



MD 4580 B1 2018.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4580** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07C 13/50* (2006.01)
C07C 39/14 (2006.01)
C07D 285/125 (2006.01)
A61K 31/095 (2006.01)
A61K 31/433 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (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 2017 0101 (22) Data depozit: 2017.11.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.07.31, BOPI nr. 7/2018
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: ARICU Aculina, MD; LUNGU Lidia, MD; CIOCARLAN Alexandru, MD; VORNICU Nicoleta, RO (73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Compus (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-tiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol cu proprietăți antifungice și antibacteriene**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie, și anume la un compus cu schelet hibrid terpenic și tiadiazolic, care manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene.

Conform invenției, compusul (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-tiadiazol-2-

2
il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol are proprietăți antifungice și antibacteriene eficiente la valori ale concentrației minime inhibitorii de 0,032 μg/ml și 0,094 μg/ml.

Revendicări: 2

MD 4580 B1 2018.07.31

(54) (1R,2R,8aS)-1-((5-Mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-yl)methyl)-2,5,5,8a-tetramethyldecahydronaphthalen-2-ol compound with antifungal and antibacterial properties

(57) Abstract:

1
The invention relates to chemistry, namely to a compound with a hybrid terpenic and thiadiazole skeleton having antifungal and antibacterial properties.

According to the invention, the compound (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-yl)methyl)-2,5,5,8a-

2
tetramethyldecahydronaphthalen-2-ol has effective antifungal and antibacterial properties with the minimum inhibitory concentration values of 0.032 µg/mL and 0.094 µg/mL.

Claims: 2

(54) Соединение (1R,2R,8aS)-1-((5-меркапто-1,3,4-тиадиазол-2-ил)метил)-2,5,5,8а-тетраметилдекагидронафтаден-2-ол с антигрибковыми и антибактериальными свойствами

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к химии, а именно к соединению с гибридным терпеновым и тиадиазоловым скелетом, обладающему антигрибковыми и антибактериальными свойствами.

Согласно изобретению, соединение (1R,2R,8aS)-1-((5-меркапто-1,3,4-тиадиазол-

2
2-ил)метил)-2,5,5,8а-тетраметилдекагидронафтаден-2-ол обладает эффективными антигрибковыми и антибактериальными свойствами при минимальных значениях концентрации игибирования 0,032 мкг/мл и 0,094 мкг/мл.

П. формулы: 2

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la domeniul chimiei, și anume la (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol, compus nou cu schelet hibrid terpenic și tiodiazolic, care poate fi utilizat în calitate de compus cu proprietăți antifungale și antibacteriene.

10 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, în rezultatul mutațiilor la fungi și bacterii apare rezistență la preparatele folosite pentru tratament, fapt ce stimulează cercetările în vederea obținerii de preparate noi.

15 Dintre preparatele frecvent utilizate în practica medicală este bine cunoscută *Caspofungina*, reprezentant al unei clase noi de antifungice. 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].

20 Este cunoscută, de asemenea, *Kanamicina*, un agent antibacterian eficient din grupa aminoglucozidelor, frecvent utilizat pentru tratarea unei mari varietăți de infecții [2].

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

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

25 În calitate de cea mai apropiată soluție pot servi compușii hibridi terpeno-piridazonici, care au fost testați "in vitro" pe tulpini de bacterii Gram-pozitive (*Bacillus polyxyma*) și cele Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*), dar și pe tulpinile de fungi (*Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*). Autorii menționează că acești compuși manifestă activitate antibacteriană și antifungică bună împotriva tuturor speciilor menționate în comparație cu preparatele medicamentoase de referință (*Caspofungina* și *Kanamicina*) [3].

Derivații piridazinici, care conțin în calitate de componentă terpenică o unitate drimanică, au fost obținuți de autori, prin mai multe etape.

35 Inițial sclareolida comercial accesibilă, care în cinci etape a fost transformată în 11,12-dibromo-drim-5(6),8(9)-dien-7-ona, cu un randament total de 78%, care în continuare a fost tratată cu p-tolil-piridazona care a condus la formarea 11,12-bis-p-tolil-piridazonil-drim-5(6),8(9)-dien-7-unei, cu un randament de 77%.

40 Dezavantajul compusului descris constă în faptul că deși acesta manifestă activitate antibacteriană și antifungică mai pronunțată decât cel din cea mai apropiată soluție, se obține în mai multe etape (6) și că din reacții rezultă amestecuri complexe de produse ce trebuie să fie separate cromatografic.

45 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, eficiente și accesibile. 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. 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.

50 Rezultatul invenției constă în obținerea unui compus nou, terpeno-tiodiazolic (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olul, care poate fi aplicat pentru tratarea unor afecțiuni de natură fungică și bacteriană.

Avantajele compusului revendicat constau în:

- 55
1. activitatea biologică mai ridicată a (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olului în raport cu preparatele cunoscute *Caspofungina* și *Kanamicina*;
 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 (2 etape) în comparație cu metoda de sinteză a celei mai apropiate soluții (6 etape).

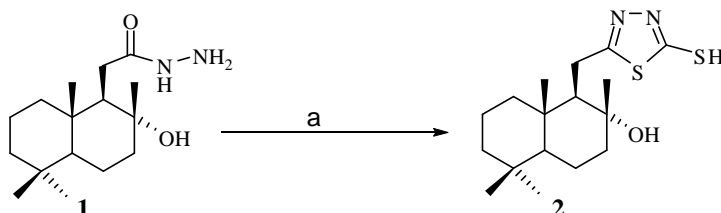
Invenția soluționează problema prin aceea că (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olul, ce posedă un schelet hibrid terpenic și tiodiazolic poate fi utilizat în calitate de compus cu proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate, fapt confirmat de testările biologice a acestuia *in vitro* pe speciile de fungi (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*) și tulpinile de bacterii gram- pozitive (*Bacillus polymyxa*) și gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*).

De menționat, că obținerea (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olului, 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 la tratare cu hidrazin hidrat în etanol formează (2-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il) acetohidrazida) **1**, cu un randament de 85%, în conformitate cu metoda descrisă de autorii (Styngach E. P., Malinovskii S.T., Bets L.P., Vlad L.A., Gdanets M., Makaev F.Z. Crystal and Molecular Structure of (1s,2s,4as,8as)-N-(N-allyldiaminomethanethione)-1-(2-Hydroxy-2,5,5,8a-tetramethyldecahydronaphthalenyl) acetamide. J. Struct. Chem., Vol. 46, No 4, 2005, p. 765-769).

În continuare, interacțiunea hidrazidei **1** cu disulfid de tetrametiltiuram (TMTD), în N,N-dimetilformamida (DMF) și apă (10 mol%) conform metodei descrise anterior de autorii (Rusu, G.G.; Gutu, E.E.; Barba, N.A. Russ. J. Org. Chem., Vol. 31, 1995, p. 1721-1722), a condus la (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olul **2** revendicat, într-o singură etapă cu un randament de 60% (Schema 1).

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



Reagenți și condiții: a. TMTD, DMF, H₂O (10 mol%) 90 °C, 1,5h, 60%;

Schema 1. Sinteza (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olului **3** din sclareolidă

În rezultatul testărilor biologice s-a demonstrat că (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olul manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene excelente la valori ale concentrației minime inhibitorie (MIC, μg/ml) de 0,032 și 0,094, respectiv, care sunt net superioare celor caracteristice compușilor de referință *Caspofungin* și *Kanamycin* (Tabel).

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

Exemplu de realizare a invenției

Sinteza (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-olului **3**

La soluția formată din hidrazida **1** (1 mmol) în DMF (3 mL) și apă (10 mol%) se adaugă TMTD (1.5 mmol). Amestecul de reacție se agită la temperatura de 90°C timp de 1.5 h, apoi după răcire amestecul de reacție se toarnă în soluție apoasă de KOH (15 mL). Precipitatul format se filtrează, iar soluția se acidulează cu HCl conc. până la mediu slab acid. Amestecul format se extrage cu clorură de metilen (3 x 10 mL), iar extractul organic se usucă pe sulfat de sodiu anhidru. Produsul de reacție obținut 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 0.4:9.6 (v/v). În rezultat se obține (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametil-decahidronaftalen-2-olului **2** (randament 60%), compus cristalin p.t. =139-140°C, $[\alpha]_D^{20} = -29.1^\circ$ ($c=0.5$, CHCl₃). Structura compusului **2** a fost confirmată de datele analizelor:

5 Spectroscopie în IR (ν, cm⁻¹): 3385, 3091, 2924, 1665, 1578, 1459, 1387, 1265, 1161, 1054, 938 cm⁻¹.

Rezonanță magnetică ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz, ppm): δ 14.14 (1H, s, SH), 4.42 (1H, s, OH), 2.89-2.72 (2H, m, H-11), 1.48 (1H, t, J 4.88 H-9), 0.89 (1H, d, J 11.96 H-5), 1.04 (3H, s, H-13), 0.83 (3H, s, H-15), 0.80 (3H, s, H-16); 0.76 (3H, s, H-14);

10 Rezonanță magnetică ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz, ppm): δ 188.91 (C-S), 168.06 (C-12), 72.09 (C-8), 61.79 (C-9), 55.94 (C-5), 43.89 (C-7), 41.77 (C-3), 39.66 (C-1), 39.25 (C-10), 33.65 (C-14), 33.31 (C-4), 23.16 (C-13), 27.11 (C-11), 21.75 (C-15), 20.37 (C-6), 18.32 (C-2), 15.43 (C-16).

HR-EI-MS: găsit 341.17175 C₁₇H₂₈N₂OS₂. Calculat 340.16430.

15 Testarea activității biologice a (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametil-decahidronaftalen-2-olului **2**

Activitatea biologică a compusului revendicat a fost testată *in vitro* pe 5 specii de fungi (*Aspergillus flavus* ATCC 20046, *Fusarium* ATCC 20327, *Penicillium chrysogenum* ATCC 20044, *P. frequentans* ATCC 10110 și *Alternaria alternata* ATCC 8741) provenite din culturi pure și 2 specii de bacterii: gram-positiv (*Bacillus sp.* ATCC 15970) și gram-negativ (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813) sunt raportate în tabel.

20 Rezultatele testării activității biologice a (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametil-decahidronaftalen-2-olului **3**

Tabel

Compusul	Concentrație minimă inhibitorie (MIC, μg/mL)						
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Compus revendicat	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,094	0,094
Compusul celei mai apropiate soluții	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,032	0,032
Caspofungin	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-	-
Kanamicină	-	-	-	-	-	3,0	3,0

25

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).

30

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., López, M., Martin, T. *Tetrahedron* Vol. 61, No. 34, 2005, p. 8177-8191).

35

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

Încărcătura finală a inoculului-stoc astfel pregătit este de 1x10⁴ μg/mL. Plăcile inoculate se incubează la temperatura de 30°C, timp de 7 zile.

40

Primele observații se fac după 48 de ore, iar analiza finală după 7 zile, stabilindu-se concentrația minimă inhibitorie (MIC) și densitatea viabilă a microorganismelor prezente. Valorile MIC se citesc direct pe banda standard în punctul în care marginea elipsei de inhibiție intersectează banda pentru fiecare tip de microorganisme.

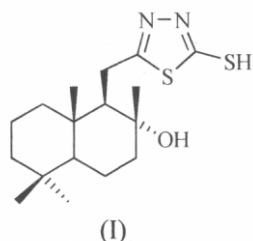
Rezultatul invenției este condiționat de utilizarea, pentru prima dată, a (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidro-naftalen-2-olului în calitate de compus ce posedă proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Desnos-Ollivier M., Dromer F., Dannaoui E. Detection of Caspofungin resistance in *Candida* spp. by Etest. *J.Clin. Microbiol.* Vol. 46, No 7, 2008, p. 2389-2392
2. Van der Broek P.J., Buys L.F., Van der Barselaar M.T., Leijh P.C., Van Furth R. Influence of human monocytes on the antibacterial activity of kanamycin and gentamicin for *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemoth.* Vol. 29, No. 6, 1986, p. 1032-1039
3. Aricu A., Ciocarlan A., Lungu L., Shova S., Zbancioc G., Mangalagiu I., Vornicu N. Synthesis of new antibacterial and antifungal drimane sesquiterpenoids with azaheterocyclic units. *Medicinal Chemistry Research.* Vol. 25, No. 10, 2016, p. 2316-2323

(57) Revendicări:

1. Compus (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-tiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol cu formula (I):



2. Compus (1R,2R,8aS)-1-((5-mercapto-1,3,4-tiadiazol-2-il)metil)-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-2-ol pentru utilizare în calitate de compus cu proprietăți antifungice și antibacteriene.