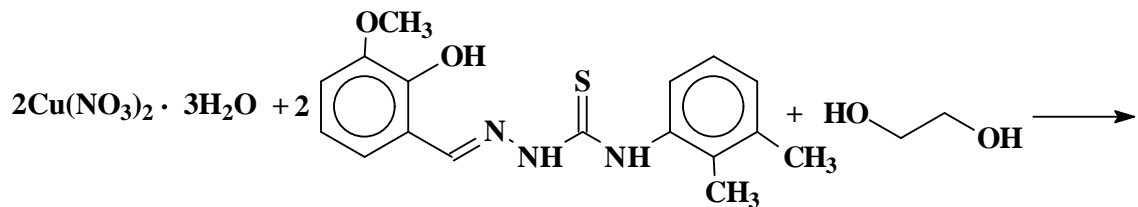


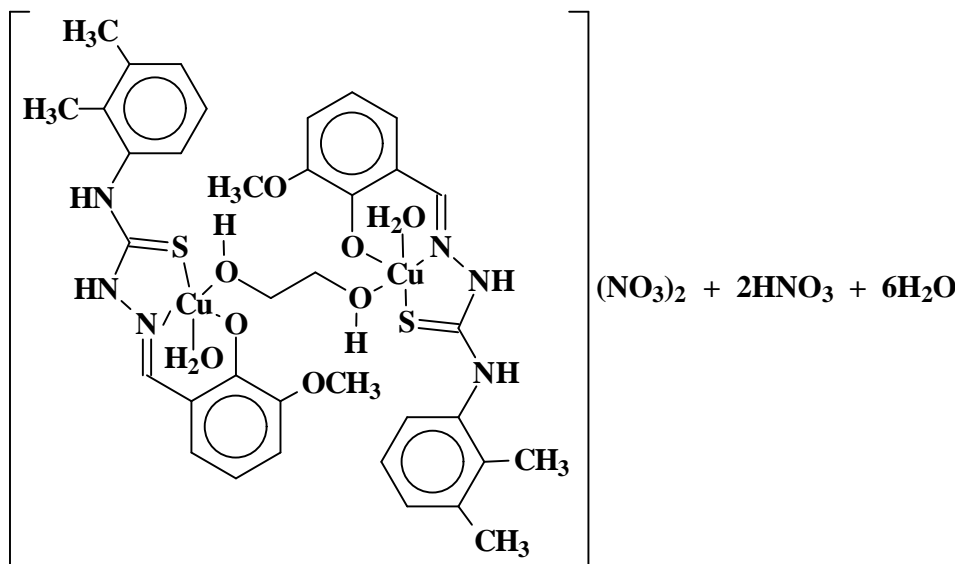
Conform bazei de date din Cambridge [November 2017 release of the Cambridge Structural Database System (version 5.39)], nu sunt cunoscuți compuși coordinativi bi- sau polinucleari ai cuprului(II) cu etan-1,2-diol (etilenglicol) în calitate de ligand-punte de un atare tip structural (analogul structural lipsește).

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea unui compus coordinativ binuclear de un nou tip structural, care manifestă activitate bacteriostatică față de tulpinile de referință H₃₇R_v ale *Mycobacterium tuberculosis*, ce depășește de 2 ori activitatea tioacetazonei (prototipului [1]).

Rezultatul tehnic obținut se datorează faptului, că se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Complexul revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etilenglicolice fierbinți (50...55°C) a trihidratului nitratului de cupru(II) și N-(2,3-dimetilfenil)-2-(hidroxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbonioamidă [N-(2,3-dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehidei] luate în raport molar 1 : 1. Reacția decurge în 50...60 min conform următoarei scheme:





Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul, că în timpul sintezei, în amestecul reactant, are loc adăuția la ionul de cupru(2+) a unei molecule de N-2,3-dimetilfeniltiosemicarbazonă a 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehidei, care joacă rolul de ligand-O,N,S tridentat mono-deprotonat. Al patrulea loc în sfera internă este ocupat de atomul de oxigen al moleculei de apă, iar al cincilea loc - de unul din atomii de oxigen alcoolici ai moleculei de etilenglicol, care cu al doilea atom de oxigen alcoolic coordonează la atomul de cupru vecin cu înconjurarea lui asemănătoare primului atom central. În rezultatul acestor procese are loc formarea complexului binuclear de cupru(II) revendicat, care reprezintă un compus coordinativ polinuclear de un nou tip structural.

Exemplu de obținere a nitrului de (μ -etan-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimetilfenil)-2-(oxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]aquacupru(II)}. Se amestecă 20 ml de soluție etilenglicolică, care conține 20 mmol de N-2,3-dimetilfeniltiosemicarbazonă a 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehidei 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 ($50 \dots 55^\circ\text{C}$) 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 - 42,80; H - 4,47; Cu - 12,39; N - 11,00; S - 6,18. Pentru $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{Cu}_2\text{N}_8\text{O}_{14}\text{S}_2$ s-a calculat, %: C - 42,98; H - 4,61; Cu - 12,63; N - 11,14; S - 6,37.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm^{-1} : $\nu(\text{NH}) = 1531$; $\nu(\text{C}=\text{N}) = 1615$; $\nu(\text{C}-\text{OH})_{\text{Alc}} = 1265$; $\delta(\text{C}-\text{N}) = 1205, 1175$; $\nu(\text{C}=\text{S}) = 1045$; $\nu(\text{C}-\text{N}) = 980, 955, 935, 890$; $\nu(\text{C}-\text{O}) = 1225, 1205$; $\nu(\text{Cu}-\text{N}) = 521, 430$; $\nu(\text{Cu}-\text{S}) = 470$; $\nu(\text{Cu}-\text{O}) = 445$. În afară de aceasta, în spectrul IR al compusului declarat sunt prezente toate benzile de absorbție caracteristice ionului nitrat necoordonat [$\nu_3(\text{E}) = 1340$, $\nu_2(\text{A}_2) = 875$, $\nu_4(\text{E}) = 725$ și $\nu_1(\text{A}) = 1051 \text{ cm}^{-1}$] și cele ale moleculei de apă din sfera interioară [$\nu(\text{H}_2\text{O}) = 3590$, $\delta(\text{H}_2\text{O}) = 1585$, $\gamma(\text{H}_2\text{O}) = 920 \text{ cm}^{-1}$].

Compusul complex revendicat are $\mu_{\text{ef}} = 1,75 \text{ mB}$ (274K).

Procedeele de obținere al compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. N-(2,3-dimetilfenil)-2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamida a fost sintetizată după metoda descrisă în [MD 4452 B1 2016.12.31]. 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.

La recristalizarea nitrului de (μ -etan-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimetilfenil)-2-(oxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]aquacupru(II)} din soluție etilenglicol-dimetilformamidică (2:1) 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 α . 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 pătratelor 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 idealizate ($d_{CH} = 0.96 \text{ \AA}$) utilizând 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

- 5 $C_{36}H_{46}Cu_2N_8O_{14}S_2$, grupa spațială $P\bar{1}(2)$, parametrii celulei elementare [A]: $a = 7,7037(5)$; $b = 8,7561(6)$, $c = 16,7977(11)$; $\alpha = 104,185(6)^\circ$, $\beta = 95,081(5)^\circ$, $\gamma = 103,370(6)^\circ$; volumul - $1065,74 \text{ \AA}^3$.

A fost stabilit (figura - structura compusului revendicat), că compusul reprezintă un dimer și conține în componența sa două piramide tetragonale în centrul cărora se află ionii de cupru. La atomii centrali ligandul coordonează prin oxigenul fenolic deprotonat, azotul azometinic și sulful în forma tionică. Al patrulea loc coordonativ în aceste fragmente de complex îl ocupă molecula de etan-1,2-diol, care îndeplinește funcția de ligand-punte. În afară de aceasta, la fiecare din atomii centrali coordonează câte o moleculă de apă. În sfera exterioară a cationului binuclear se află doi nitrat-ioni. Lungimile legăturilor și unghiurile de valență între atomii donori ai ligandului organic și ionul de metal sunt în concordanță cu datele din literatură.

Astfel, în baza rezultatelor analizei cu raze X a fost stabilită structura compusului revendicat.

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

20 **Exemplu al utilizării nitrului de (μ -etan-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimetilfenil)-2-(oxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]aquacupru(II)} în calitate de inhibitor de proliferare a micobacteriilor tuberculozei H₃₇R_v.**

Substanțele incluse în studiu au fost testate prin metoda culturală de testare a sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* pe medii nutritive solide și lichide. A fost utilizată metoda concentrațiilor absolute pe mediile de cultură Lowenstein-Jensen (LJ) și metoda proporțiilor (mediul Middlebrook 7H9). Pentru testare au fost utilizate tulpini de referință (H₃₇R_v) și tulpini sălbatice de *Mycobacterium tuberculosis*, izolate de la pacienți cu tuberculoză pulmonară aflați la tratament în clinica Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”.

30 Experimental „*in vitro*” a fost determinată concentrația minimă de inhibare (CMI). Pentru dizolvarea inițială a substanțelor cercetate a fost utilizată dimetilsulfoxida (DMSO). Diluțiile ulterioare au fost efectuate pe apă distilată sterilă. Pentru studierea activității bacteriostatice inițial au fost selectate 3 concentrații a substanțelor: 500 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ și 10 $\mu\text{g/ml}$.

35 **Pregătirea suspensiei de *Mycobacterium tuberculosis*.** Au fost utilizate tulpinile de referință H₃₇R_v, precum și tulpini de *Mycobacterium tuberculosis* „sălbatice”, izolate de la pacienți cu tuberculoză pulmonară cu termenul de izolare până la 2 săptămâni. Suspensia micobacteriană a fost pregătită după standardul de turbiditate de 5 UFC.

40 **Inocularea.** Pentru însămânțare s-au utilizat câte 0,2 ml suspensie H₃₇R_v și suspensii de tulpini sălbatice de o turbiditate de 5 UFC la fiecare concentrație a substanței. Au fost utilizate medii de cultură solide pe baza de ou (Lowenstein-Jensen) și medii de cultură lichide (Middlebrook 7H9). Tuburile inoculate au fost incubate la 37°C în termostat (LJ) și în sistemul automat BACTEC MGIT 960.

Citirea rezultatelor. Controlul tuburilor inoculate s-a efectuat în sistemul automat BACTEC MGIT 960 la fiecare 60 min de incubare și pe mediile solide la fiecare a 7-a zi de incubare în termostat.

45 **Controlul eficacității testării.** În calitate de control a fost utilizat tubul cu mediu LJ fără substanță și al doilea control – tubul cu mediu LJ cu o concentrație de 40 $\mu\text{g/ml}$ rifampicina și al treilea control - tubul cu mediu LJ cu o concentrație de 40 $\mu\text{g/ml}$ de tioacetazona (prototipul). Ultimul medicament este testat în acest studiu ca control de referință.

50 Datele experimentale obținute, privind studierea proprietăților antituberculoase ale compusului revendicat, sunt prezentate în tabel, care demonstrează, că la concentrația 10 $\mu\text{g/ml}$ el manifestă activitate bacteriostatică față de tulpinile de referință H₃₇R_v ale *Mycobacterium tuberculosis*, ce depășește de 2 ori activitatea tioacetazonei (prototipului [1]), utilizată în medicină pentru tratarea formelor rezistente de tuberculoză.

55 Proprietățile depistate ale compusului nominalizat prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de remedii antituberculoase și poate fi utilizat în cazul rezistenței *Mycobacterium tuberculosis* față de medicamentele tradiționale.

Concentrația minimă de inhibare (CMI) a tulpinilor de referință H₃₇R_v de *Mycobacterium tuberculosis*, μg/ml

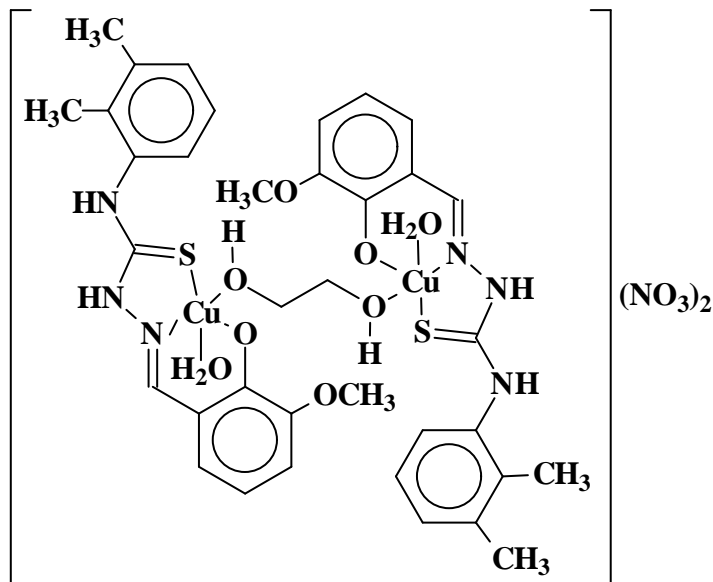
Compusul	CMI
Tioacetazona – N-{4-[(2-carbamotioilhidraziniliden)-metil]-fenil}-acetamida (prototipul) [1]	20
Nitratul de (μ-etan-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimetilfenil)-2-(oxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]aqua cupru(II)}	10

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М: Новая волна, 2012, р. 860

(57) Revendicări:

1. Nitratul de (μ-etan-1,2-diol-O,O')-bis{[N-(2,3-dimetilfenil)-2-(oxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]aqua cupru(II)} cu formula:



2. Compus, conform revendicării 1, care manifestă activitate bacteriostatică față de tulpinile de referință H₃₇R_v ale *Mycobacterium tuberculosis*.

