



MD 4370 B1 2015.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4370** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07D 237/04* (2006.01)
C07C 13/48 (2006.01)
C07C 49/637 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/50 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 31/04 (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 2015 0024 (22) Data depozit: 2015.03.05	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.09.30, BOPI nr. 9/2015
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ARICU Aculina, MD; MANGALAGIU Ionel, RO; CIOCURLAN Alexandru, MD; LUNGU Lidia, MD; ZBÂNCIOC Gheorghică, RO; VORNICU Nicoleta, RO (73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **11,12-Bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-onă care manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la domeniul chimiei și medicinei, și anume la sinteza unui compus nou cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic, care poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat antifungic și antibacterian.

2
Conform invenției, se revendică compusul 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-ona, care manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene.
Revendicări: 2

MD 4370 B1 2015.09.30

(54) 11,12-Bis-p-tolyl-pyridazonyl-drim-5(6),8(9)-diene-7-one exhibiting antifungal and antibacterial properties

(57) Abstract:

1

The invention relates to the field of chemistry and medicine, namely to the synthesis of a new compound with hybrid terpenic and azaheterocyclic skeleton, which may be used in medicine as an antifungal and antibacterial agent.

2

According to the invention, the compound 11,12-*bis*-p-tolyl-pyridazonyl-drim-5(6),8(9)-diene-7-one, which exhibits antifungal and antibacterial properties is claimed.

Claims: 2

(54) 11,12-Bis-p-толил-пиридазонил-дрим-5(6),8(9)-диен-7-он, проявляющий противогрибковые и антибактериальные свойства

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к области химии и медицины, а именно к синтезу нового соединения с гибридным терпеновым и азгетероциклическим скелетом, которое может найти применение в медицине в качестве противогрибкового и антибактериального препарата.

2

Согласно изобретению, заявляется соединение 11,12-*bis*-p-толил-пиридазонил-дрим-5(6),8(9)-диен-7-он, которое проявляет противогрибковые и антибактериальные свойства.

П. формулы: 2

Descriere:

Invenția se referă la domeniul chimiei și medicinei, și anume la sinteza unui compus nou cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic, care poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat antifungic și antibacterian.

Infecțiile provocate de fungi și bacterii sunt foarte răspândite și aduc prejudicii grave sănătății. Majoritatea preparatelor antifungice și antibacteriene existente nu asigură un efect curativ radical și stabil. Tratamentele existente, ca regulă, nu conduc la dispariția definitivă a oricărui semn de infecție, ci doar ameliorează temporar starea generală a pacienților, aceasta recidivând frecvent cu manifestări clinice mai pronunțate. Deseori, ca rezultat al mutațiilor, la fungi și bacterii apare rezistență la preparatele folosite pentru tratament, fapt ce stimulează cercetările în vederea obținerii de preparate noi.

Din seria de preparate frecvent utilizate în practica medicală este bine cunoscută caspofungina, reprezentant al unei clase noi de antifungice, numită echinocandine. Acest preparat inhibă sinteza (1→3)-β-D-glucanului și crește permeabilitatea celulelor fungice, fapt ce favorizează scurgerea conținutului citoplasmatic (citoliza) și, ca urmare, moartea acestora [1].

Este cunoscută, de asemenea, kanamicina, un agent antibacterian eficient din grupa aminoglucozidelor, frecvent utilizată pentru tratarea unei mari varietăți de infecții [2].

Preparatele menționate au însă un șir de dezavantaje, ce constau în:

- potențialul curativ moderat;
- provoacă reacții alergice și iritații în locul aplicării;
- provoacă efecte adverse manifestate prin tulburări gastrointestinale, urinare etc.

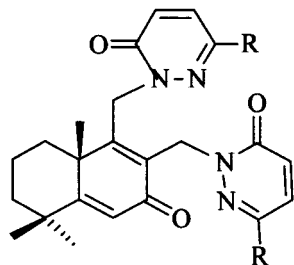
În calitate de cea mai apropiată soluție pot servi compușii hibridi terpeno-diazaheterociclici mono- și diacilați, care au fost testați *in vitro* pe tulpini de bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus* și *Bacillus subtilis*) și cele Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), dar și pe tulpini de fungi (*Candida albicans*, *Candida glabrata* și *Candida sake*). Autorii menționează că acești compuși manifestă activitate antibacteriană bună împotriva speciilor *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus* în comparație cu preparatele medicamentoase de referință (ampicilină, cloramfenicol și nistatină) [3]. Derivații amino-diazinici, care conțin în calitate de componentă terpenică o unitate homodrimanică, au fost obținuți de autori prin două metode diferite, dar într-o singură etapă, aceștia stabilind și mecanismele reacțiilor chimice.

La tratarea acidului δ⁸⁽¹³⁾-biciclohomofarnezenic cu clorura de oxalil a fost obținută cloranhidrida acidului biciclohomofarnezenic, care a fost supusă reacției *in situ* cu diazinele corespunzătoare. În reacția cloranhidridei acidului biciclohomofarnezenic cu 4-aminopirimidina a fost preparată N-(pirimidin-4-il)amida acidului Δ^{8,13}-biciclohomofarnezenic cu un randament de 69%. O metodă alternativă de obținere a N-(pirimidin-4-il)amidei acidului Δ^{8,13}-biciclohomofarnezenic este reacția directă a acidului Δ^{8,13}-biciclohomofarnezenic cu 4-aminopirimidina în prezența dicitocarbodiimidei și 4-dimetilaminopiridinei. În acest caz, pe lângă compusul scontat au fost obținuți și doi produși noi N-Δ^{8,13}-biciclohomofarnezenoil-N,N'-dicitoclohexilurea și N,N'-dicitoclohexilurea, aceștia constituind produsele secundare ale reacției.

Dezavantajul compușilor descriși constă în faptul că ei manifestă doar activitate antibacteriană pronunțată, nu și antifungică, și doar pe două specii de bacterii din set. Un dezavantaj este și faptul că din reacții rezultă amestecuri complexe de produse, ce trebuie să fie separate cromatografic, iar randamentele lor de obținere variază puternic, de la cele joase (~15%) până la cele acceptabile (~60%).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în lărgirea gamei de compuși enantiopuri, cu activitate antifungică și antibacteriană ridicată, obținuți prin semisinteză din materii prime de origine vegetală, ieftine și accesibile.

Problema se soluționează prin aceea că se revendică compusul 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-onă cu formula:



care manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene.

Extinderea cercetărilor științifice în domeniul elaborării remediilor antifungice și antibacteriene cu activitate biologică ridicată, la prețuri competitive cu preparatele de import, adică accesibile pentru populație, din materie primă locală, constituie o problemă de importanță primordială pentru Republica Moldova. O valoare adăugată invenției oferă faptul că materia primă locală este renovabilă, accesibilă și poate fi obținută din deșeurile provenite din industria uleiurilor etero-oleaginoase.

Rezultatul invenției constă în obținerea unui compus nou, terpeno-azaheterociclic 11,12- bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-onă, care poate fi utilizat pentru tratamentul unor afecțiuni de natură fungică și bacteriană.

Avantajele compusului revendicat constau în:

1. Activitatea biologică mai ridicată a 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-unei în raport cu preparatele cunoscute;
2. Accesibilitatea compusului revendicat sub aspect eficiență/preț;
3. Accesibilitatea materiei prime și originea ei locală;
4. Eficiența și simplitatea metodei de sinteză a acestuia.

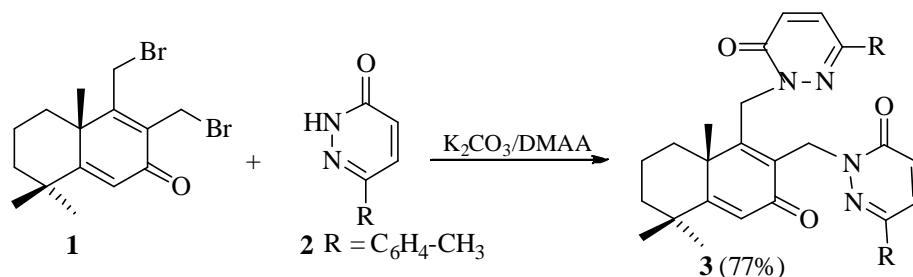
Compusul revendicat poate fi utilizat în calitate de compus cu proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate, fapt confirmat de testările biologice ale acestuia *in vitro* pe speciile de fungi (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*) și tuplinile de bacterii Gram-pozitive (*Bacillus polymyxa*) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*).

De menționat că obținerea a 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-unei, dar și rezultatele testărilor biologice ale acestui compus nu au fost descrise anterior în literatura de specialitate.

În calitate de materie primă pentru obținerea compusului revendicat a fost utilizată sclareolida comercial accesibilă, care în câteva etape a fost transformată în 11,12-dibromo-drim-5(6),8(9)-dien-7-onă **1**, cu un randament total de 78%, în conformitate cu metoda descrisă în literatură (Koltza M., Mironov G., Malinovskii S., Vlad P.F. Synthesis of drim-8(9)-en-7-one, drim-5,8(9)-dien-7-one, and their 11,12-dibromo derivatives from norambreinolide. Russian Chemical Bulletin, 1996, vol. 45, nr. 1, p. 208-214).

În continuare interacțiunea dibromurii **1** cu p-tolil-piridazona **2**, obținută și descrisă anterior în literatură (Mantu D., Moldoveanu C., Nicolescu A., Deleanu C., Mangalagiu I. A facile synthesis of pyridazinone derivatives under ultrasonic irradiation. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, vol. 16, nr. 4, p. 452–454), în soluție de dimetilacetamidă (DMAA) anhidră și în prezența K₂CO₃, a condus la obținerea 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-unei **3** revendicate, într-o singură etapă cu un randament de 77% (Schema 1).

Structura compusului revendicat a fost confirmată prin metode de analiză obligatorii, spectroscopie în infraroșu (IR), rezonanță magnetică nucleară mono- și bidimensională (¹H, ¹³C RMN și 2D), spectrometrie de masă (HRMS).



5 Schema 1. Sinteza 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-onei **3** din 11,12-dibromo-drim-5(6),8(9)-dien-7-ona **1**

10 Ca rezultat al testărilor biologice s-a demonstrat că 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-ona manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene excelente la valori ale concentrației minime inhibitorii (CMI, μg/ml) de 0,005 și 0,032, respectiv, care sunt net superioare celor caracteristice compușilor de referință caspofungină și kanamicină (tabel).

Compusul revendicat este stabil în contact cu aerul, parțial solubil în alcoolii și apă, solubil în dimetilsulfoxid (DMSO), clorură de metilen, acetat de etil și acetonă.

Exemplu de realizare a invenției

Sinteza 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-onei **3**

15 La soluția formată din p-tolil-piridazona **2** (2 mmol) în DMAA anhidră (2 mL) se adaugă K₂CO₃ (3 mmol), apoi cu picătura soluția formată din dibromura **1** (1 mmol) în DMAA anhidră (2 mL). Amestecul de reacție se agită la temperatura camerei timp de 24 ore, apoi se diluează cu H₂O (10 mL) și se extrage cu clorură de metilen (3 x 10 mL), iar extractul organic se usucă pe sulfat de sodiu anhidru. Produsul de reacție obținut
20 după filtrarea extractului și distilarea solventului la presiune redusă, se purifică prin cromatografie pe coloana cu SiO₂, folosind în calitate de eluent un amestec format din MeOH/CHCl₃ luați într-un raport de 0,5:9,5 (v/v). Ca rezultat se obține 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-ona **3** (randament 77%), compus cristalin, p.t. = 216...218°C (MeOH); [α]_D + 54.04° (c = 0.1, CHCl₃). Structura compusului **3** a fost confirmată de datele analizelor:

25 Spectroscopie în IR (ν, cm⁻¹): 2969, 2912, 1652, 1587, 1519, 1394, 1279, 1159, 1049, 902, 813.

30 Rezonanță magnetică ¹H (CDCl₃, δ, ppm, J, Hz): 7.57 (1H, d, J 9.72 Hz, H-4?), 7.43 (2H, d, J 8.0 Hz, H-2" și H-6"), 7.42 (1H, d, J 9.72 Hz, H-4?), 7.41 (2H, d, J 8.0 Hz, H-2" și H-6"), 7.13 (2H, d, J 13.32 Hz, H-3" și H-5"), 7.11 (2H, d, J 13.32 Hz, H-3" și H-5"), 6.95 (1H, d, J 9.72 Hz, H-5?), 6.81 (1H, d, J 9.72 Hz, H-5?), 6.44 (1H, s, C-6), 5.48 (1H, d, J 14.32 Hz, H-12), 5.44 (1H, d, J 14.96 Hz, H-12), 5.28 (1H, d, J 14.16 Hz, H-11), 5.24 (1H, d, J 14.76 Hz, H-11), 2.36 (3H, s, H-7"), 2.31 (3H, s, H-7"), 1.47 (3H, s, H-15), 1.31 (3H, s, H-14), 1.24 (3H, s, H-13);

35 Rezonanță magnetică ¹³C RMN (CDCl₃, δ, ppm): 185.47 (C-7), 173.35 (C-5), 159.98 (C-9), 159.41 și 159.34 (C-3'), 144.36 și 143.56 (C-6'), 139.67 și 139.08 (C-4"), 135.01 (C-8), 131.93 și 131.35 (C-1"), 129.73 (C-4?), 129.68 (C-5?), 129.38 (C-3" și 5"), 129.34 (C-3" și 5"), 129.14 (C-4?), 125.45 (C-2" și 6"), 125.43 (C-2" și 6"), 124.13 (C-6), 46.78 (C-11), 45.83 (C-12), 44.65 (C-10), 39.96 (C-3), 37.35 (C-4), 33.69 (C-1), 40 32.45 (C-13), 29.13 (C-14), 27.16 (C-15), 21.19 și 21.17 (C-7"), 17.97 (C-2). ¹⁵N NMR (CDCl₃, δ, ppm): 210.9 și 209.2 (N-1), 330.3 și 327.4 (N-2).

Analiza de masă (m/z): 402 [(M⁺ -186, 35)], 319 (3), 278 (2), 261 (3), 217 (2), 185 (7), 173 (9), 128 (17), 97 (7), 91 (11), 77 (12), 64 (8), 51 (11); HRMS (EI): găsit 402.23141. C₃₇H₃₈O₃N₄ calculat 586.70642.

45 Testarea activității biologice a 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-onei

50 Activitatea biologică a compusului revendicat a fost testată *in vitro* pe 5 specii de fungi (*Aspergillus flavus* ATCC 20046, *Aspergillus niger* ATCC 53346, *Penicillium chrysogenum* ATCC 20044, *Penicillium frequentans* ATCC 10110 și *Alternaria alternata* ATCC 8741) provenite din culturi pure și 2 specii de bacterii: Gram-pozitive (*Bacillus polymyxa* ATCC 15970) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC

27813) și a compusului din cea mai apropiată soluție N-(pirimidin-4-il)amida acidului $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnezic **4** pe două specii de bacterii. Rezultatele testărilor exprimate în valori CMI (concentrația minimă inhibitoare) sunt date în tabel.

5

Tabel

Rezultatele testării activității biologice a 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-onei

Compusul	Concentrație minimă inhibitoare ($\mu\text{g/mL}$)						
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Compusul revendicat	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,032	0,032
Compusul conform celei mai apropiate soluții	-	-	-	-	-	7	0
Caspofungina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-
Kanamicina	-	-	-	-	-	3,0	3,0

10 Microorganismele au fost furnizate de American Type Culture Collection (ATCC), USA.

Se pregătește soluția compusului revendicat în DMSO cu o concentrație de 0,5%. Pentru aceste determinări se utilizează plăci Petri cu mediul de cultură de tip agar-Sabouraud cu 4% dextroză (SDA) pentru fungi și mediu agar nutritiv-standard I pentru bacterii de la firma Merck (Germania).

15 Conform procedurilor standard de cultivare (SR-EN 1275:2006 și NCCLS guidelines) [National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS) *Antimicrobial Susceptibility Standards* (ATS) 2003, for M7 (CMI) and M100] se aplică metoda diluțiilor succesive pentru pregătirea suspensiei de microorganisme [Carrillo R., Martin V. S., Lopez M., Martin T. *Tetrahedron*, 2995, vol. 61, nr. 34, p. 8177-8191].

20 Caspofungina (strip test) se utilizează ca un compus standard pentru activitatea antifungică și kanamicina (strip test) se utilizează pentru activitate antibacteriană. Compușii standard sunt furnizați de firma Liofilchem (Italia).

25 Încărcătura finală a inoculului-stoc astfel pregătit este de $1 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$. Plăcile inoculate se incubează la temperatura de 30°C timp de 7 zile. Primele observații se fac după 48 de ore, iar analiza finală după 7 zile, stabilindu-se concentrația minimă inhibitoare (CMI) și densitatea viabilă a microorganismelor prezente. Valorile CMI se citesc direct pe banda standard în punctul în care marginea elipsei de inhibiție intersectează banda pentru fiecare tip de microorganisme.

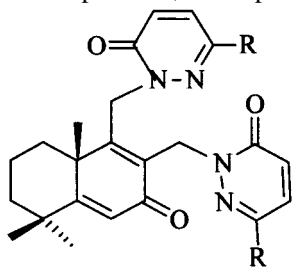
30 Rezultatele obținute demonstrează că compusul revendicat posedă proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Desnos-Ollivier M., Dromer F., Dannaoui E. Detection of caspofungin resistance in *Candida* spp. by Etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, vol. 46, nr. 7, p. 2389-2392
2. Van den Broek P.J., Buys L.F., Van den Barselaar M.T., Leijh P.C., Van Furth R. Influence of human monocytes on the antibacterial activity of kanamycin and gentamicin for *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1986, vol. 29, nr. 6, p. 1032-1039
3. Kuchkova K., Aricu A., Secara E., Barba A., Vlad P., Ungur N., Tuchilus C., Shova S., Zbancioc Gh., Mangalagiu I. Design, synthesis, and antimicrobial activity of some novel homodrimane sesquiterpenoids with diazine skeleton. *Medicinal Chemistry Research*, 2014, vol. 23, nr. 3, p. 1559-1568

(57) Revendicări:

1. Compusul 11,12-*bis*-*p*-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-onă cu formula:



2. Compus, conform revendicării 1, care manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene.

Șef Secție Examinare:

GROSU Petru

Examinator:

LEVIȚCHI Svetlana

Redactor:

CANȚER Svetlana