



MD 4675 C1 2020.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4675** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07C 47/58 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

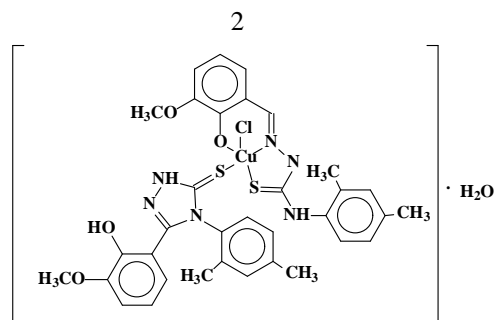
(21) Nr. depozit: a 2018 0088 (22) Data depozit: 2018.10.18	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.02.29, BOPI nr. 2/2020
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; CEBOTARI Diana, MD; BĂLAN Greta, MD; BURDUNIUC Olga, MD; RUDIC Valeriu, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* în baza hidratului de cloro-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S}--[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru

(57) Rezumat:

1
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 proliferarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparat antifungic.

Conform invenției, se revendică utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* a hidratului de cloro-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S}--[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S}cupru cu formula:



Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea compusului coordinativ de cupru cu liganzi micști, care manifestă activitate antimicrobică față de fungii din specia *Cryptococcus neoformans*.

Revendicări: 2

Figuri: 1

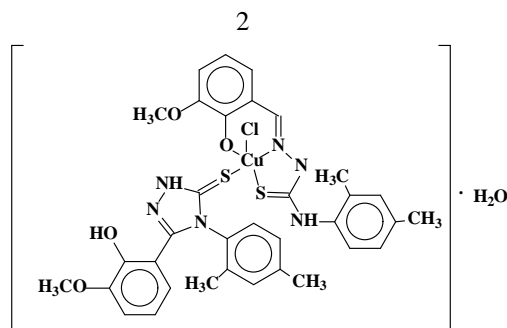
MD 4675 C1 2020.11.30

(54) *Cryptococcus neoformans* species fungi proliferation inhibitor based on chloro-{{4-(2,4-dimethylphenyl)-2-(oxo-3-methoxybenzylidene)hydrazinecarbothioamido(1-)-O,N,S}-{{4-(2,4-dimethylphenyl)-5-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-thion]-S}copper hydrate

(57) Abstract:

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 proliferation of *Cryptococcus neoformans* species fungi. Due to these properties, it can find application in medicine and veterinary medicine as an antifungal agent.

According to the invention, claimed is the use as a *Cryptococcus neoformans* species fungi proliferation inhibitor of chloro-{{4-(2,4-dimethylphenyl)-2-(oxo-3-methoxybenzylidene)hydrazinecarbothioamido(1-)-O,N,S}-{{4-(2,4-dimethylphenyl)-5-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-thion]-S}copper hydrate of the formula:



The technical result of the invention consists in the synthesis of a mixed ligand coordination compound of copper, which exhibits antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* species fungi.

Claims: 2

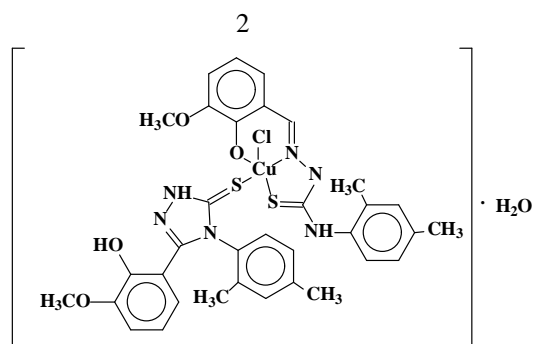
Fig.: 1

(54) Ингибитор размножения грибов вида *Cryptococcus neoformans* на основе гидрата хлоро-{{4-(2,4-диметилфенил)-2-(оксо-3-метоксибензилиден)гидразинкарботиоамидо(1-)-O,N,S}-{{4-(2,4-диметилфенил)-5-(2-гидрокси-3-метоксифенил)-2,4-дигидро-3H-1,2,4-триазол-3-тион]-S}меди

(57) Реферат:

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активному координационному соединению меди класса тиосемикарбазонатов переходных металлов. Этот комплекс ингибирует размножение грибов вида *Cryptococcus neoformans*. Благодаря этим свойствам он может найти применение в медицине и ветеринарии в качестве противогрибкового препарата.

Согласно изобретению, заявляется применение в качестве ингибитора размножения грибов вида *Cryptococcus neoformans* гидрата хлоро-{{4-(2,4-диметилфенил)-2-(оксо-3-метоксибензилиден)гидразинкарботиоамид о(1-)-O,N,S}-{{4-(2,4-диметилфенил)-5-(2-гидрокси-3-метоксифенил)-2,4-дигидро-3H-1,2,4-триазол-3-тион]-S}меди формулы:



Технический результат изобретения заключается в синтезе смешаннолигандного координационного соединения меди, которое проявляет противогрибковую активность в отношении грибов вида *Cryptococcus neoformans*.

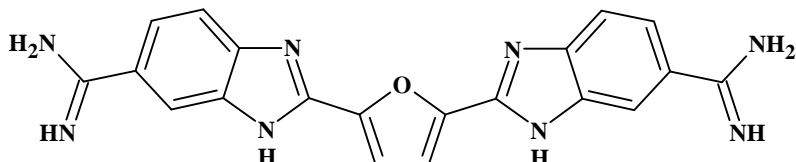
П. формулы: 2

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 proliferarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparat antifungic.

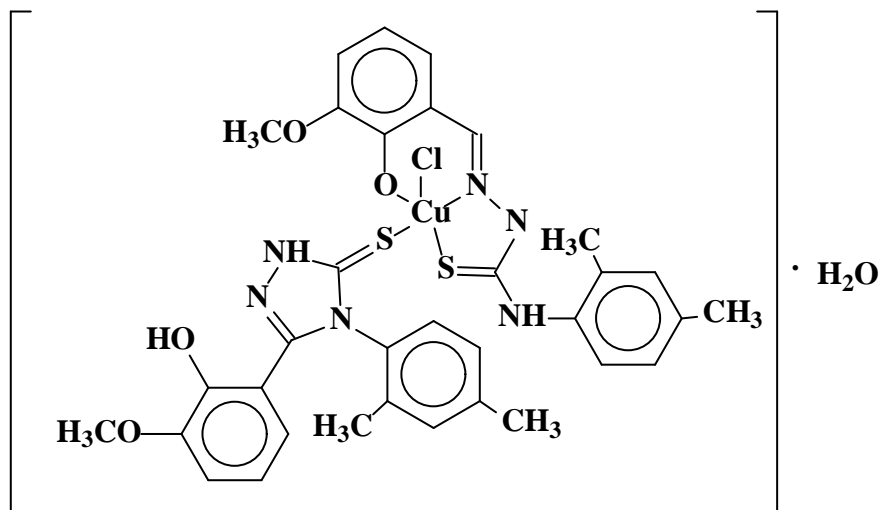
10 Din toți compușii chimici, care inhibă creșterea și multiplicarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*, cel mai înalt efect antifungic a fost obținut în cazul 2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolil)furanului [1] cu formula:



15 După activitatea antimicotică față de fungile din specia *Cryptococcus neoformans* acest compus depășește de 25,8 ori caracteristicile respective ale fluconazolului, utilizat actualmente larg în medicină pentru tratarea și profilaxia micozelor. Dezavantajul 2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolil)furanului constă în faptul, că el nu posedă o activitate antimicotică suficient de înaltă și din această cauză nu a găsit o aplicare în medicină sau veterinarie.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* cu activitate antimicotică înaltă.

20 Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* a hidratului de cloro-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamido(1-)]-O,N,S} - {[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S}}cupru cu formula:

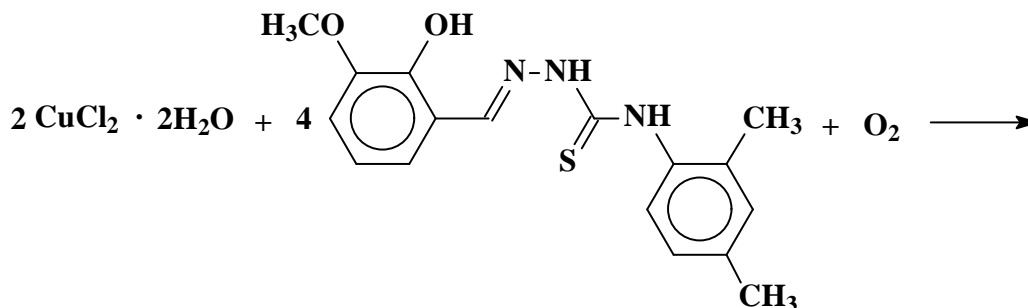


25 Complexul dat reprezintă un compus coordinativ de cupru cu liganzi micști, în care doi liganzi polidentati obținuți din precursori identici manifestă diferită capacitate de dentare: primul este tridentat monodeprotonat, iar al doilea – monodentat și ciclizat.

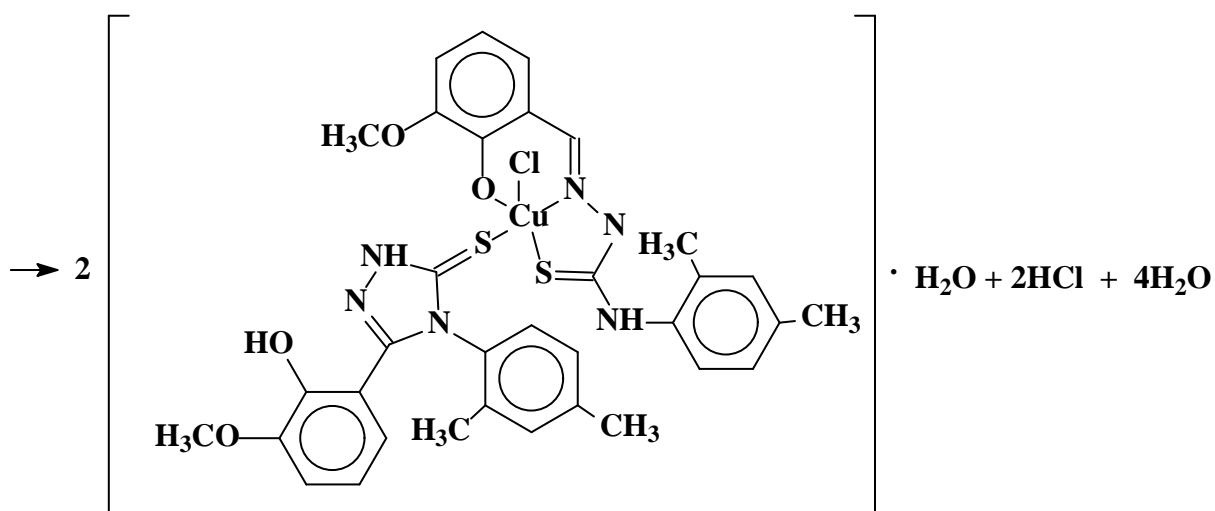
30 Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea compusului coordinativ de cupru cu liganzi micști, care manifestă activitate antimicotică față de fungii din specia *Cryptococcus neoformans* de 1,3 ori mai înaltă decât prototipul [1]. Proprietatea stabilită a hidratului de cloro-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotioamido(1-)]-O,N,S} - {[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S}}cupru sus-numit este nouă, fiindcă până acum nu este descrisă utilizarea lui în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*.

35 Rezultatul tehnic obținut se datorează faptului, că în compusul propus în invenție se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

Complexul revendicat se obține la interacțiunea soluției etanolice fierbinți (65...70°C) a dihidratului clorurii de cupru(2+) cu soluția etanolică, care conține 4-(2,4-dimetilfenil)-2-(hidroxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoioamidă, luate în raport molar 1:2. Reacția decurge în 55...60 min conform următoarei scheme:



5



Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul, că în timpul sintezei, în amestecul reactant, are loc adăția la ionul de cupru(2+) a primei molecule de N-2,4-dimetilfenil-tiosemicarbazonă a 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehidei, care joacă rolul de ligand-O,N,S tridentat monodeprotonat. Al patrulea loc în sfera internă a atomului central îl ocupă atomul de sulf de la a doua moleculă de tiosemicarbazonă, care în amestecul reactant în prezența templatului de cupru(2+) a fost supus ciclizării oxidative cu oxigenul din aer, formând 4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ione. Al cincilea loc în sfera internă a complexului este ocupat de ionul clorurii. În rezultatul acestor procese are loc formarea complexului de cupru(II) revendicat, care reprezintă o piramidă tetragonală. Conform bazei de date din Cambridge [November 2017 release of the Cambridge Structural Database System (version 5.39)], nu este cunoscută metoda de sinteză de așa tione substituită și nu sunt cunoscuți compuși coordinativi ai cuprului(II) cu tiosemicarbazone și tione de un atare tip structural.

Exemplu de obținere al hidratului de cloro-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoioamido(1-)]-O,N,S}-[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ione]}cupru.

Se amestecă 20 mL de soluție etanolică, care conține 20 mmol de N-2,4-dimetilfeniltiosemicarbazonă a 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehidei cu 10 mmol de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dizolvat în 10 mL de alcool. Amestecul reactant este încălzit (65...70°C) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 55...60 min. La răcire din soluție se depun cristale mărunte de culoare verde, 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 -52,74; H -4,47; Cl - 4,30; N- 10,77; S - 8,07.

Pentru $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{ClCuN}_6\text{O}_5\text{S}_2$ s-a calculat, %: C -52,91; H - 4,70; Cl - 4,59; N- 10,89; S - 8,31.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm^{-1} : $\nu(\text{NH}) = 1530$; $\nu(\text{C}=\text{N}) = 1610, 1585$; $\nu(\text{C}-\text{OH}) = 1275$; $\delta(\text{C}-\text{N}) = 1200, 1175$; $\nu(\text{C}=\text{S}) = 1045, 1040$; $\nu(\text{C}-\text{N}) = 980, 955, 930, 890$; $\nu(\text{C}-\text{O}) = 1220, 1205$; $\nu(\text{Cu}-\text{N}) = 530, 423$; $\nu(\text{Cu}-\text{S}) = 470, 460$; $\nu(\text{Cu}-\text{O}) = 445$.

Momentul efectiv magnetic $\mu_{\text{ef}} = 1,76 \text{ mB}$ (294K).

5 Procedul de obținere al compusului declarat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile. 4-(2,4-Dimetilfenil)-2-(2-hidroxi-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamida a fost sintetizată după metoda descrisă în brevetul MD 4452 B1 2016.12.31. 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.

10 La recristalizarea hidratului de cloro- $\{[4-(2,4\text{-dimetilfenil})\text{-}2\text{-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S}\}\{[4-(2,4\text{-dimetilfenil})\text{-}5\text{-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-}2,4\text{-dihidro-}3H\text{-}1,2,4\text{-triazol-}3\text{-tion}]\text{-S}\}$ cupru 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
15 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 ($d_{\text{CH}} = 0,96 \text{ \AA}$) 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 $P 2_1/c$, parametrii celulei elementare [A]: $a = 20,3254(14)$; $b = 7,1080(5)$, $c = 26,674(3)$; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 101,667(8)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$; volumul – $3774,07 \text{ \AA}^3$. A fost stabilit (figură – structura compusului
25 revendicat), că nodul coordinațiv al compusului complex investigat are structură tetragonal-piramidală distorsionată. În sfera internă a atomului central se află două molecule de tiosemicarbazonă, care îndeplinesc diferite funcții. Prima moleculă de azometină este tridentată, koordinandu-se la atomul de cupru prin atomii de oxigen fenolic deprotonat [$d(\text{Cu}-\text{O}) = 1,9084\text{\AA}$], atomul de azot azometinic [$d(\text{Cu}-\text{N}) = 1,9818\text{\AA}$] și atomul de sulf [$d(\text{Cu}-\text{S}) = 2,2930\text{\AA}$], formând două metalocicluri din șase și cinci atomi. Această tiosemicarbazonă se află în sfera internă în forma tionică nedeprotonată. În favoarea acestui fapt vorbește distanța $d(\text{C}=\text{S}) = 1,6948\text{\AA}$, care corespunde legăturii duble. A doua moleculă de tiosemicarbazonă este ciclizată și coordinează la atomul central prin atomul de sulf [$d(\text{Cu}-\text{S}) = 2,3458\text{\AA}$], care se află în sfera internă în forma
35 tionică [$d(\text{C}=\text{S}) = 1,6983\text{\AA}$]. În afară de aceasta, în ligandul monodentat ciclizat distanța $d(\text{C}-\text{O})_{\text{fenolic}} = 1,358\text{\AA}$ corespunde fragmentului fenolic cu atomul de oxigen protonat. Al cincilea loc în sfera internă a complexului este ocupat de ionul clorură cu distanța $d(\text{Cu}-\text{Cl}) = 2,7082\text{\AA}$. Alte distanțe interatomice și unghiurile de valență sunt standarde pentru compușii din această clasă.

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

Esența invenției poate fi confirmată prin următoarele date experimentale.

Proprietățile antimicotice ale hidratului de cloro- $\{[4-(2,4\text{-dimetilfenil})\text{-}2\text{-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S}\}\{[4-(2,4\text{-dimetilfenil})\text{-}5\text{-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-}2,4\text{-dihidro-}3H\text{-}1,2,4\text{-triazol-}3\text{-tion}]\text{-S}\}$ cupru au fost cercetate "in vitro" pe tulpina de
45 laborator de micete levuriforme *Cryptococcus neoformans*. Activitatea antimicotică s-a determinat utilizând mediul RPMI 1640 suplimentat cu glucoză. Inoculul se pregătea, din subcultura de 48 ore cultivată pe Agar Sabouraud, în apă distilată sterilă până la o densitate de 0,5 McFarland (cca. $2\text{-}5 \times 10^6 \text{ UFC/ml}$), după care se efectua o a doua diluție cu apă distilată sterilă de 1:10, obținându-se inoculul final. Rezultatul final se interpreta prin folosirea unui spectrofotometru, înregistrându-se absorbbanța fiecărui godeu la 405 nm. CMI-ul se calcula ca fiind cea mai mică concentrație care
50 inhibă creșterea (comparativ cu martorul pozitiv).

Rezultatele studiului activității biologice a compusului revendicat sunt prezentate în tabel, din care se vede, că el posedă activitate fungiostatică și fungicidă în limitele concentrațiilor 0,48...1,95 $\mu\text{g/mL}$ față de fungile din specia *Cryptococcus neoformans*. După cum se vede din
55 tabel, compusul coordinațiv declarat manifestă activitate antimicotică, ce depășește de 1,3 ori activitatea prototipului [1].

Proprietățile depistate ale compusului nominalizat prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de remedii antimicotice și permite utilizarea lui în cazul rezistenței fungilor față de medicamentele tradiționale.

Tabel

5 Activitatea antimicotică ($\mu\text{g/mL}$) a compusului revendicat în comparație cu prototipul

Tulpina	Compusul declarat ^a		Prototipul [1]	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>CECT 1043</i>	0,48	1,95	0,62	b

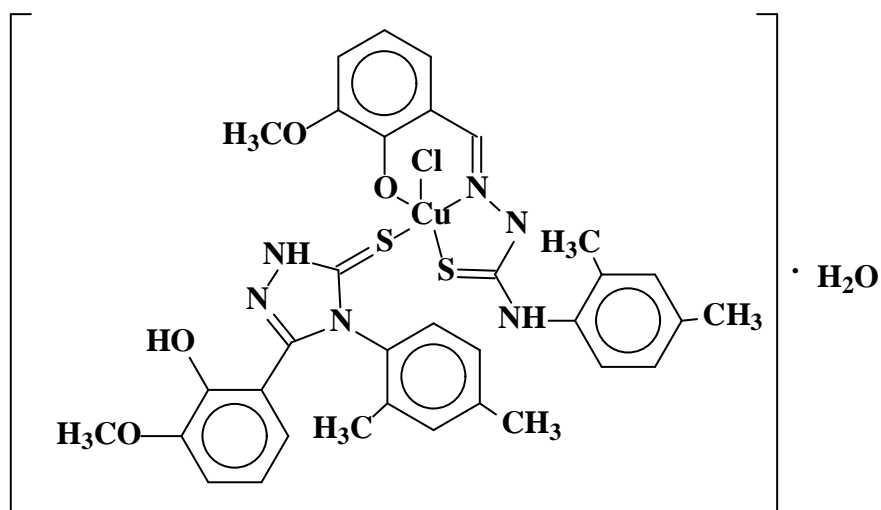
*Notă: a) Compusul declarat - hidratul de cloro-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S} - {{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S} cupru, b) CMB prototipului în [1] nu a fost studiată.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. US 6156779 A 2000.12.05

(57) Revendicări:

1. Hidratul de cloro-{{[4-(2,4-dimetilfenil)-2-(oxo-3-metoxibenziliden)hidrazincarbotoamido(1-)]-O,N,S} - {{[4-(2,4-dimetilfenil)-5-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion]-S} cupru cu formula:



2. Compus, conform revendicării 1, pentru utilizare în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*.

