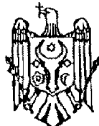




MD 3942 C2 2009.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3942** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.: *C07F 15/02* (2006.01)
C07F 15/06 (2006.01)
C07C 61/20 (2006.01)
C07D 307/46 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2009 0003 (22) Data depozit: 2009.01.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2009.07.31, BOPI nr. 7/2009
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: MELNIC Silvia, MD; PRODIUS Denis, MD; ȘOVA Sergiu, MD; TURTA Constantin, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) **Complecși ai fierului și cobaltului cu acidul furan-2-carboxilic cu proprietăți antituberculoase**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la complecșii fierului și cobaltului cu acidul furan-2-carboxilic, cu activitate antituberculoasă.

Esența invenției constă în sinteza compușilor complecși heteronucleari (I-III), cu formula:

$[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{L}_1)(\text{L}_2)_2]$, unde
 $\text{L}_1 = \text{THF}$ $\text{L}_2 = \text{H}_2\text{O}$ (I)

5 $\text{L}_1 = \text{DMFA}$ $\text{L}_2 = \text{H}_2\text{O}$ (II)
 $\text{L}_1 = \text{L}_2 = 3\text{Cl-Py}$ (III),
care manifestă proprietăți de inhibare a creșterii
tulpinilor *Mycobacterium tuberculosis*.
Revendicări: 1
Figuri: 1

10

MD 3942 C2 2009.07.31

Descriere:

Invenția se referă la complexii fierului și cobaltului cu acidul furan-2-carboxilic (I-III), cu activitate antituberculoasă.

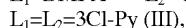
Mycobacterium tuberculosis, agentul cauzal al tuberculozei (TBC) continuă și în prezent să provoace această boală infecțioasă, deoarece medicamentele care se utilizează pentru tratarea TBC au o vechime de peste 40 ani și sunt cu eficacitate redusă [1].

Dezavantajul acestor medicamente constă în faptul că au apărut tulpini noi de *M. tuberculosis*, rezistente la multe preparate antituberculoase cunoscute. Problemele apărute au accelerat cercetările în domeniul obținerii medicamentelor noi anti-TBC. Este bine cunoscută importanța ionilor de metal în procesele biologice. În baza acestor cunoștințe a fost sintetizat și un mare număr de compuși complecși, care posedă activitate antituberculoasă, inclusiv izonicotinoil-hidrazonile de cobalt (II), care sunt agenți promițători împotriva tuberculozei H37Rv în comparație cu cei de cupru (II) și nichel (II) [2].

Dezavantajul acestor preparate constă în faptul că ele manifestă activitate anti-TBC la concentrații destul de înalte.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în extinderea gamei de substanțe ce manifestă activitate antituberculoasă la concentrații mici, în special a compușilor coordinativi heteronucleari ai fierului (III) și cobaltului (II) cu acidul furan-2-carboxilic.

Esența invenției constă în sinteza compușilor complecși heteronucleari (I-III), cu formula:



care manifestă proprietăți de inhibare a creșterii tulpinilor *Mycobacterium tuberculosis*.

Rezultatul invenției constă în aceea că la prima testare (nivelul 1) s-au evidențiat trei compuși activi (mai mult de 90% inhibare), care ulterior au fost testați la concentrația de inhibiție minimă (CIM) și la citotoxicitate (IC50) (nivelul 2). Au fost determinate valorile IC50 și CIM pentru trei $[\text{Fe}_2\text{CoO}]$ -furoați pe seria de celule VERO în cultură, au fost calculați indicii de selectivitate ($\text{IS} = \text{CIM}/\text{IC50}$).

Acidul furan-2-carboxilic face parte din clasa compușilor heterociclici pentaatomici nesaturați. Compușii din această serie sunt bine cunoscuți în practica medicală, datorită activității bacteriostatice pe care o posedă, exemplu pot servi produsele medicinale *Furacilina* sau *Furazolidon*.

Acidul furan-2-carboxilic s-a dovedit a fi un agent de complexare foarte bun. O caracteristică interesantă a acidului furan-2-carboxilic și a derivaților săi este prezența a trei atomi care pot forma legături coordinative (doi atomi de oxigen din grupa carboxil și oxigenul din heterociclu) datorită potențialului lor înalt de coordinare. Grupele carboxile pot coordina cu ionul de metal în trei moduri: prin legătură de punte, prin legătură chelată și prin legătură punte-chelat. În consecință, compusul care se obține poate fi: dimer binuclear, lanț polimeric sau poate avea o structură de rețea. De exemplu, acidul furan-2-carboxilic și derivații săi au fost intens studiați în multe sisteme bacteriologice, manifestând activitate împotriva unui șir de fungi și bacterii gram pozitive și gram negative, cât și activitate antitumorală. Până în prezent însă nu au fost depistate proprietăți antituberculoase ale acestui grup de compuși.

Compușii complecși revendicați fac parte din seria de compuși heteronucleari ai fierului(III), conținând în calitate de heteroatom ionul de cobalt Co^{2+} și au fost caracterizați prin analiză elementală (Me, C, N și H), spectroscopie în IR, Mössbauer și prin metoda difracției cu raze X.

Spectrul în IR confirmă structura complecșilor revendicați prin benzile de absorbție de la 1009...1017 cm^{-1} , caracteristică pentru oscilația grupei necoordinate C-O-C a inelului furanic, cele de la 1608...1594 cm^{-1} caracteristice grupei carboxile coordonate ($\nu_{\text{as}}(\text{COO})$) și 1403...1418 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{COO})$).

Spectrele Mössbauer pentru compușii dați prezintă un dublet atât la temperatura camerei, cât și la 80 K. Valorile deplasării de izomer δ_{Na^+} (mm/s) = 0,78 – 0,79 (80 K), 0,68 – 0,71 (300 K) și despicării de cuadripol ΔE_Q = 0,85 – 1,02 (80 K), 0,86 – 1,03 (300 K) calculate din spectrele Mössbauer, indică prezența fierului în stare de oxidare (+3), spin înalt (5/2) cu o structură destul de simetrică a moleculei.

Toți compușii au o structură tipică μ_3 -oxotrinucleară în care doi atomi de Fe(III) și unul de Co(II) sunt situați în vârfurile unui triunghi cu un atom de oxigen trident în centru. Fiecare din atomii metalelor coordonează cu câte patru atomi de oxigen ai grupelor carboxile, oxigenul din centru și moleculele liganzilor axiali.

Exemplu de realizare a invenției.

Exemplul 1. Complexul $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{THF})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (cod TAACF 1/412305) a fost obținut din tetrahidrofuran. Amestecul format din acid furan-2-carboxilic (0,56 g, 5 mmol) și triaqua-hexakis- μ -acetato(O,O')- μ_3 -oxo-difier(III) cobalt(II) (1,18 g, 2 mmol) în tetrahidrofuran (20 mL) a fost refluxat timp de o oră, până la formarea unui sediment cristalin de culoare brună. Substanța formată a fost filtrată, apoi spălată consecutiv cu etanol, eter și uscată la aer. Randamentul de obținere este de ~80%. Produsul este solubil în DMFA. Analiza elementală pentru $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{THF})(\text{H}_2\text{O})_2]$: *Calculat*, %: C, 42,48; H, 3,14; Fe, 11,61. *Găsit*, %: C, 41,72; H, 2,93; Fe, 11,62.

Exemplul 2. Complexul menționat $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{THF})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (cod TAACF 2/412313) a fost dizolvat în dimetilformamidă. Peste o lună, după evaporarea lentă a solventului, au fost obținute cristale de

culoare brună. Analiza elementală pentru $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{DMFA})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{DMFA}$: *Calculat*, %: C, 42,26; H, 3,91; N, 3,79; Fe, 10,07. *Găsit*, %: C, 42,10; H, 3,76; N, 3,44; Fe, 9,97.

Exemplul 3. Sinteza complexului $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(3\text{Cl-Py})_3]$ (cod TAACF 3/412327), care formează cristale calitative pentru analiza cu raze X, a fost efectuată, folosind suspensia ce conține $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{THF})(\text{H}_2\text{O})_2]$ în acetona (10 mL), prin adăugarea cu picătura la ea a 3-clorpiridinei. Amestecul obținut a fost refluxat timp de 30 min, răcit și lăsat la temperatura camerei. Peste o lună, după evaporarea lentă a solventului, au fost obținute monocristale de culoare brună. Analiza elementală pentru $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(3\text{Cl-Py})_3]$: *Calculat*, %: C, 45,27; H, 2,53; N, 3,52; Fe, 9,50. *Găsit*, %: C, 43,98; H, 2,47; N, 3,15; Fe, 9,15.

Studiul structurii complexului $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(3\text{Cl-Py})_3]$ prin metoda difracției cu raze X.

Rezultatele experimentale au fost obținute la temperatura 173 K, utilizând difractometrul Stoe Mark-II Image Plate, inzestrat cu monocromatorul de grafit. Sursa de iradiere a fost Mo- K_α ($\lambda=0,71073$ Å). Setul de date experimentale s-a obținut utilizând un monocristal cu dimensiunile 0,2x0,15x0,1 mm. Ca rezultat s-au stabilit datele cristalografice respective: singonia monoclinică, grupul spațial de simetrie este $P2_1/n$, volumul celei elementare 4979,1(7) Å³, numărul de unități structurale independente $Z = 4$, $\rho(\text{calc.}) = 1,592$ g·cm⁻³ pentru compoziția $\text{C}_{45}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{19}\text{Cl}_3\text{Fe}_2\text{Co}$. Structura a fost determinată prin metode directe și precizată prin tehnica matricei pătratelor minime, coordonatele atomilor de bază fără hidrogen au fost precizate în varianta anizotropică în cadrul complexelor de programe SHELX-97. Factorul de divergență R rezultat, obținut în baza a 2335 reflexe independente este 0,0602.

Activitatea biologică:

Prima testare: Stabilirea concentrației inhibitoare de 90% (IC90) a complexelor revendicate.

Prima testare a fost efectuată împotriva *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) în mediu BACTEC 12B, utilizând *Microplate Alamar Blue Test* (MABA). Compușii au fost testați în zece probe cu concentrațiile de la 100 mg/mL până la 0,19 mg/mL. Pentru IC90 este definită concentrația efectivă în fluorescență pentru o reducere de 90% față de control. Această valoare este determinată de pe curba doză-răspuns, utilizând un program pentru fitarea curbilor. Orice valoare a IC90 ≤ 10 g/mL este considerată "activă" pentru activitatea antituberculoasă.

Testare secundară: Determinarea citotoxicității pe celule de mamifere (CC50)

Testarea citotoxicității pe celulele VERO, a fost făcută în paralel cu testul TBC. După 72 ore de expunere, viabilitatea a fost evaluată utilizând testarea Promega's Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay, o metodă omogenă de determinare a numărului de celule viabile în cultură, bazată pe prezența cantității de acid adenozintrifosforic (ATP). Citotoxicitatea a fost determinată folosind curba doză-răspuns ca CC50, folosind un program de fitare a curbilor. Au fost determinate rapoartele dintre CC50 și IC90 pentru a calcula valorile indicilor de selectivitate (IS).

Activitatea de inhibare antituberculoasă și citotoxicitatea compușilor revendicați este prezentată în tabel:

Compusul/ codul TAACF*	Testările pentru CIM (nivelul 2) și citotoxicitate			
	Inhib. (%)	CIM (?g/mL)	IC ₅₀ (?g/mL)	IS
1/412305	Activ	0,827	>30,0	>36,2
2/412313	Activ	3,999	>30,0	>7,5
3/412327	Activ	3,344	>30,0	>8,9
INH	Activ	<0,05	>1000,0	>4000 0
RMP	Activ	<0,125	>100,0	>800

* TAACF – The Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility

Unde, Inhib. - inhibare; CIM – concentrația minimă de inhibiție (valoarea CIM mai mică de 1 g/mL este un rezultat excelent); IC₅₀ – toxicitatea pe seria de celule VERO; IS - indicii de selectivitate definiți ca raport dintre IC₅₀ și CIM (trebuie să fie mai mari de 10, pentru testările următoare); isoniazid (INH) și rifampicin (RMP) – medicamentele de control.

După cum reiese din datele obținute, complexii revendicați $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{THF})(\text{H}_2\text{O})_2]$, $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{DMFA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ și $[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(3\text{Cl-Py})_2]$ posedă o activitate anti-tuberculoasă pronunțată.

(57) Revendicări:

Complecși ai fierului și cobaltului cu acidul furan-2-carboxilic cu formula:

$[\text{Fe}_2\text{CoO}(\text{C}_4\text{H}_3\text{OCOO})_6(\text{L}_1)(\text{L}_2)_2]$, unde

$\text{L}_1 = \text{THF}$ $\text{L}_2 = \text{H}_2\text{O}$ (I)

$\text{L}_1 = \text{DMFA}$ $\text{L}_2 = \text{H}_2\text{O}$ (II)

$\text{L}_1 = \text{L}_2 = 3\text{Cl-Py}$ (III),

care manifestă proprietăți de inhibare a creșterii tulpinilor *Mycobacterium tuberculosis*.

(56) Referințe bibliografice:

1. Khasnobis S., Escuyer V. E., Chatterjee D. *Expert Opin. Ther. Targets* 6, (2002), pp. 21
2. Bottari B., Maccari R., Monforte F., Ottana R., Rotondo E., Vigorita M. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, V. 10, (2000), p. 657

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

CIOCARLAN Alexandru

Redactor:

UNGUREANU Mihail

MD 3942 C2 2009.07.31

6

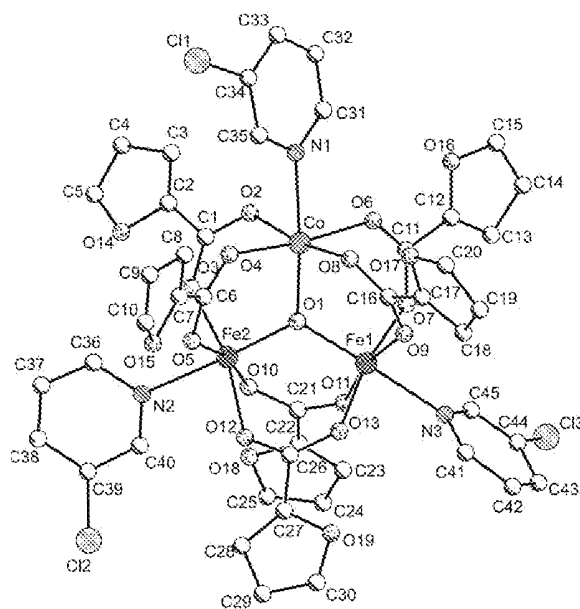


Fig. Structura complexului [Fe₂CoO(C₄H₃OCOO)₆(3Cl-Py)₃]

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2009 0003		
(22) Data depozit: 2009.01.22		
(51): Int. Cl.⁸: C07F 15/02 (2006.01) C07F 15/06 (2006.01) A61P 31/06 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul: Complecși ai fierului și cobaltului cu acidul furan-2-carboxilic (I-III) cu proprietăți antituberculoase (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : a) limba română: fier, cobalt, complecși, „proprietăți antituberculoase” b) limba engleză: iron, cobalt, complexes, „anti-tuberculosis properties”.		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
MD 1994-2008		
EA 1995-2008		
SU 1970-1991, inclusiv și colecția „nepublică”)		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 346 G2 1995.12.31	1
A	MD 675 C2 1997.11.30	1
A	MD 2146 C2 2003.04.30	1
A	MD 2786 G2 2005.06.30	1
A	ZA 200600783 A 2007.02.28	1
A	CA 2652454 A1 2007.12.06	1
A	CA 2647096 A1 2007.09.27	1
A	WO 03053347 A2 2003.07.03	1
A	US 2002068761 A1 2002.06.06	1
A	CA 1128860 A1 1982.08.03	1
A	Khasnobis, S., Escuyer, V. E., Chatterjee, D. <i>Expert Opin. Ther. Targets</i> 6, 2002, pp. 21.	1
A	Bottari, B., Maccari, R., Monforte, F., Ottana, R., Rotondo, E., Vigorita, M. G. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , V. 10, 2000, pp. 657.	1
☐ Documentele următoare sunt indicate in continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură,

motivul)	aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă	& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării	14.05.2009
Examinatorul	Alexandru CIOCARLAN