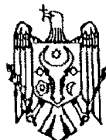




MD 4769 B1 2021.10.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4769** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *A61K 31/015* (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A01N 27/00 (2006.01)
A01N 47/34 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
C07C 13/50 (2006.01)
C07C 35/36 (2006.01)
C07C 337/08 (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 2020 0010 (22) Data depozit: 2020.02.14	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.10.31, BOPI nr. 10/2021
(41) Data publicării cererii: 2021.08.31, BOPI nr. 8/2021	
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE CHIMIE, MD (72) Inventatori: ARICU Aculina, MD; BLAJA Svetlana, MD; LUNGU Lidia, MD; CIOCARLAN Alexandru, MD; VORNICU Nicoleta, RO (73) Titular: INSTITUTUL DE CHIMIE, MD (74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

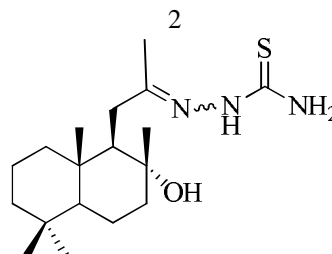
(54) (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidă pentru utilizare în calitate de remediu antifungic

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la domeniul chimiei, medicinei și agriculturii, și anume la un compus cu schelet hibrid terpenic și tiosemicarbazonic, care poate găsi aplicare în medicină și agricultură în calitate de preparat antifungic.

Conform invenției, se revendică utilizarea (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidei cu formula:



in calitate de remediu antifungic.
Revendicări: 1

MD 4769 B1 2021.10.31

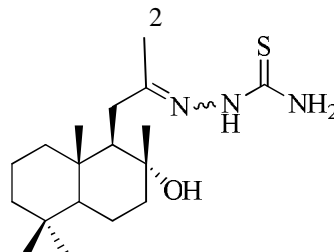
(54) (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hydroxy-2,5,5,8a-tetramethyldecahydronaphthalen-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide for use as an antifungal agent

(57) Abstract:

1

The invention relates to the field of chemistry, medicine and agriculture, namely to a compound with hybrid terpene and thiosemicarbazone skeleton, which can be used in medicine and agriculture as an antifungal agent.

According to the invention, claimed is the use of (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hydroxy-2,5,5,8a-tetramethyldecahydronaphthalen-1-yl)propan-2-ylidene)hydrazinecarbothioamide with the formula:



as an antifungal agent.

Claims: 1

(54) (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-гидрокси-2,5,5,8а-тетраметилдекагидронафтален-1-ил)пропан-2-илиден)гидразинкарботиоамид для применения в качестве антигрибкового средства

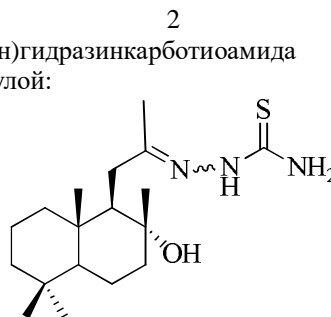
(57) Реферат:

1

Изобретение относится к области химии, медицины и сельского хозяйства, а именно к соединению с гибридным терпеновым и тиосемикарбазоновым скелетом, которое может найти применение в медицине и сельском хозяйстве в качестве антигрибкового препарата.

Согласно изобретению, заявляется применение (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-гидрокси-2,5,5,8а-тетраметилдекагидронафтален-1-ил)пропан-2-

илиден)гидразинкарботиоамида формулой: с



в качестве антигрибкового средства.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

5 Invenția se referă la domeniul chimiei, medicinei și agriculturii, și anume la sinteza (*Z/E*)-2-(1-((1*R*,2*R*,8*aS*)-2-hidroxi-2,5,5,8*a*-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)-hidrazincarbotoamidei, compus cu schelet hibrid terpenic și tiosemicarbazonic, care poate găsi aplicare în medicină și agricultură în calitate de preparat antifungic.

10 Infecțiile provocate de fungi sunt foarte răspândite și aduc prejudicii grave sănătății. Majoritatea preparatelor antifungice existente nu asigură un efect curativ stabil și complet. 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 fungii devin rezistenți 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 numite 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].

Preparatul menționat însă are și un șir de dezavantaje, ce constau în:

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

În literatura de specialitate sunt descriși unii compuși guanidinici care au fost testați *in vitro* pe tulpinile de fungi (*Candida albicans*). Autorii [2] menționează că acești compuși manifestă activitate antifungică bună, fiind activi la concentrația inhibitorie minimală (CMI) de 32 μg/mL.

25 Inițial (+)-sclareolida comercial accesibilă, a fost transformată în cinci etape în drimenol cu un randament total de 75%. Oxidarea drimenolului cu clorocromat de piridiniu (PCC) a condus la drimenal, iar condensarea acestuia cu hidroxilamina a generat un amestec de oxime corespunzătoare. Reducerea *in situ* a acestui amestec cu alumohidrua de litiu a condus la aminodrimenă, urmată de atașarea grupei guanidinice la atomul de carbon C-11, obținându-se compusul dorit 11-guanidinodrimena cu un randament total de 55%.

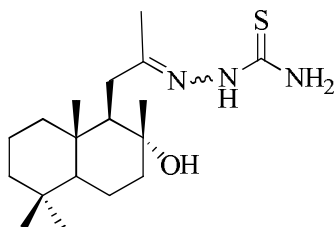
30 În calitate de cea mai apropiată soluție a fost selectată lucrarea în care este descrisă sinteza unor compuși tetranorlabdanici (sesquiterpenoide homodrimanice) ce conțin fragmentul hidrazincarbotoamidic sau 1,2,4-triazolic *N*-substituit prin metode clasice și la iradiere cu microunde [3].

35 Sintezele au fost realizate în bază de (+)-sclareolida **1** care a fost tratată cu hidrat de hidrazină, obținându-se hidrazida corespunzătoare. Interacțiunea acesteia cu izotiocianatii substituiți a condus la hidrazincarbotoamidele intermediare cu structura asemănătoare cu cea a compusului **3**. Testările antimicrobiene a acestora pe cinci specii de fungi și două tulpini de bacterii a confirmat că una dintre hidrazincarbotoamidele menționate manifestă o activitate antifungică (CMI=0,125 μg/mL) comparabilă cu cea a compusului trinorlabdanic terpeno-
40 heterociclic **3**.

45 Dezavantajul compușilor revendicați în soluția apropiată constă în faptul că pentru sinteza lor sunt folosiți reagenți mai scumpi și utilaj special în comparație cu sinteza compusului din prezenta invenție. Toate acestea complică procedeul de obținere a hidrazincarbotoamidelor intermediare și mărește costul acestora.

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

50 Problema se soluționează prin aceea că se revendică (*Z/E*)-2-(1-((1*R*,2*R*,8*aS*)-2-hidroxi-2,5,5,8*a*-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamida cu formula:



pentru utilizare în calitate de remediu antifungic.

Extinderea cercetărilor științifice realizate în Republica Moldova în domeniul elaborării remediilor antifungice cu activitate biologică ridicată are puncte forte deoarece oferă preparate la prețuri competitive cu cele de import, adică accesibile pentru populație, și are la bază materia primă locală. O valoare adăugată invenției oferă faptul că materia primă locală este renovabilă, accesibilă și poate fi obținută din deșeurile provenite din industria plantelor etero-oleaginoase.

Rezultatul invenției constă în obținerea unui compus terpeno-tiosemicarbazonic (*Z/E*)-2-(1-((1*R*,2*R*,8*aS*)-2-hidroxi-2,5,5,8*a*-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidă, care poate fi utilizat pentru tratarea unor afecțiuni de natură fungică.

Avantajele compusului constau în:

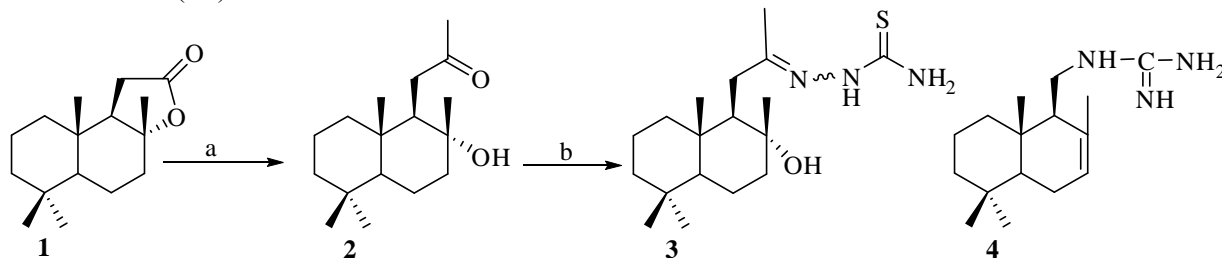
1. Activitatea biologică ridicată a (*Z/E*)-2-(1-((1*R*,2*R*,8*aS*)-2-hidroxi-2,5,5,8*a*-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidei în raport cu preparatele cunoscute - caspofungina;
2. Accesibilitatea compusului sub aspect eficiență/preț;
3. Accesibilitatea materiei prime și originea ei locală;
4. Eficiența și simplitatea metodei de sinteză a acestuia (2 etape).

Compusul (*Z/E*)-2-(1-((1*R*,2*R*,8*aS*)-2-hidroxi-2,5,5,8*a*-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamida, ce posedă un schelet hibrid terpenic și tiosemicarbazonic poate fi utilizat în calitate de compus cu proprietăți antifungice pronunțate, fapt confirmat de testările biologice a acestuia *in vitro* pe speciile de fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*.

De menționat, că obținerea (*Z/E*)-2-(1-((1*R*,2*R*,8*aS*)-2-hidroxi-2,5,5,8*a*-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidei a fost descrisă în sursa: Blaja S. Sinteza compușilor trinorlabdanici cu fragment tiosemicarbazonic și 1,3-tiazolic cu potențială activitate biologică. Materialele conferinței științifice a doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: Viziuni ale tinerilor cercetători”, Ediția a VIII-a, vol. I, Chișinău, Moldova, 10 iunie 2019, p. 34-37.

În calitate de materie primă pentru obținerea compușilor revendicați a fost utilizată (+)-sclareolida **1** comercial accesibilă, care într-o etapă a fost transformată în 8*α*-hidroxi-14,15,16-trinorlabd-12-ona **2**, cu un randament de 65%, în conformitate cu metoda descrisă în literatură (Cucicova C., Aricu A., Secara E., Vlad P., Ungur N. Procedeu de obținere a 14,15-bisnorlabdan-8(9)-en-13-unei, MD 4248). În continuare interacțiunea cetonei **2** cu tiosemicarbazida în etanol, conform metodei descrise anterior de autorii (Mohareb R.M., Wardakhan W.W., Elmegeed G.A., Ashour R.M.S. Heterocyclizations of pregnenolone: Novel synthesis of thiosemicarbazone, thiophene, thiazole, thieno [2,3-*b*] pyridine derivatives and their cytotoxicity evaluations. Steroids, vol. 77, No 14, 2012, p. 1560-1569) a condus la obținerea compusului hibrid cu fragment dihomodimeric și tiosemicarbazonic **3**, cu un randament de 76% (Schema 1). Tiosemicarbazonele au fost obținute sub formă de amestec a doi stereoizomeri.

Structura compusului a fost confirmată prin metode de analiză obligatorii, spectroscopie în infraroșu (IR), rezonanță magnetică nucleară monodimensională (¹H, ¹³C și ¹⁵N RMN) și bidimensională (2D).



Reagenți și condiții: a. CH₃Li, Et₂O, 20°C, 15 min, 65%; b. NH₂NHCSNH₂, EtOH, 8 ore, 80°C, 76%.

Schema 1. Sinteza (*Z/E*)-2-(1-((1*R*,2*R*,8*aS*)-2-hidroxi-2,5,5,8*a*-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidei **3** din (+)-sclareolida **1**.

În rezultatul testărilor biologice s-a demonstrat că (*Z/E*)-2-(1-((1*R*,2*R*,8*aS*)-2-hidroxi-2,5,5,8*a*-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamida **3** manifestă proprietăți antifungice pronunțate la valori ale concentrației minime inhibitorie (CMI) de 0,19

$\mu\text{g/mL}$, care sunt superioare celor caracteristice compușilor de referință caspofungina și comparabilă cu cea a compusului din cea mai apropiată soluție (vezi tabelul).

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

5 Exemplet de realizare a invenției

Sinteza (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidei **3**.

10 La soluția formată din hidroxicetona **2** (1 mmol) în etanol (5 mL) se adăugă tiosemicarbazida (1,2 mmol). Amestecul de reacție se agită la temperatura de 80°C timp de 8 ore, după care solventul se distilează la presiune redusă. Reziduul obținut se purifică pe coloana cromatografică impregnată cu SiO₂, eluent MeOH, obținându-se produsul **3** (randament 76%).

Formula moleculară C₁₈H₃₃N₃O₅. Compus cristalin, p.t. = 97-99°C (MeOH), $[\alpha]_D^{20}$ -126.08° (c 1.5, CHCl₃). Structura compusului **3** a fost confirmată de datele analizelor:

15 Spectroscopie în IR (ν , cm⁻¹): 3426, 3260, 2923, 1589, 1506, 1456, 1443, 1387, 1259, 1082, 936, 733.

Izomerul *cis*:- (Z)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamida.

20 Rezonanță magnetică ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz, ppm): δ 0.75 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 1.14 (3H, s, H-17), 2.00 (3H, s, H-13), 3.12 (s, OH), 6.67 și 7.21 (ambele s, NH₂), 8.58 (s, NH).

Rezonanță magnetică ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz, ppm): δ 15.3 (C-20), 16.2 (C-13), 18.4 (C-2), 20.3 (C-6), 21.5 (C-18), 23.9 (C-17), 33.2 (C-4), 33.3 (C-19), 34.7 (C-11), 38.9 (C-10), 40.0 (C-1), 41.6 (C-3), 44.3 (C-7), 56.0 (C-5), 57.2 (C-9), 73.7 (C-8), 156.9 (C-12), 178.3 (C=S).

Rezonanță magnetică ¹⁵N RMN (CDCl₃, 40.54 MHz, ppm.): δ 103, 164 și 302.

25 Izomerul *trans*:- (E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamida.

Rezonanță magnetică ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz, ppm): δ 0.75 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-20), 1.19 (3H, s, H-17), 1.91 (3H, s, H-13), 3.12 (s, OH), 6.39 și 7.13 (ambele s, NH₂), 11.45 (s, NH).

30 Rezonanță magnetică ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz, ppm.): δ 15.1 (C-20), 18.2 (C-2), 20.3 (C-6), 21.3 (C-18), 24.3 (C-17), 25.7 (C-13), 28.2 (C-11), 33.1 (C-4), 33.3 (C-19), 38.7 (C-10), 40.2 (C-1), 41.4 (C-3), 43.8 (C-7), 55.6 (C-5), 57.9 (C-9), 75.1 (C-8), 155.2 (C-12), 177.9 (C=S).

Rezonanță magnetică ¹⁵N RMN (CDCl₃, 40.54 MHz, ppm.): δ 101, 164 și 298.

35 Testarea activității biologice a (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidei **3**.

40 Activitatea biologică a compusului a fost testată *in vitro* pe 5 specii de fungi, *Aspergillus niger* ATCC 53346, *Fusarium solani* ATCC 20327, *Penicillium chrysogenum* ATCC 20044, *Penicillium frequentans* ATCC 10110 și *Alternaria alternata* ATCC 8741, provenite din culturi pure. Rezultatele testării activității biologice exprimate în valori CMI (concentrația minimă inhibitorie) sunt raportate în tabel.

Tabel

Rezultatele testării activității biologice a (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidei

Compusul	Concentrație minimă inhibitorie (CMI, $\mu\text{g/mL}$)				
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Alternaria alternata</i>
Compusul 3	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Compusul din cea mai apropiată soluție	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Caspofungina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

45 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 cești 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).

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].

Casposfungina (strip test) se utilizează ca un compus standard pentru activitatea antifungică. Compusul standard a fost furnizat de firma Liofilchem (Italia).

Încărcătura finală a inoculului-stoc astfel pregătit este de 1×10^{-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 inhibitorie (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.

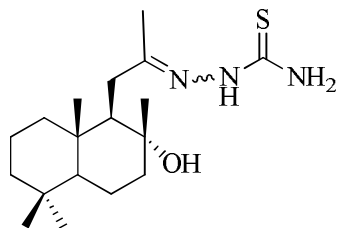
Rezultatul invenției este condiționat de utilizarea, pentru prima dată, a (Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)-hidrazincarbotoamidei în calitate de compus ce posedă proprietăți antifungice.

(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 (7), p. 2389-2392.
2. Zarraga M., Zarraga A. M., Rodriguez B., Perez C., Paz C., Paz P., Sanhueza C. Synthesis of a new nitrogenated drimane derivative with antifungal activity. *Tetrahedron Letters*, 2008, vol. 49 (32), p. 4775-4776.
3. Lungu L. et al. Synthesis and evaluation of biological activity of homodrimane sesquiterpenoids bearing hydrazinecarbothioamide or 1,2,4-triazole unit. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2019, vol. 55 (8), p. 716-724, găsit în Internet la data 2021.04.07 URL: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10593-019-02526-1>>

(57) Revendicări:

(Z/E)-2-(1-((1R,2R,8aS)-2-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametildecahidronaftalen-1-il)propan-2-iliden)hidrazincarbotoamidă cu formula:



pentru utilizare în calitate de remediu antifungic.