



MD 4462 C1 2017.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4462** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07F 15/04* (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

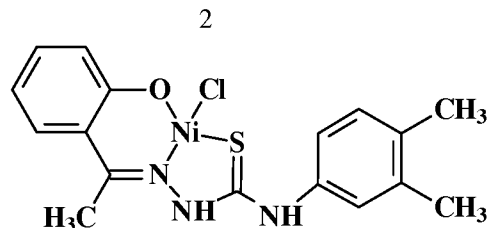
(21) Nr. depozit: a 2016 0021 (22) Data depozit: 2016.02.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.01.31, BOPI nr. 1/2017
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: ISTRATI Dorin, MD; GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; ZARICIUC Elena, MD; COTOVAIA Aliona, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotioamido(1-)}nichel, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ nou de nichel, biologic activ, din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție și poate găsi aplicare în medicină și medicina veterinară în calitate de preparat cu acțiune antimicrobiană sau în calitate de ingredient la crearea mediilor nutritive selective de cultivare a microorganismelor.

Esența invenției constă în obținerea unui compus coordinativ cu activitate antibacteriană înaltă cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotioamido(1-)}nichel cu formula:



Acest compus manifestă o activitate bacteriostatică și bactericidă față de bacteriile gram-negative din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* în limitele concentrațiilor de 0,7...3,0 μg/mL.

Revendicări: 2

MD 4462 C1 2017.08.31

(54) Chloro-{N-(3,4-dimethylphenyl)-2-[1-(2-hydroxyphenyl)ethylidene]-hydrazinecarbothioamido(1-)}nickel, exhibiting antimicrobial activity against *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial species

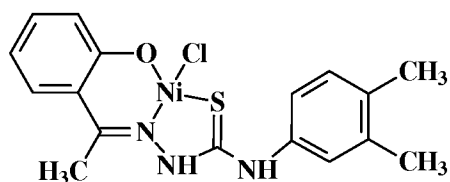
(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and medicine, namely to a new biologically active coordinative nickel compound from the class of thiosemicarbazones of transition metals and can find application in medicine and veterinary medicine as antimicrobial preparations or ingredient in the creation of selective microbiological nutrient media.

Summary of the invention consists in obtaining a coordinative compound with high antibacterial activity chloro-{N-(3,4-dimethylphenyl)-2-[1-(2-hydroxyphenyl)ethylidene]-hydrazinecarbothioamido(1-)}nickel of Formula:

2



This compound exhibits bacteriostatic and bactericidal activity against gram-negative *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* bacterial species in the concentration range of 0.7...3.0 µg/mL.

Claims: 2

(54) Хлоро-{N-(3,4-диметилфенил)-2-[1-(2-гидроксифенил)этилиден]-гидразинкарботиоамидо(1-)}никель, проявляющий противомикробную активность в отношении бактерий вида *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*

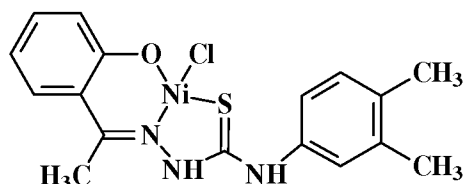
(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к новому биологически активному координационному соединению никеля из класса тиосемикарбазонатов переходных металлов и может найти применение в медицине и ветеринарии в качестве противомикробных препаратов или ингредиента при создании селективных микробиологических питательных сред.

Сущность изобретения заключается в получении координационного соединения с высокой антибактериальной активностью хлоро-{N-(3,4-диметилфенил)-2-[1-(2-гидроксифенил)-этилиден]-гидразинкарботиоамидо(1-)}никеля формулы:

2



Данное соединение проявляет бактериостатическую и бактерицидную активность по отношению к грамотрицательным бактериям вида *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* в пределах концентраций 0,7...3,0 µг/мл.

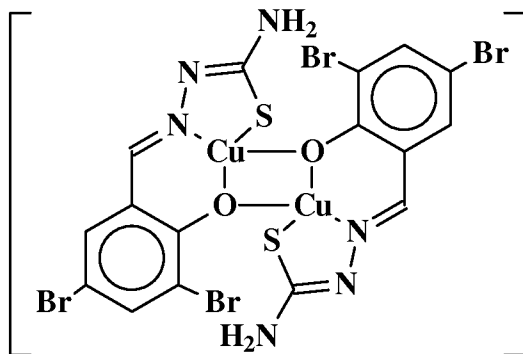
П. формулы: 2

Descriere:

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un compus coordinativ de nichel, biologic activ, din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție. Acest complex manifestă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de bacteriile din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*. Datorită acestor proprietăți el poate găsi aplicare în medicină și veterinarie în calitate de preparat cu acțiune antimicrobiană sau în calitate de ingredient în crearea mediilor nutritive selective de cultivare a microorganismelor.

10 *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* sunt bacterii gram-negative care trăiesc în apă și sol. Aceste bacterii cauzează pneumonie, infecții urogenitale, abcese purulente ale ficatului și splinei la om și la unele animale. Tratamentul infecțiilor provocate de aceste bacterii este foarte dificil din cauza polirezistenței lor ridicate față de antibiotice.

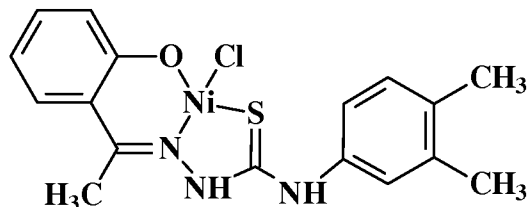
15 Dintre compușii coordinativi biologic activi din clasa tiosemicarbazonaților metalelor de tranziție, care inhibă creșterea și multiplicarea bacteriilor din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*, cel mai înalt efect bacteriostatic a fost obținut în cazul di(μ -O)-bis(3,5-dibromosaliciliden-tiosemicarbazidocupru) (analogul proxim) [1] cu formula:



20 Dezavantajele complexului dat constau în faptul că el inhibă creșterea și multiplicarea bacteriilor din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* în diapazonul concentrațiilor 18,7...600 $\mu\text{g/mL}$ și a microorganismelor gram-pozitive în limitele concentrațiilor 0,072...600 $\mu\text{g/mL}$, însă posedă activitate scăzută față de microorganismele gram-negative și din acest motiv nu găsește aplicare în practica medicală.

25 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui compus coordinativ nou, care posedă activitate bacteriostatică și bactericidă înaltă față de bacteriile din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*.

30 Esența invenției constă în obținerea inhibitorului de proliferare a bacteriilor din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* în baza cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotioamido(1-)}nichel cu formula:



35

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul revendicat a activității antimicrobiene, care depășește de 12,5...1200 ori activitatea bacteriostatică și bactericidă a di(μ -O)-bis(3,5-dibromosalicilidentiosemicarbazido-cupru) [1] (analogul proxim) față de microorganismele din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* și de 12,5...100 ori față de *Escherichia coli* și *Candida albicans*.

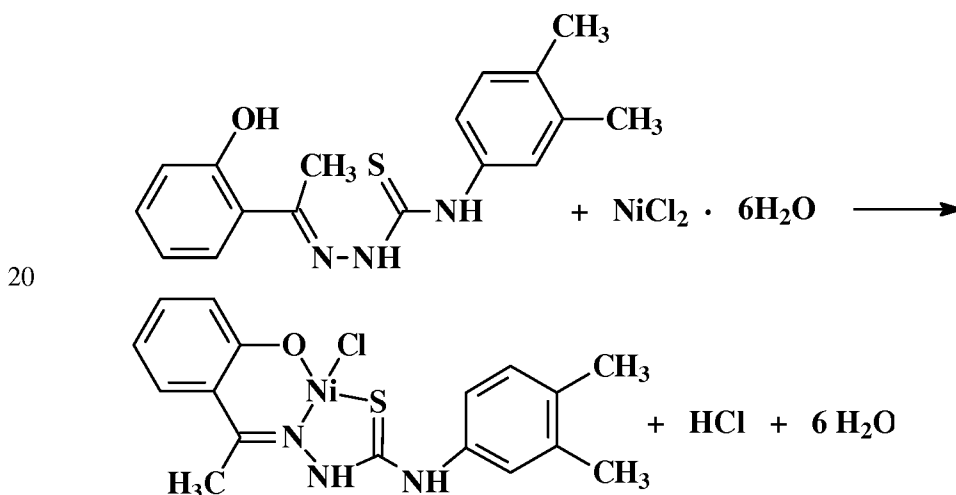
40

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitori de creștere și multiplicare a microorganismelor gram-negative se propune un compus coordinativ nou al nichelului cu N-(3,4-dimetilfenil)-tiosemicarbazona 2-hidroxiacetofenonei.

5 Complexul dat, proprietățile lui și metoda de sinteză nu sunt descrise în literatură.

Analiza comparativă a compusului revendicat cu analogul proxim demonstrează că ei se deosebesc prin aceea, că în analogul structural atomul central de cupru(II) este înlocuit cu nichel(II), păstrând numărul de coordinare al atomului central egal cu 4 prin introducerea în sfera internă a complexului a ionului de clor. În afară de aceasta, fragmentul 3,5-dibromosalicilidenazometinic este înlocuit cu 2-hidroxiacetofenonic și atomul de hidrogen al grupei NH₂- marginale a fragmentului tiosemicarbazidic este înlocuit cu grupa 3,4-dimetilfenilică. Datorită acestor particularități în structura complexului declarat se realizează o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

15 Cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]hidrazincarboto-amido (1-)}nichel se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50...55° C) ale hexahidratului clorurii de nichel(II) cu N-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-hidroxiacetofenonei, luate în raport molar de 1:1. Reacția decurge în 50...60 min conform următoarei scheme:



Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul că în timpul sintezei în amestecul reactant are loc adăptia la ionul de nichel(2+) a unei molecule de N-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-hidroxiacetofenonei, care joacă rolul de ligand-O,N,S tridentat. În rezultatul acestor procese are loc formarea complexului revendicat cu structură plan-pătratică.

30 **Exemplu de obținere a cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]hidrazincarbotoamido(1-)}nichel.** Se amestecă 20 ml de soluție etanolică, care conține 10 mmol de N-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-hidroxiacetofenonei cu 10 mmol de NiCl₂·6H₂O, dizolvat în 20 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 se depun cristale mărunte de culoare brună roșiatică, care sunt filtrate prin filtru de sticlă, spălate cu etanol, eter și uscate la aer.

S-a determinat, % : C –50,05; H –4,22; Cl – 8,87; N- 10,11; Ni –14,21; S – 7,59. Pentru C₁₇H₁₈ClN₃NiOS s-a calculat, % : C –50,22; H –4,46; Cl – 8,72; N- 10,34; Ni –14,44; S – 7,89.

40 Procedeul de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile: N-(3,4-dimetilfenil)tiosemicarbazona 2-hidroxiacetofenonei (p.t.= 187...189°C) a fost sintetizată după metodica descrisă în [Gulea A. et al. Synthesis and antileukaemia activity of N-(2,4-dimethylphenyl)hydrazine carbothioamide and its azomethine derivatives//Buletinul AȘM. Științele vieții. 2012, nr. 3(318), pag. 59-66].

Randamentul constituie 70% față de cel teoretic calculat. Complexul este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în apă și alcoolii, bine solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxid, practic insolubil în eter.

5 Cercetarea vizuală sub microscop a compusului coordinativ sintetizat a demonstrat că el posedă o omogenitate de fază. Din cauza dimensiunilor mici și în absența monocristalelor acestui complex, pentru determinarea individualității compoziției și a structurii lui au fost utilizate: analiza elementară, magnetochimia și spectroscopia IR.

10 În baza determinării conductibilității electrice molare (?) a soluției de cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]hidrazincarboto-amido(1-)}-nichel în dimetilformamidă, a fost stabilit că compusul este un neelectrolit [$\kappa = 2 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 20° C, $C_M = 0,001 \text{ mol/L}$].

Cercetarea magnetochimică la temperatura camerei a compusului revendicat a demonstrat că el este diamagnetic. Aceste date experimentale indică la o structură plan-pătratică.

15 Pentru determinarea modului de coordonare a N-(3,4-dimetilfenil)-tiosemicarbazonei 2-hidroxiacetofenonei la ionul de nichel(2+) a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale compusului revendicat cu cele ale analogului lui structural [1] și ale azometinei inițiale. S-a stabilit că tiosemicarbazona studiată se comportă în complexul revendicat ca un ligand tridentat monodeprotonizat, făcând legătură cu ionul central prin intermediul atomilor de oxigen fenolic, azot azometinic și de sulf, rezultând două metalocicluri din șase și cinci atomi. În favoarea acestui fapt vorbește dispariția în spectrele IR ale substanței revendicate și ale analogului structural a benzii de absorbție $\delta(\text{OH})$, care în tiosemicarbazona liberă se observă în domeniul 1245...1240 cm^{-1} . În ambele tipuri de complecși banda $\nu(\text{C}=\text{N})$ se deplasează cu 25...30 cm^{-1} spre frecvențe mai mici (în tiosemicarbazona inițială $\nu(\text{C}=\text{N})$ se observă în domeniul 1625...1620 cm^{-1}). În afară de aceasta, în domeniul 550...405 cm^{-1} în spectrul complexului revendicat se observă o serie de benzi de absorbție noi, care conform datelor luate din literatură se identifică ca $\nu(\text{Ni}-\text{N})$, $\nu(\text{Ni}-\text{O})$ și $\nu(\text{Ni}-\text{S})$.

30 Astfel, în baza rezultatelor analizei elementare și cercetărilor fizico-chimice a fost stabilită compoziția și structura probabilă a complexului revendicat.

35 Determinarea activității antimicrobiene a cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]hidrazincarbotoamido(1-)}nichel a fost efectuată într-un 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 *Escherichia coli*, ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Candida albicans*. Dizolvarea substanței studiate în dimetilformamidă, cultivarea microorganismelor, obținerea suspensiei, determinarea concentrației minime de inhibare (CMI) și concentrației minime bactericide (CMB) au fost efectuate după metoda standard, descrisă în literatură.

40 Rezultatele studiului activității antimicrobiene pentru cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]hidrazincarbotoamido(1-)}nichel sunt prezentate în tabel, din care se vede că compusul revendicat posedă o activitate bacteriostatică și bactericidă față de microorganismele gram-negative în limitele concentrațiilor 0,7...3,0 $\mu\text{g/mL}$. Pentru comparație, în aceleași tabel sunt prezentate rezultatele cercetării activității antimicrobiene caracteristice di(μ -O)-bis(3,5-dibromosaliciliden-tiosemicarbazidocupru) – analogul structural al compusului revendicat [1], care manifestă cea mai înaltă activitate bacteriostatică și bactericidă față de bacteriile din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* dintre substanțele din șirul tiosemicarbazonic, cunoscute în literatură. Datele experimentale obținute demonstrează că compusul coordinativ revendicat manifestă activitate antimicrobiană, care depășește de 12,5...1200 ori activitatea bacteriostatică și bactericidă a analogului proxim [1] față de microorganismele din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa* și de 12,5...100 ori este mai activ față de *Escherichia coli* și *Candida albicans*.

55 Proprietățile depistate ale compușilor nominalizați prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de remedii antimicrobiene și pot fi utilizate în cazul rezistenței microorganismelor față de medicamentele tradiționale.

Tabel

Concentrația minimă de inhibare (CMI) și concentrația bactericidă minimă (CBM) a compusului revendicat față de microorganismele gram-negative și *Candida albicans*, μg/mL

5

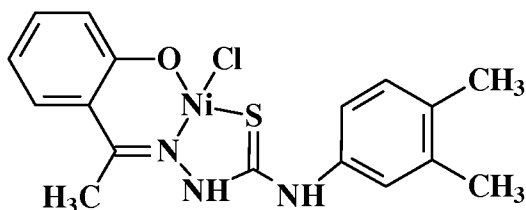
Tulpina microorganismului	Compusul revendicat		Analogul proxim [1]	
	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922	1,5	1,5	18,7	37,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,7	1,5	18,7	18,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,7	1,5	600	600
<i>Candida albicans</i>	3,0	3,0	300	300

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. MD 2942 B2 2005.12.30

(57) Revendicări:

1. Cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotioamido(1-)}nichel cu formula:



2. Compus conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că manifestă o activitate antimicrobiană față de bacteriile din speciile *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*.

Șef Direcție Brevete:

IUSTIN Viorel

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

JOVMIR Tudor

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2016 0021 (32) Data de prioritate recunoscută: n/a
 (22) Data depozit: 2016.02.29 Raport de documentare internațională: nu
 (71) Solicitant: **UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD**
 (54) **Titlul: Cloro-{N-(3,4-dimetilfenil)-2-[1-(2-hidroxifenil)etiliden]-hidrazincarbotoamido(1-)}nichel, care manifestă activitate antimicrobiană față de bacteriile din genul *Klebsiella pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa***

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** **C07F 15/04** (2006.01)
C07C 337/08 (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative) Dacă nu este specificat – cuvinte-cheie din Titlu/rezumat, iar indicii de Clasificare IPC.

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

titlu sau rezumat = klebsiella ; pseudomonas ;
 descriere = dimetilphenil ;

"Worldwide" (Espacenet):

(nichel OR Ni) AND (antimicrobi* OR antibacteria*) AND (A61K31/175 OR C07C337) ;
 (copper OR Cu) AND (antimicrobi* OR antibacteria*) AND (A61K31/175 OR C07C337) ;
 (klebsiella OR pseudomonas) AND (A61K31/175 OR C07C337) ;
 (A61K31/175 OR C07F15/04) ; (A61K31/175 OR CPC=C07F15/045) ;
 (klebsiella OR pseudomonas) AND CPC=C07F15/045 ;
 (klebsiella OR pseudomonas) AND thiosemicarbaz* ;
 (klebsiella OR pseudomonas) AND hydrazinecarbothio* ;
 (thiosemicarbaz* OR hydrazinecarbothio*) AND (antimicrobi* OR antibacteria*) ;
 ('phenyl thiosemicarbazone') AND (antimicrobi* OR antibacteria*) ;
 ('phenylthiosemicarbazone') AND (antimicrobi* OR antibacteria*) ;
 hydrazinecarbothioamide* ;

fulltext(EN):

hydrazinecarbothioamide* AND nichel AND (krebsiella OR pseudomonas) ;
 thiosemicarbazone* AND nichel AND (krebsiella OR pseudomonas) ;
 phenylthiosemicarbazone* AND nichel AND (krebsiella OR pseudomonas) ;
 ("phenyl thiosemicarbazone") AND nichel AND (krebsiella OR pseudomonas) ;

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

Google; Google Scholar: Gulea AND (krebsiella OR pseudomonas) ;
 dimethylphenyl hydrazinecarbothioamide nichel ;
 antibacterial thiosemicarbazone* nickel krebsiella ;
 antibacterial thiosemicarbazone* nickel pseudomonas ;

--

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D, C	MD 2942 B2 2005.12.30	1, 2
A	MD 2939 F1 2005.12.31 pag. 5, Tabel, randul 2 de jos	1, 2
A	MD 4112 B1 2011.05.31 Tabelul3, compus V	1, 2
A	Gulea A. et al. In vitro antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: Chemical synthesis and structure - activity relationships. J. of Enzyme Inhibition and Medicinal chemistry, December 2008; 23(6): 806-818. DOI: 10.1080/14756360701743002 Regăsit în Internet la 2016.11.21, url: https://www.academia.edu/6324552/In_vitro_antileukemia_antibacterial_and_antifungal_activities_of_some_3d_metal_complexes_Chemical_synthesis_and_structure_activity_relationships Tables I and III	1, 2
A	Devesh Kumar, Vipin Kumar Singh. Application of metal complexes of schiff base with special reference to thiosemicarbazone: a review. Journal of Drug Discovery and Therapeutics 2 (13 2014, 24-32) Available online at www.jddt.in , regăsit în Internet la 2016.11.22, url: http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=32&ved=0ahUKEwj6wPaQi7zQAhUGVxOKHYulD2Y4HhAWCCAwAQ&url=http%3A%2F%2Fisjournals.net%2Findex.php%2FJDDT%2Farticle%2Fdownload%2F1104%2F1060&usq=AFQjCNFenk5b_bPFXIOAISAHBrDAitW_EQ&sig2=pKK-bSuabIt-imBDOV6BGQ&bvm=by.139250283,d.d24&cad=rja pag. 28-29, chapter "As antibacterial agent:"	1, 2
A	Lakshmi Narayana Suvaru et al. A Critical Review on Analytical and Biological Applications of Thio- and Phenylthiosemicarbazones. Asian Journal of Chemistry, vol. 24, No. 5 (2012), 1889-1898 Regăsit in Internet la 2016.11.23, url: http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=24_5_1 pag. 1891 and 1896	1, 2

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată

implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2016.11.24	
Examinator JOVMIR Tudor	