



MD 4621 B1 2019.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4621** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07F 1/08* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
C07D 213/86 (2006.01)
A61K 31/30 (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 2018 0052 (22) Data depozit: 2018.06.28	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.02.28, BOPI nr. 2/2019
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: BURDUNIUC Olga, MD; BĂLAN Greta, MD; GRAUR Vasilii, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GULEA Aurelian, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) **Compuși ai cuprului (II) cu 4-alitiosemicarbazona 2-acetilpiridinei în calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans***

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la compuși coordinativi ai cuprului (II) biologic activi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție care pot fi aplicați în calitate de preparate cu proprietăți antifungice.

Esența invenției constă în aceea că se propune nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]-carbamohidrazontioato}imidazolcupru

2
monohidrat și nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamohidrazontioato}-(3,4-dimetilpiridin)cupru pentru utilizare în calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*.

Revendicări: 2

Figuri: 1

MD 4621 B1 2019.02.28

(54) Copper (II) compounds with 2-acetylpyridine 4-allylthiosemicarbazone as *Cryptococcus neoformans* fungi proliferation inhibitors

(57) Abstract:

1
The invention relates to chemistry and medicine, namely to biologically active coordinative copper (II) compounds from the class of transition metal thiosemicarbazones, which can be used as preparations with antifungal properties.

Summary of the invention consists in that nitrate- $\{N-(prop-2-en-1-yl)-N'-[1-(pyridine-2-yl)-ethylidene]-$

2
carbamohydrazonethioato}imidazolecopper monohydrate and nitrate- $\{N-(prop-2-en-1-yl)-N'-[1-(pyridine-2-yl)-ethylidene]-$ carbamohydrazonethioato}- $(3,4-$ dimethylpyridine)copper are proposed for use as *Cryptococcus neoformans* fungi proliferation inhibitors.

Claims: 2

Fig.: 1

(54) Соединения меди (II) с 4-аллилтиосемикарбазон 2-ацетилпиридина в качестве ингибиторов пролиферации грибов вида *Cryptococcus neoformans*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к химии и медицине, а именно к биологически активным координационным соединениям меди (II) из класса тиосемикарбазонатов переходных металлов, которые могут быть использованы в качестве препаратов с противогрибковыми свойствами.

Сущность изобретения состоит в том, что предлагаются нитрато- $\{N-(проп-2-ен-1-ил)-N'-[1-(пиридин-2-ил)-этилиден]-$

2
карбамогидразонтиоато}имидазолмедь моногидрат и нитрато- $\{N-(проп-2-ен-1-ил)-N'-[1-(пиридин-2-ил)-этилиден]-$ карбамогидразонтиоато}- $(3,4-$ диметилпиридин)медь для использования в качестве ингибиторов пролиферации грибов вида *Cryptococcus neoformans*.

П. формулы: 2

Фиг.: 1

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

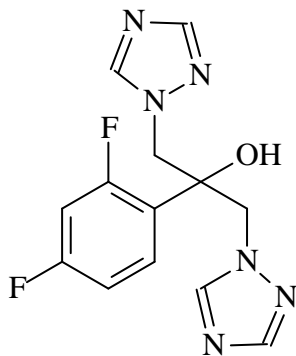
5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la doi compuși coordinați de cupru biologic activi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acești compuși inhibă proliferarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* și manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de un spectru larg de microorganisme gram-pozitive și gram-negative. Datorită acestor proprietăți ei pot găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparate antifungice și antimicrobiene.

10 Dintre toți fungii patogeni pentru om, speciile de *Cryptococcus neoformans* și *Candida albicans* provoacă cele mai multe infecții, adesea severe, care necesită tratament îndelungat și profilaxie secundară.

15 Genul *Cryptococcus* cuprinde peste 50 de specii, doar speciile *Cryptococcus neoformans* și *Cryptococcus gattii* fiind agenți patogeni importanți la om. În corpul gazdei și pe majoritatea mediilor de cultură celula levurică este înconjurată de o capsulă groasă polizaharidică, care determină rezistența la fagocitoză. *Cryptococcus neoformans* este un saprofit omniprezent în sol, în zonele cu climă temperată. Adeseori el se găsește în dejecțiile păsărilor, în special al porumbeilor, unde rămâne viabil până la 2 ani. *Cryptococcus neoformans* de serotip A cauzează infecții la pacienții imunocompromiși, inclusiv la pacienții HIV-infecțiați. Cele mai multe cazuri de criptocoză sunt cauzate de *Cryptococcus neoformans* la persoanele cu imunitate celulară deprimată. Bolnavii cu SIDA și beneficiarii de transplant de organe sunt deosebit de sensibili. Unele forme de cancer, sarcoidoza și tratamentul prelungit cu corticosteroizi, de asemenea, sporesc riscul de afecțiuni criptococice grave. Infecția cu *Cryptococcus neoformans* este cea mai frecventă micoză la pacienții cu SIDA. Deseori criptocoză este primul indicator al SIDA.

20 Riscul de infectare cu criptococ apare la dereglarea imunității T-celulare: infecția HIV/SIDA, limfoamele, leucemiile limfocitare cronice, sarcoidoza, transplantul de organe, tratamentele îndelungate cu glucocorticosteroizi și cu imunosupresoare, chimioterapia antitumorală. Alți factori predispozanți sunt diabetul zaharat, patologia renală și hepatică, 30 fumatul. Rata de fatalitate de la *Cryptococcus neoformans* este mare: letalitatea în meningoencefalita fără tratament este de 100%. La supraviețuitori sunt frecvente sechelele neurologice, inclusiv pierderea vederii, scăderea funcției mentale, hidrocefalia și paraliziiile nervilor cranieni. La imunocompromiși criptocoză necesită terapie antifungică sistemică îndelungată.

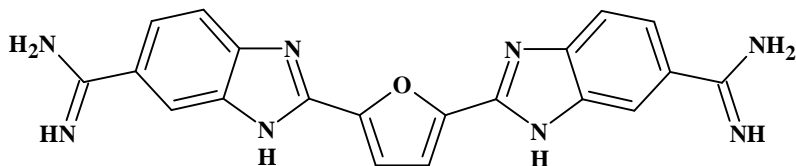
35 Timp de mai multe decade, pentru terapia infecțiilor sistematice au fost utilizați azolii, cu reprezentantul de seamă fluconazolul:



40 Toți azolii sunt fungistatici, dar în funcție de doză sunt fungicizi și eficienți împotriva speciilor de *Candida* și *Cryptococcus*. Cu toate aceste progrese, terapia antifungică ca și cea antibacteriană semnalează apariția fenomenului de rezistență la preparatele actuale.

Fluconazolul inhibă creșterea și multiplicarea majorității micetelor levuriforme la concentrația 16 μg/mL, însă nu poate fi utilizat în cazurile, când este necesară o activitate antimicotică mai înaltă a preparatului față de fungii susnumiți [1]. În afară de aceasta, el nu posedă o activitate antimicrobiană și nu poate fi folosit pentru tratarea infecțiilor provocate de microorganismele gram-pozitive și gram-negative.

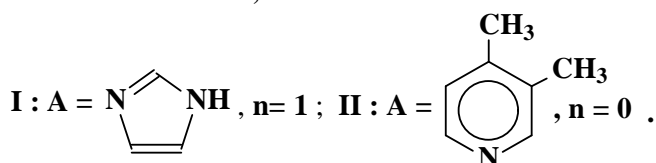
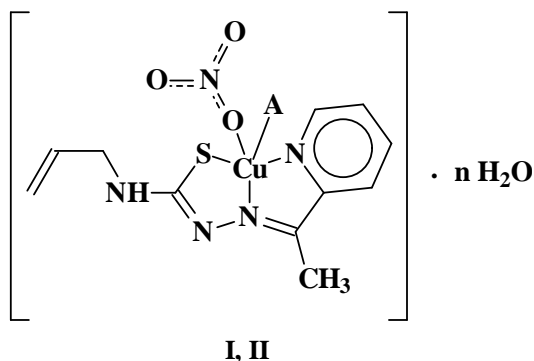
45 Din toți compușii chimici, care inhibă creșterea și multiplicarea fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*, cel mai înalt efect antifungic a fost obținut în cazul 2,5-bis(5-amidino-2-benzimidazolil)furanului [2] cu formula:



După activitatea antimicotică față de fungii din specia *Cryptococcus neoformans* acest compus depășește de 25,8 ori caracteristicile respective ale fluconazolului, utilizat actualmente 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 compusul dat 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 și antimicrobiană înaltă.

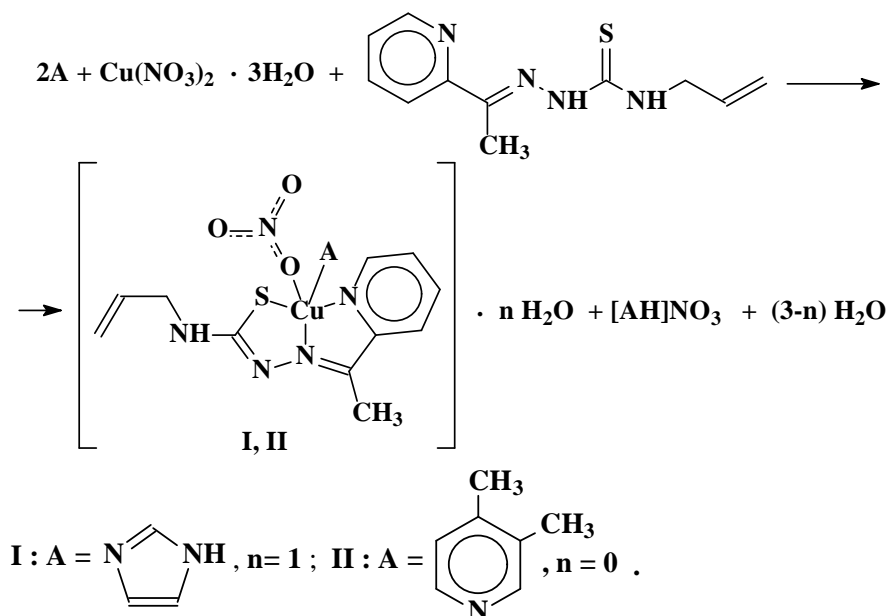
Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans* a hidratului de nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)-etiliden]-carbamohidrazontioato}imidazolcupru și nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamohidrazontioato}-(3,4-dimetilpiridin)cupru cu formula generală:



Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea complexelor I și II, care manifestă activitate fungistatică și fungică față de fungii din specia *Cryptococcus neoformans*, ce depășește de 32,7...133,3 ori activitatea fluconazolului utilizat în medicină și de 5,2...1,3 depășesc activitatea celei mai apropiate soluții. În aceleași timp, compușii coordinați declarați manifestă activitate antimicrobiană înaltă față de un spectru larg de microorganisme gram-pozitive și gram-negative.

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

Compușii revendicați se obțin la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50-55°C) ale imidazolului (în cazul compusului I) sau 3,4-dimetilpiridinei (în cazul II) cu trihidratul nitrului de cupru(2+) și N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarboamida (4-aliitiosemicarbazona 2-acetilpiridinei) luate în raport molar 2:1:1. Reacția decurge în 50-60 min conform următoarei scheme:



Mecanismul reacției date constă în adăția la ionul de cupru(2+) a două molecule de amină și formarea aductului, care, fiind coordinativ nesaturat, mai departe interacționează cu 4-aliltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei, jucând rolul de ligand-N,N,S tridentat monodeprotonat. Una din moleculele de amină în rezultatul acestui proces este substituită din sfera internă cu azometina polidentată, participă în deprotonarea tiosemicarbazonei și formarea nitrului de imidazoliu sau 3,4-dimetilpiridiniu. Al patrulea și cincilea locuri în sfera coordinativă a acestui atom central sunt ocupate de molecula de amină rămasă și de nitrat-ion.

Exemplu de obținere a hidratului de nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamohidrazontioato}imidazolcupru (compusului I). Se amestecă 20 ml de soluție etanolică, care conține 20 mmol de imidazol și 10 mmol de trihidrat al nitrului de cupru(2+) cu 10 mmol de N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotoamidă (4-aliltiosemicarbazonei 2-acetilpiridinei), dizolvat în 30 ml de alcool. Amestecul reactant este încălzit (50...55°C) și amestecat în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic timp de 50-60 min. La răcire, din soluție, cu randamentul 84% față de cel calculat teoretic, se depun cristale mărunte de culoare verde întunecată, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu etanol, eter și uscate la aer.

S-a determinat, %: Cu – 14,45; N – 22,34; S – 7,33. Pentru $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{CuN}_7\text{O}_4\text{S}$ s-a calculat, %: Cu – 14,28; N – 22,04; S – 7,21.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm^{-1} : $\nu(\text{NH}) = 3220, 3142$; $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{Alil}} = 1639$; $\nu(\text{C}=\text{N}) = 1601, 1589, 1563, 1525$; $\nu(\text{C}-\text{S}) = 749$; $\nu(\text{Cu}-\text{N}) = 525, 415 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{Cu}-\text{S}) = 459$.

La temperatura camerei (290 K) complexul dat are momentul magnetic efectiv egal cu 1,79 m.B.

Exemplu de obținere a nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamohidrazontioato}-(3,4-dimetilpiridin)cupru (compusului II). Compusul coordinativ a fost sintetizat cu randamentul 80% față de cel teoretic calculat după metoda descrisă mai sus, folosind în calitate de substanțe inițiale 3,4-dimetilpiridina, trihidratul nitrului de cupru(2+) și N-(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotoamidă (4-aliltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei) luate în raport molar 2:1:1.

S-a determinat, %: Cu – 13,76; N – 17,82; S – 6,76. Pentru $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{CuN}_6\text{O}_3\text{S}$ s-a calculat, %: Cu – 13,64; N – 18,03; S – 6,88.

Benzile de absorbție în spectrul IR, cm^{-1} : $\nu(\text{NH}) = 3350$; $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{Alil}} = 1647$; $\nu(\text{C}=\text{N}) = 1602, 1591, 1563, 1525$; $\nu(\text{C}-\text{S}) = 743$; $\nu(\text{Cu}-\text{N}) = 521, 410 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{Cu}-\text{S}) = 465$.

La temperatura camerei (293 K) complexul dat are momentul magnetic efectiv egal cu 1,82 m.B.

Procedeele de obținere a compușilor coordinativi I-II revendicați este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile. Compușii sunt stabili în contact cu aerul, puțin solubili în apă și alcoholi, sunt solubili în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubili în eter. N-

(prop-2-en-1-il)-2-[1-(piridin-2-il)etiliden]hidrazincarbotoamidă (4-aliltiosemicarbazona 2-acetilpiridinei) a fost sintetizată după metoda descrisă în Richardson D. R., Kalinowski D. S., Richardson V., Sharpe P. C., Lovejoy D. B., Islam M., Bernhardt P. V. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones are potent iron chelators and antiproliferative agents: redox activity, iron complexation and characterization of their antitumor activity. J. Med. Chem., vol. 52(5), 2009, p. 1459-1470. Doi: 10.1021/jm801585u.

La recristalizarea compusului I din soluție etanolică au fost obținute monocristale, structura cărora a fost stabilită cu ajutorul analizei cu raze X (Formula moleculară - $C_{14}H_{19}CuN_7O_4S$, grupa spațială Fdd2, a = 43,367(4) Å, b = 14,2283(10) Å, c = 11,7706(6) Å, $\alpha = 90$ grad, $\beta = 90$ grad, $\gamma = 90$ grad). Experimentul s-a efectuat la difractometrul Xcalibur-Gemini "Oxford Diffraction". Structura a fost determinată prin metoda directă și stabilită folosind metoda patraților minime în apropiere anizotrope pentru atomii de hidrogen după programele SHELX-97. Atomii de hidrogen sunt incluși în pozițiile geometrice prevăzute, iar factorul lor de temperatură U_H este luat de 1,2 ori mai mare, decât în cazul atomilor de carbon și oxigen legați cu ei.

A fost stabilit că compusul I revendicat posedă o structură mononucleară tetragonal-piradimală (Fig.). Numărul de coordinare al cuprului este egal cu 5. Trei poziții de coordinare în sfera internă a atomului central sunt ocupate de atomii donori ai tiosemicarbazonei, coordonate prin intermediul atomilor de azot piridinic și azometinic și atomul de sulf, formând două metalocicluri din cinci atomi. Atomul de sulf se află în forma tiolică și este deprotonat (lungimea legăturii C-S este egală cu 1,742 Å). Al patrulea loc coordinativ în baza piramidei este ocupat de atomul de azot al imidazolului. În poziția apicală este poziționat atomul de oxigen al ionului nitrat. Lungimile legăturilor și unghiurile de valență între atomii donori ai ligandului organic și ionul de metal sunt în concordanță cu datele din literatură. În sfera exterioară a complexului se află o moleculă de apă.

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

Proprietățile antimicotice ale hidratul de nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamohidrazontioato}imidazolcupru și nitrato-{N-(prop-2-en-1-il)-N'-[1-(piridin-2-il)etiliden]-carbamohidrazontioato}-(3,4-dimetilpiridin)cupru au fost cercetate "in vitro" pe tulpini de laborator de micete levuriforme *Cryptococcus neoformans*, *Candida parapsilosis* ATCC 2219, *Candida krusei* ATCC 6258 și *Candida albicans* ATCC 90028. 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. 2.5×10^6 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 absorbanta fiecărui godeu la 405 nm. CMI-ul se calcula ca fiind cea mai mică concentrație care inhibă creșterea (comparativ cu martorul pozitiv).

Determinarea activității antimicrobiene a compușilor I și II declarați a fost efectuată în mediu nutritiv lichid [bulion peptonat din carne de 2%, pH = 7,0] prin metoda diluțiilor succesive. În calitate de cultură de referință în experimentul *in vitro* au fost folosite tulpinile standard de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*. Dizolvarea substanțelor studiate în dimetilformamidă, cultivarea microorganismelor, obținerea suspensiei, determinarea concentrației minime de inhibare (CMI) și concentrației minimale bactericide (CMB) au fost efectuate după metoda standard descrisă în literatură.

Rezultatele studiului activității biologice ale compușilor revendicați sunt prezentate în Tabel, din care se vede, că ei posedă activitate fungistatică și fungică în limitele concentrațiilor 0,12-7,81 $\mu\text{g/mL}$ față de toate tulpini de micete levuriforme. Cele mai sensibile față de compușii I și II sunt fungii din specia *Cryptococcus neoformans* (CMI(I) = 0,49 $\mu\text{g/mL}$, CMB(I) = 0,98 $\mu\text{g/mL}$, iar CMI(II) = 0,12 $\mu\text{g/mL}$, CMB(II) = 0,24 $\mu\text{g/mL}$). Cum se vede din tabel, compușii declarați I și II manifestă activitate antimicotică ce depășește de 133,3-32,7 ori activitate fluconazolului, utilizate în medicină și de 5,2...1,3 depășesc activitatea celei mai apropiate soluții. În aceleași timp compușii coordinativi I și II manifestă activitate antimicrobiană înaltă față de un spectru larg de microorganisme gram-pozitive (CMI = 0,03 - 0,98 $\mu\text{g/mL}$, CMB = 0,12...15,63 $\mu\text{g/mL}$) și gram-negative (CMI = 0,12...62,5 $\mu\text{g/mL}$, CMB = 0,24...125,0 $\mu\text{g/mL}$). Manifestând activitate antimicotică selectivă

înaltă, compușii revendicați manifestă activitate antimicrobiană comparabilă, iar în unele cazuri mai înaltă decât activitatea bacteriostatică și bactericidă ale unor compuși coordinați de cupru biologic activi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție cu cea mai înaltă activitate antimicrobiană (MD 4179 B1 2012.07.31; MD 4112 B1 2011.05.31).

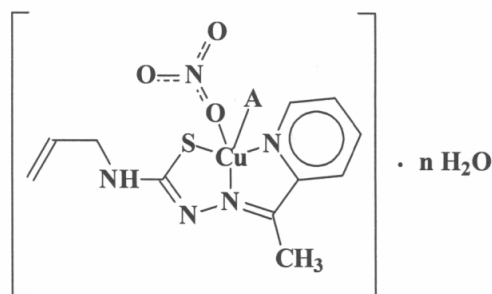
- 5 Proprietățile depistate ale compușilor nominalizați prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de remedii antimicotice sau antimicrobiene și permite utilizarea lor în cazul rezistenței fungilor și microorganismelor față de medicamentele tradiționale.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

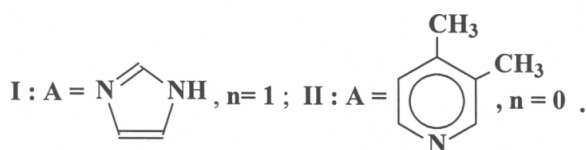
1. Bastos T., Maria Soares B., Silva Cisalpino P., Castro Mendes I., Dos Santos R., Beraldo H. coordination to gallium (III) strongly enhances the potency of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones against *Cryptococcus* opportunistic fungi. *Microbiological Research*, v. 165, No 7, 2010, p. 573-577
2. US 6156779 A 2000.12.05

(57) Revendicări:

1. Compuși ai cuprului (II) cu 4-alitiosemicarbazona 2-acetilpiridinei cu formula generală:



I, II



2. Compuși ai cuprului (II) cu 4-alitiosemicarbazona 2-acetilpiridinei cu formula generală definită în revendicarea 1, pentru utilizare în calitate de inhibitori ai proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans*.

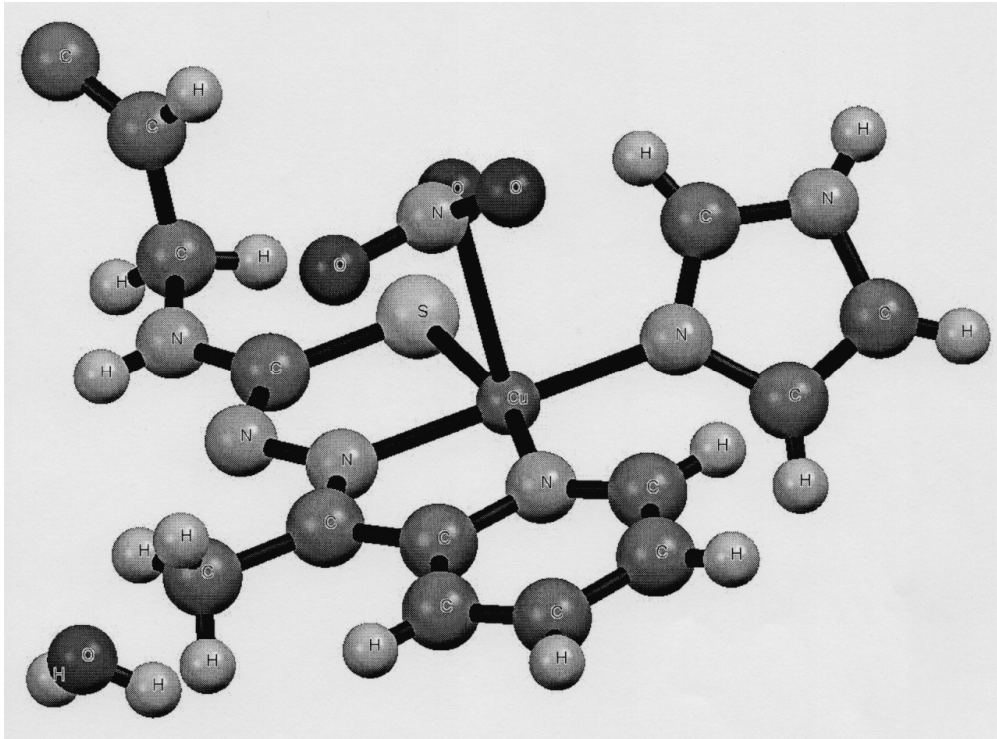


Fig. 1