



MD 4891 B1 2024.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4891** (13) **B1**
(51) Int.Cl: C07C 233/57 (2006.01)
C07C 233/62 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

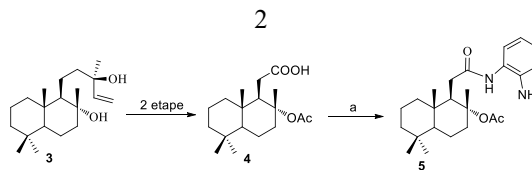
În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2022 0060 (22) Data depozit: 2022.12.30	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2024.04.30, BOPI nr. 4/2024
(71) Solicitant: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: LUNGU Lidia, MD; CIOCÂRLAN Alexandru, MD; CUCICOVA Caleria, MD; BLAJA Svetlana, MD; ARÎCU Aculina, MD; VORNICU Nicoleta, RO (73) Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) *N*-(2-Aminofenil)-8 α -acetoxi-homodrimacetamidă cu proprietăți antifungice și antibacteriene

(57) Rezumat:

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

Conform invenției, se revendică compusul *N*-(2-aminofenil)-8 α -acetoxi-homodrimacetamida **5**, care se obține conform schemei:



Reagenți și condiții pentru etapa a: *o*-fenilendiamina, Ph₃P, Et₃N, CCl₄, 80°C, 6 ore, 49%.

Compusul manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene excelente la valori ale concentrației minime inhibitorii respectiv de 0,05 și 0,032 $\mu\text{g/mL}$.

Revendicări: 2

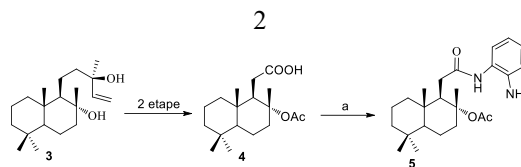
MD 4891 B1 2024.04.30

(54) *N*-(2-Aminophenyl)-8 α -acetoxy-homodrimacetamide with antifungal and antibacterial properties

(57) Abstract:

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

According to the invention, claimed is the compound *N*-(2-aminophenyl)-8 α -acetoxy-homodrimacetamide **5**, which is obtained according to the scheme:



Reagents and conditions used for stage a: *o*-phenylenediamine, Ph₃P, Et₃N, CCl₄, 80°C, 6h, 49%.

The compound exhibits excellent antifungal and antibacterial properties with minimum inhibitory concentration values of 0.05 and 0.032 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

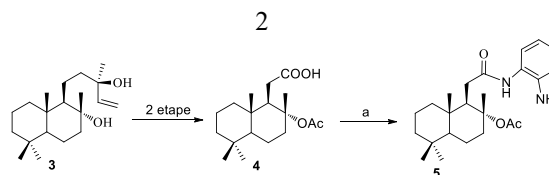
Claims: 2

(54) *N*-(2-Аминофенил)-8 α -ацетокси-гомодримацетамид обладающий антигрибковыми и антибактериальными свойствами

(57) Реферат:

Изобретение относится к области химии и медицины, в частности к синтезу нового соединения с гибридным терпеновым и ароматическим скелетом, которое может найти применение в медицине в качестве антигрибкового и антибактериального препарата.

Согласно изобретению, заявляется соединение *N*-(2-аминофенил)-8 α -ацетокси-гомодримацетамид **5**, которое получают по схеме:



Реагенты и условия проведения стадии а: *o*-фенилендиамин, Ph₃P, Et₃N, CCl₄, 80°C, 6ч, 49%.

Соединение проявляет отличные антигрибковые и антибактериальные свойства при значениях минимальной ингибирующей концентрации, соответственно 0,05 и 0,032 мкг/мл.

П. формулы: 2

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

Invenția se referă la domeniul chimiei și medicinei, în special la sinteza unui compus nou cu schelet hibrid terpenic și fenilendiaminic, 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 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 la fungi și bacterii apare rezistența la preparatele folosite pentru tratament, fapt ce stimulează cercetările în vederea obținerii unor preparate noi.

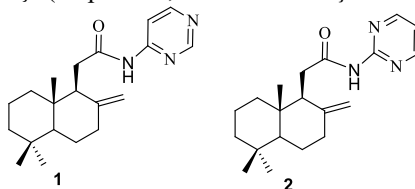
Dintre preparatele frecvent utilizate în practica medicală este bine cunoscută Caspofungina, reprezentant al unei clase noi de antifungice numite echinocandine. Acest preparat inhibă sinteza (1→3)-β-D-glucanului și crește permeabilitatea celulelor fungice, fapt ce favorizează scurgerea conținutului citoplasmatic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

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

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

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

Din stadiul tehnicii sunt cunoscuți compuși hibridi cu proprietăți biologice din șirul tetranorlabdanic **1** și **2**, obținut din materie primă (+)-sclareolida, care conțin scheletul homodrimanic și suplimentar unitatea structurală diazinică [3]. De menționat că, acești compuși au fost testați *in vitro* atât pe tulpini de bacterii Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*), Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) cât și pe tulpinile de fungi (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. sake*). Autorii menționează că compușii **1** și **2**, manifestă doar activitate antibacteriană bună împotriva speciilor *Staphylococcus aureus* și *Bacillus cereus* în comparație cu preparatele medicamentoase de referință (ampicilina, cloramfenicol și nistatină).

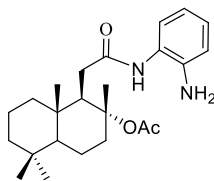


Reieșind din proprietățile biologice și structura sa hibridă constituită din unități structurale relativ apropiate, compușii **1** sau **2** în mod egal pot fi selectați în calitate de analog proximal. Compusul revendicat **5** se deosebește de analogul proximal **1** prin faptul că în unitatea sa structurală terpenică este prezentă grupa OAc în poziția C₈, în loc de grupa metină, iar de gruparea acetamidă este legat fragmentul aminobenzenic, versus fragmentul diazinic.

Dezavantajul analogului proximal constă în faptul că el manifestă doar o activitate antibacteriană bună, nu și antifungică, și doar pe două specii de bacterii din setul sus-menționat. Un alt dezavantaj este și faptul că el se obține în mai multe etape (opt la număr) și că din reacții rezultă amestecuri complexe de produse ce trebuie să fie separate cromatografic.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în lărgirea gamei de compuși hibridi enantiomeric puri, cu activitate antifungică și antibacteriană ridicată, obținuți prin semisinteze din materii prime autohtone, de origine vegetală, ieftine și accesibile, reprezentând deșeurii din industria uleiurilor eterice.

Problema se soluționează prin aceea că s-a obținut un compus nou *N*-(2-aminofenil)-8α-acetoxi-homodrimacetamida **5** cu formula:



care manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene.

Rezultatul invenției constă în obținerea unui compus nou, terpeno-aromatic **5** *N*-(2-aminofenil)-8α-acetoxi-homodrimacetamida, care poate fi utilizat pentru tratarea unor afecțiuni de natură fungică și bacteriană.

Extinderea cercetărilor științifice realizate în Republica Moldova în domeniul elaborării remediilor antifungice și antibacteriene 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 uleiurilor etero-oleaginoase.

Alte avantaje ale compusului revendicat constau în:

1. Activitatea biologică mai ridicată a *N*-(2-aminofenil)-8α-acetoxi-homodrimacetamidei în raport cu preparatele cunoscute Caspofungina și Kanamicina;
2. Accesibilitatea materiei prime și originea ei locală;
3. Accesibilitatea compusului revendicat sub aspect eficiență/preț;
4. Eficiența și simplitatea metodei de sinteză a acestuia (3 etape).

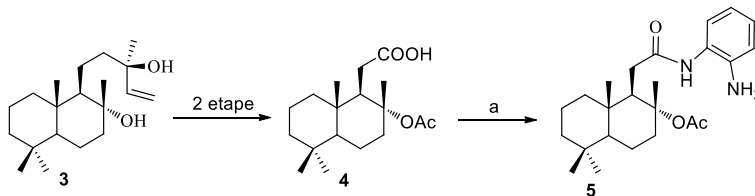
Compusul revendicat, *N*-(2-aminofenil)-8α-acetoxi-homodrimacetamida, ce posedă un schelet hibrid terpenic și aromatic, poate fi utilizat în calitate de compus cu proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate, fapt confirmat de testările biologice a acestuia *in vitro* pe speciile de fungi (*Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*) și tuplinile de bacterii Gram-pozitive (*Bacillus species*) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*).

De menționat, că obținerea *N*-(2-aminofenil)-8α-acetoxi-homodrimacetamidei, 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 utilizat (-)-sclareolul (**3**), care în două etape a fost transformat în acidul 8α-acetoxi-homodriman-12-oic **4**, cu un randament total de 75%, în conformitate cu metoda descrisă în literatură (Barrero A.F., Alvarez-Manzaneda E.J., Chahboun R., González Díaz C. New routes toward drimanes and nor-drimanes from (-)-sclareol. *Synlett*, 2000, vol. 11, p. 1561–1564).

În continuare interacțiunea acidului **4** cu *o*-fenilendiamina în prezență de trifenilfosfină (Ph₃P) și trietilamină (Et₃N) în tetraclorură de carbon, conform metodei descrise anterior de autorii - Charton J., Girault-Mizzi S., Sergheraert C. Conversion of sterically hindered diacylated 1,2-phenylenediamines into 2-substituted benzimidazoles. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*, 2005, vol. 53, nr. 5, p. 492-497), a condus la formarea *N*-(2-aminofenil)-8α-acetoxi-homodrimacetamidei **5** revendicate, cu un randament de 49% (schemă).

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



Schemă: Sinteza *N*-(2-aminofenil)-8α-acetoxi-homodrimacetamidei **5**

Reagenți și condiții pentru etapa **a**: *o*-fenilendiamina, Ph₃P, Et₃N, CCl₄, 80°C, 6 ore, 49%.

În rezultatul testărilor biologice s-a demonstrat că *N*-(2-aminofenil)-8α-acetoxi-homodrimacetamida manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene excelente la valori ale concentrației minime inhibitorii (CMI, μg/mL) de 0,05 și 0,032 μg/mL, respectiv, care sunt net superioare celor caracteristice compușilor de referință Caspofungina și Kanamicina (vezi tabelul).

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

Exemplu de realizare a invenției

5 Sinteza *N*-(2-aminofenil)-8 α -acetoxi-homodrimacetamidei **5**

La soluția formată din Ph₃P (3 mmol) și Et₃N (1,2 mmol) în CCl₄ (7 mL), răcită la baia de gheață, s-a adăugat acetoacidul **4** (1 mmol), amestecul format a fost agitat timp de 10 min, după care s-a adăugat *o*-fenilendiamina (1,2 mmol). Amestecul final de reacție a fost refluxat la agitare timp de 6 ore. După
10 finisarea reacției, solventul a fost distilat la presiune redusă, produsul brut obținut a fost purificat pe cromatografie pe coloană cu SiO₂, folosind în calitate de eluent un amestec format din MeOH/CH₂Cl₂, luați într-un raport de 0,1:9,9 (v/v). Ca rezultat s-a obținut *N*-(2-aminofenil)-8 α -acetoxi-homodrimacetamida **5** (randament 49%), compus cristalin p.t. = 188...189°C; $[\alpha]_D^{20} = 11,09^\circ$ ($c = 2,4$, CHCl₃). Structura compusului **5** a fost confirmată de datele analizelor spectrale:

15 Spectroscopie în IR (ν , cm⁻¹): 3310, 3261, 2942, 1720, 1654, 1526, 1459, 1366, 1248, 1127, 1025, 746.

Rezonanță magnetică ¹H RMN (CDCl₃, δ , ppm, *J*, Hz): 7,56 (1H, s, NH), 7,17 (1H, dd, *J* 8,2, 1,3 Hz, H-Ar), 7,03 (1H, td, *J* 7,6; 1,1 H-Ar), 6,77 (2H, t, *J* 7,8 Hz, H-Ar), 3,88 (2H, br.s., NH₂), 2,71 (1H, dt, *J* 12,4; 3,1 Hz, H-7), 2,53 (1H, dd, *J* 18,3, 6,8 Hz, H-11), 2,36 (1H, dd, *J* 18,3, 6,7 Hz, H-11), 2,34 (H, s, H-9), 1,92 (3H, s, 8-OCOCH₃), 1,55-1,76 (4H, m, 2CH₂), 1,51 (3H, s, 8-CH₃), 1,41-1,44 (1H, m, CH₂),
20 1,07-1,39 (5H, m, H-5, 2CH₂), 0,86 (6H, s, 4-CH₃ and 4-CH₃), 0,79 (3H, s, 10-CH₃).

Rezonanță magnetică ¹³C RMN (CDCl₃, δ , ppm): 172,5 (8-OCOCH₃), 170,3 (C-12), 140,5, 126,8, 124,8, 124,6, 119,4, 118,2 (Ar), 87,4 (C-8), 56,0 (C-9), 55,5 (C-5), 41,6 (C-3), 39,2 (C-1 și C-10), 38,7 (C-7), 33,6 (C-11), 33,2 (C-19), 33,1 (C-4), 23,0 (C-17), 21,4 (8-OCOCH₃), 19,9 (C-18 și C-6), 18,2 (C-2), 15,6 (C-20).

25 Rezonanță magnetică ¹⁵N RMN (CDCl₃, δ , ppm): 125, 53.

Testarea activității biologice a *N*-(2-aminofenil)-8 α -acetoxi-homodrimacetamidei **5**

Activitatea biologică a compusului revendicat a fost testată *in vitro* pe 5 specii de fungi (*Aspergillus niger* ATCC 53346, *Fusarium solani* ATCC 20327, *Penicillium chrysogenum* ATCC 20044,
30 *Penicillium frequentans* ATCC 10110 și *Alternaria alternata* ATCC 8741) provenite din culturi pure și 2 specii de bacterii: Gram-pozitive (*Bacillus sp.* ATCC 15970) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813). Rezultatele testării activității biologice exprimate în valori CMI (concentrația minimă inhibitoare) sunt raportate în tabel.

Tabel

35 Rezultatele testării *in vitro* a activității biologice a *N*-(2-aminofenil)-8 α -acetoxi-homodrimacetamidei **5**

Compusul	Concentrație minimă inhibitoare (CMI, μ g/mL)						
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Compusul revendicat 5	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,032	0,032
Caspofungina	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	-	-
Kanamicina	-	-	-	-	-	2,0	2,0
Analogul proxim 1	-	-	-	-	-	7	-

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

40 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).

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

microorganismele [Carrillo R., Martin V. S., López M., Martin T. Tetrahedron, 2005, vol. 61, nr. 34, p. 8177-8191].

Caspofungina (strip test) se utilizează în calitate de compus de referință pentru determinarea activității antifungice, iar Kanamicina (strip test) pentru determinarea activității antibacteriene. Compușii de referință menționați sunt furnizați de firma Liofilchem (Italia).

5

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 microorganism.

10

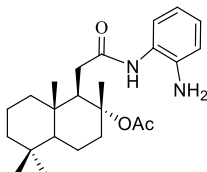
Rezultatul invenției este condiționat de utilizarea, pentru prima dată, a *N*-(2-aminofenil)-8 α -acetoxi-homodrimacetamidei **5** în calitate de compus ce posedă proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Desnos-Ollivier M. et al. Detection of Caspofungin resistance in *Candida* spp. by Etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, vol. 46 (7), p. 2389-2392.
2. Van den Broek P.J. et al. Influence of human monocytes on the antibacterial activity of Kanamycin and Gentamicin for *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1986, vol. 29 (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.I. Design, synthesis, and antimicrobial activity of some novel homodrimane sesquiterpenoids with diazine skeleton. *Medicinal Chemistry Research*, 2014, vol. 23 (3), p. 1559-1568.

(57) Revendicări:

1. Compusul *N*-(2-aminofenil)-8 α -acetoxi-homodrimacetamida cu formula:



2. Compus, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene.