



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00426**

(22) Data de depozit: **11.06.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.03.2012** BOPI nr. **3/2012**

(41) Data publicării cererii:
30.10.2009 BOPI nr. **10/2009**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN
BUCUREȘTI, STR.DIONISIE LUPU NR.37,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **NIȚULESCU GEORGE MIHAI, NR.82,
SĂRATA MONTEORU, BZ, RO;**
• **MISSIR ALEXANDRU VASILE,
STR.TURDA NR.106, BL.32, SC.2, ET.6,
AP.78, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **DRĂGHICI CONSTANTIN, BD.TIMIȘOARA
NR.49, BL.CC6, SC.A, ET.2, AP.7,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

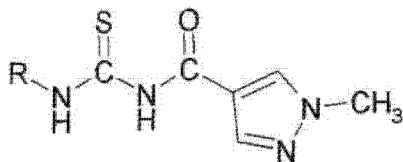
• **CHIFIRIUC MARIANA-CARMEN,
STR.TUZLA NR.1, BL.11, SC.B, ET.4,
AP.56, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DIȚU LIA-MARA, BD.REPUBLICII NR.183,
BL.8C1, AP.31, PLOIEȘTI, PH, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**CARMEN LIMBAN, AL. MISSIR,
ILEANA CHIRIȚĂ, "NOI TIUREIDE ALE
ACIDULUI 2-(FENOXIMETIL)- BENZOIC",
FARMACIA, VOL. XLVIII, NR. 6, 2000**

(54) **TIOUREIDE ALE ACIDULUI 1-METIL-1H-4-PIRAZOL-CARBOXILIC ȘI PROCEDEU DE PREPARARE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la tioureide ale acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic și la un procedeu de preparare a acestora, tioureide utilizate ca agenți cu activitate antibacteriană. Tioureidele acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic, conform invenției, sunt derivați N-acilați ai tioureei cu formula generală:



în care R reprezintă un radical alchil liniar sau ramificat, cicloalchil, alchenil, alchinil, aralchil, aril nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil, aralchil, acil, halogen, -NO₂, -NH₂, heterociclu cu N, S, O. Procedeu de obținere, conform invenției, constă din prepararea, într-o primă etapă, a clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic, care, în etapa a doua, este încălzită la reflux în prezență de tiocianat de amoniu, în mediu de acetonă anhidră, rezultând 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil izocianat care, prin reacția cu amine, conduce la obținerea unor derivați N-acilați ai tioureei.

Revendicări: 6

Examinator: dr. ing. BĂLBĂIE ELISABETA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123418 B1

1 Inventția se referă la tioureide ale acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic și la un
2 procedeu de preparare a acestora, compuși cu activitate antimicrobiană și toxicitate scăzută.
3 Inventția de față se înscrie în cadrul preocupărilor pe plan mondial pentru obținerea unor noi
4 agenți antimicrobieni cu eficacitate maximă și toxicitate scăzută, în special asupra tulpinilor
5 bacteriene rezistente la antibioticele actuale.

6 Cercetările în clasa derivații de pirazol au evidențiat numeroși compuși cu acțiune
7 antibacteriană. Dintre aceștia menționăm derivații 3-nitropirazolului [Herbert B. și col., brevet
8 **US 4172136**, 1979], derivați ai 4,5-diaril-pirazolului acționând ca inhibitori ai ARN polimerazei
9 [Leping Li și col., brevet **US 6673923**, 2004], derivații de 5-aminopirazol [Heil și col., brevet
10 **US 6444612 B1**, 2002], compuși cu structură 1-heteroaril-4-aril-pirazolică [Sasse și col.,
11 brevet **US 4806540**, 1989], derivați ai pirazolului activi pe specii microbiene multiplu
12 rezistente [Lee C.S. și col., *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2001, 9 (12), 3243-53]

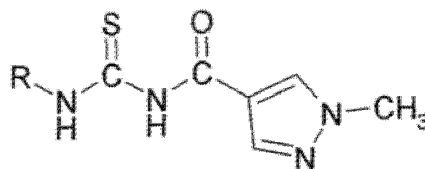
13 De asemenea, literatura de specialitate menționează o serie de tioureide testate
14 pentru activitatea lor antibacteriană, cum ar fi derivați ai 5-aril-2-(benzoil-tioureido)-1,3,4-
15 oxadiazolului [Kapoor K.K. și col., *J. Indian Chem. Soc.*, 1991, 68 (2), 104-6], tioureide ale
16 acidului 2-(fenoximetil)benzoic [Limban C. și col., *Farmacia* 2000, 6, 73-8] și ale acidului 2-(4-
17 cloro-fenoximetil)benzoic [Limban C. și col., *Molecules*, 2008, 13, 567-80], Derivații ai 2,4-
18 bis(metoxianilino)-6-(N-aril-tioureido-N'-aminoacil)-s-triazinei [Desai P.H. și col., *J. Inst.*
19 *Chem.*, 1989, 61(1), 19-20], derivați ai 1-aril-3-(4-benzosulfonamidopirimidin)-tioureei
20 [Xueshun J. și col., *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 1993, 13 (3), 250-2] și compuși
21 antimicrobieni a căror grupă tioureidică se leagă de 1-fenil-3-pirazolin-5-ona [Ogura și col.,
22 brevet **US 4025622**, 1977].

23 Obținerea unor noi compuși cu efecte antibacteriene superioare și toxicitate scăzută
24 derivă și din faptul că studii recente apreciază că omenirea ar putea rămâne fără antibiotice
25 eficiente la sfârșitul acestui deceniu, de aici și necesitatea stringentă a îmbogățirii arsenalului
26 agenților antimicrobieni.

27 Unele tulpini microbiene întâlnite în clinici manifestă fenomenul de multirezistență la
28 principalele clase de agenți antimicrobieni cunoscuți, dezavantaj major pentru tratamentul
29 infecțiilor provocate de acestea, caz în care nu există alternativă terapeutică.

30 Problema pe care invenția de față o rezolvă constă în prepararea unor noi compuși
31 din clasa tioureidelor cu toxicitate scăzută, cu efect antimicrobian, atât pe tulpini de referință,
32 dar mai ales pe tulpini microbiene recent izolate din clinici care au prezentat fenomene de
33 multirezistență la principalele clase de agenți antimicrobieni cunoscuți.

34 Un obiect al invenției se referă la derivați de tioureidă N,N-substituită a acidului 1-
35 metil-1H-4-pirazol-carboxilic, cu formulă generală I:



37
38
39
40
41 în care R este alchil C₁-C₄ normal sau ramificat C₃-C₄, cicloalchil C₃-C₆, alchenil C₂-C₄,
42 alchinil C₂-C₄, fenil nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil C₁-C₄, alcoxi C₁-C₃,
43 halogeni, nitro, heterociclu penta sau hexa atomic cu N, S, O.

44 Într-un aspect preferat, invenția se referă la derivați de tioureidă N,N-substituită a
45 acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic definiți, care sunt în mod specific selectați dintre:

46 N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-fenil-tiourea,

47 N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(3-metilfenil)-tiourea,

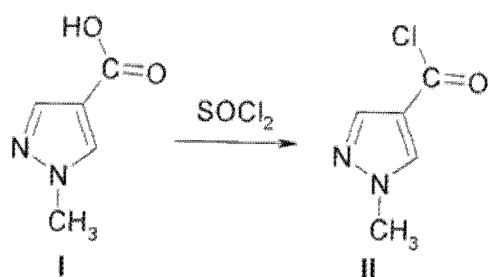
N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2,3-dimetilfenil)-tiourea,

RO 123418 B1

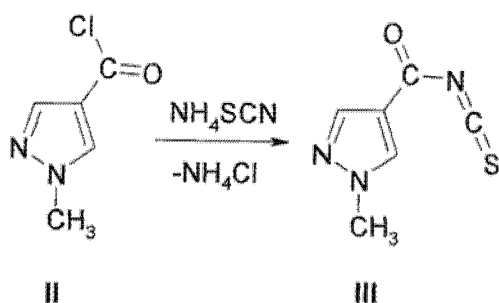
- N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2,4-dimetilfenil)-tiourea, 1
N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2,5-dimetilfenil)-tiourea, 2
N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2-etilfenil)tiourea, 3
N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2-n-propilfenil)tiourea, 4
N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2-i-propilfenil)tiourea. 5

Un alt obiect al invenției se referă la un procedeu de obținere a unui derivat de tioueidă N,N-substituită a acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic, cu formula generală I, definit mai sus, care are loc în următoarele etape: 7

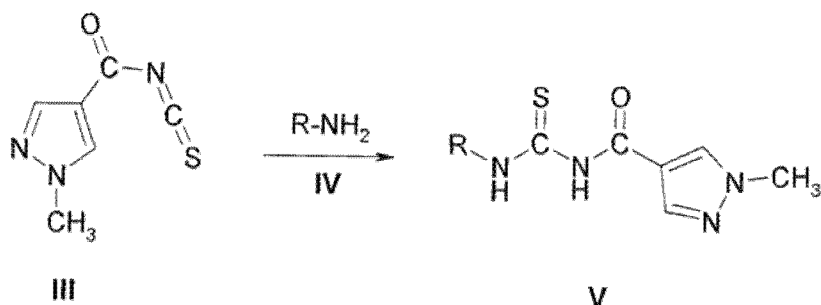
a. prepararea clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic prin refluxarea acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic în 1,2-dicloroetan anhidru cu clorură de tionil într-un raport molar de 1:2,1; 9



b. obținerea 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil izotiocianatului prin încălzirea la reflux a clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic cu tiocianat de amoniu, în mediu de acetonă anhidră, în raport stoichiometric; 21



c. obținerea noilor tioureide prin reacția 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil izotiocianatului cu aminele corespunzătoare. 33



Astfel, procedeu de obținere a derivaților N-acilați ai tioureei, definiți ca mai sus, cuprinde următoarele etape: 45

a) prepararea clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic prin refluxarea acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic în 1,2-dicloroetan anhidru cu clorură de tionil într-un raport molar de 1:2; 47

RO 123418 B1

1 b) obținerea izotiocianatului de 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil prin încălzirea la reflux
a clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic cu tiocianat de amoniu, în mediu de acetona
3 anhidră, în raport stoichiometric;

5 c) obținerea noilor tioureide prin reacția 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil izotiocianatului
cu aminele corespunzătoare.

7 Un alt obiect al invenției se referă la compoziții farmaceutice care conțin ca unic
principiu activ antimicrobian un derivat de tioureidă N,N-substituită a acidului 1-metil-1H-4-
pirazol-carboxilic, cu formula generală I, definit în revendicarea 1, împreună cu excipienți
9 acceptabili farmaceutic.

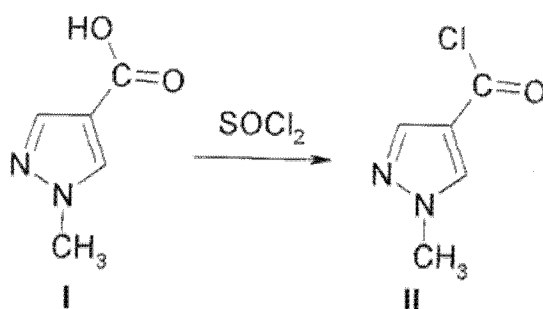
11 Un alt obiect al invenției se referă la utilizarea unui derivat de tioureidă N,N-substituită
a acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic, cu formula generală I, definit mai sus, pentru
prepararea unui medicament destinat tratamentului antimicrobian.

13 Într-un aspect preferat al invenției în utilizare de mai sus, medicamentul antimicrobian
este destinat inhibării expresiei virulenței tulpinilor bacteriene selectate dintre
15 *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* 126/2007, *Enterococcus faecalis* 13773.

17 Compușii descriși prin această invenție exercită o activitate antimicrobiană cuprinsă
între 250 și 1000 $\mu\text{g/mL}$ și la concentrații subinhibitorii interferează expresia coordonată a
19 factorilor de virulență enzimatici și, consecutiv, capacitatea bacteriilor patogene de a invada
țesuturile gazdei. Efectul antimicrobian este prezent și față de tulpinile microbiene recent
izolate din clinică care prezintă fenomene de multirezistență la principalele clase de agenți
21 antimicrobieni cunoscuți.

a. Sinteza clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic (schema 1)

23 Acidul 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic (I) este transformat în clorura acidului
corespunzător (II) prin tratare cu clorură de tionil, în mediu de 1,2-dicloretan anhidru.
25 Amestecul de reacție se refluxează timp de 3 h, iar apoi se distilează la presiune redusă,
pentru a elimina 1,2-dicloretanul și clorura de tionil.

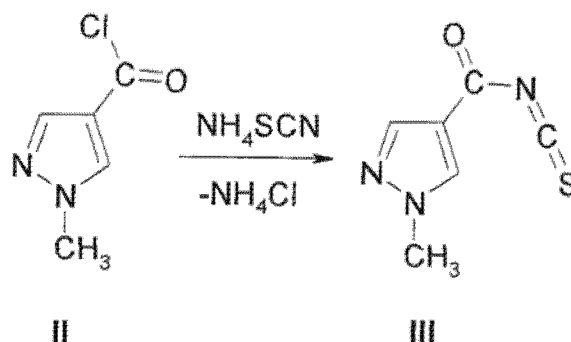


Schema 1

b. Sinteza 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil izotiocianatului (schema 2)

43 Izotiocianatul de 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil (III) a rezultat în reacția clorurii acidului
45 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic cu tiocianat de amoniu, prin refluxare timp de o oră în acetona

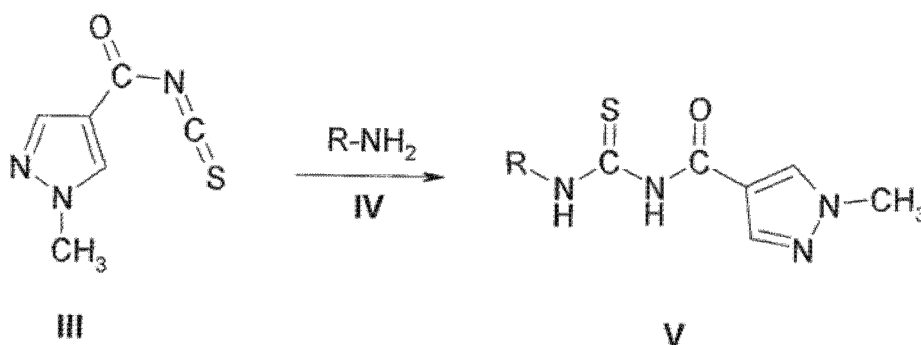
anhidră. Tiocianatul de amoniu se anhidrizează prin uscare prealabilă la 100°C. Izotiocianatul de 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil se folosește în continuare fără a fi izolat.



Schema 2

c. Sinteza noilor tioureide (schema 3)

S-a realizat prin adăugarea de amine primare (IV) la izotiocianatul de 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil (III), în mediu de reacție acetona anhidră. Amestecul de reacție a fost refluxat timp de o oră și apoi turnat în apă, pentru precipitarea tioureidelor.



R are semnificația prezentată anterior la formula generală a noilor tioureide, Schema 3.

Spectrele IR s-au realizat cu un aparat JASCO FT/IR-4200 prevăzut cu un accesoriu ATR PRO450-S cu optică diamant, folosind substanță solidă în tehnica ATR. Intensitatea benzilor de absorbție s-a notat: „s” pentru valori ale absorbției între 0 și 25%, „m” pentru valori ale absorbției între 25 și 50% și „i” pentru valori ale absorbției între 50 și 75%.

Spectrele ¹H-RMN au fost înregistrate la 300 MHz, folosind un aparat Gemini 300BB, iar spectrele ¹³C-RMN la 75,075 MHz, folosind același aparat. Ca solvent s-a utilizat DMSO-d₆, iar ca standard intern TMS. Pentru atribuirea univocă a semnalelor s-au efectuat și experimente bidimensionale COSY și HETCOR.

Spectrele UV au fost efectuate cu un spectrofotometru UV-Vis Jasco V-650, folosind ca accesoriu o sferă integratoare ISV-722, lucrându-se cu substanța solidă pulverizată. Spectrele s-au realizat pe domeniul 200-800 nm, operând la o rezoluție spectrală de 0,5 nm.

Analiza elementală s-a realizat cu un aparat Perkin Elmer CHNS/O Analyser Series II 2400. Temperaturile de topire au fost determinate cu un aparat Electrothermal 9100 și sunt necorectate. Rezultatele obținute prin analiza spectrală și elementală confirmă structura noilor compuși.

RO 123418 B1

1 Se dau în cele ce urmează opt exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. *Sinteza N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-fenil-tioureei*

3 $C_{12}H_{12}N_4OS$

a. *Sinteza clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic*

5 Într-un balon prevăzut cu refrigerent ascendent cu tub cu clorură de calciu, se
7 introduc 1,26 g (0,01 moli) acid 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic și 150 mL de 1,2-diclorețan
9 anhidrizat pe clorură de calciu și proaspăt distilat.

11 Se adaugă 2,5 g (1,5 mL) (0,021 moli) clorură de tionil (M_r 119; d_4^{20} 1,638) și se
13 refluxează 3 h, excesul de clorură de tionil și 1,2-diclorețanul eliminându-se apoi prin distilare
15 la presiune scăzută. Pentru faza următoare a sintezei, se utilizează clorura acidului în stare
17 brută.

b. *Obținerea noii tioureide*

13 1,45 g (0,01 moli) clorură a acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic (M_r 144,56) se
15 solubilizează în 30 mL acetonă anhidră. Separat, 0,76 g (0,01 moli) tiocianat de amoniu (M_r
17 76,13), uscat în prealabil la 100°C, se solubilizează în 5 mL acetonă anhidră.

19 Se amestecă la rece cele două soluții, constatându-se apariția unei turbureli și apoi
21 a unui precipitat abundent. Amestecul de reacție se refluxează o oră, pentru obținerea
23 izotiocianatului de 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil.

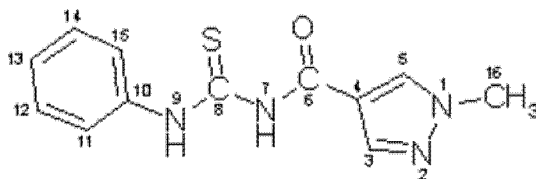
25 Se răcește amestecul la temperatura camerei și se adaugă, în mici porțiuni și sub
27 agitare, o soluție preparată din 0,93 g (0,91 mL) (0,01 moli) anilină (M_r 93,12; d_{20}^{20} 1,022) și
29 10 mL acetonă anhidră. Amestecul de reacție se refluxează timp de o oră. Se răcește și se
31 toarnă amestecul în 500 mL apă, când precipită produsul brut. Se purifică prin recristalizare
33 din alcool izopropilic.

35 Rezultă 1,95 g de compus cristalin alb (M_r 260,32) (randament 74,9% față de clorura
37 acidului), cu T.t. 188-189°C, ușor solubil la rece în acetonă și cloroform, și la cald în alcooli
39 inferiori, benzen, toluen, xilen, insolubil în apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

41 Analiza IR: Principalele benzi sunt (cm^{-1}): 3271s; 2988s; 2153s; 1740s; 1668s; 1591s;
43 1518s; 1438s; 1400s; 1316s; 1243s; 1218s; 1198s; 1152s; 1064s; 989s; 936s; 870s; 822s;
45 770s; 737m; 697m; 677m; 646m; 609m; 540s; 495s; 457s; 414s.

47 Analiza RMN



39

41

43

1H -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 12,35 (s, NH, H-9); 11,32 (s, NH, H-7); 8,60 (s, 1H,
H-3); 8,22 (s, 1H, H-5); 7,67 (m, 7,7, 3,7, 2H, H-11, H-15); 7,41 (t, 7,7, 2H, H-12, H-14); 7,26
(t, 1H, H-13); 3,90 (s, 3H, H-16).

45

^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 179,26 (C-8); 163,09 (C-6); 140,45 (C-5); 137,97 (C-10);
134,66 (C-3); 128,74 (C-12, C-14); 126,32 (C-13); 124,35 (C-11, C-15); 115,60 (C-4); 39,13
(C-16).

47

RO 123418 B1

Analiza UV: λ max (nm): 227; 262; 342,5.

Analiza elementală

C%		H%		N%		S%	
teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental
55,37	55,12	4,65	4,60	21,52	21,29	12,32	12,08

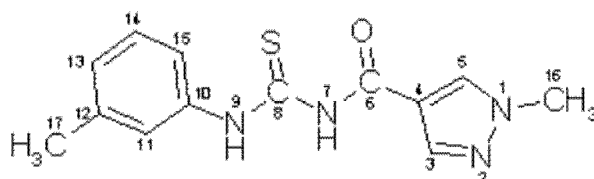
Exemplul 2. Sinteza *N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(3-metilfenil)tioureei*
 $C_{13}H_{14}N_4OS$

Compusul se prepară prin metoda menționată anterior, fiind necesare 1,07 g (0,01 moli) meta-toluidină (M_r 107,16), alcool izopropilic și cărbune pentru purificare. Rezultă 1,75 g compus (M_r 274,35) (randament 63,8% față de clorura acidului), cristalizat, alb, cu T.t. 138-139°C, ușor solubil la rece în acetonă și cloroform, și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, insolubil în apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR: Principalele benzi caracteristice sunt (cm^{-1}): 3673s; 2987s; 2153s; 1746s; 1655s; 1606s; 1546m; 1489s; 1399s; 1347s; 1308s; 1256s; 1225m; 1148m; 1093s; 992s; 884s; 783s; 739m; 698s; 681m; 616s; 544s; 519s; 448s; 405s.

Analiza RMN:



1H -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 12,37 (s, NH, H-9); 11,31 (s, NH, H-7); 8,60 (s, 1H, H-3); 8,21 (s, 1H, H-5); 7,48 (m, 8,0, 2H, H-11, H-15); 7,29 (t, 8,0, 1H, H-14); 7,07 (d, 8,0, 1H, H-13); 3,90 (s, 3H, H-16); 2,32 (s, 3H, H-17).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 179,20 (C-8); 163,13 (C-6); 140,38 (C-5); 138,10 (C-10); 137,89 (C-12); 134,61 (C-3); 128,48 (C-14); 126,90 (C-13); 124,65 (C-11); 121,33 (C-15); 115,53 (C-4); 39,06 (C-16); 20,93 (C-17).

Analiza UV: λ max (nm): 233,5; 259; 299,5.

Analiza elementală:

C%		H%		N%		S%	
teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental
56,92	56,81	5,14	5,01	20,42	20,63	11,69	11,82

Exemplul 3. Sinteza *N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2,3-dimetilfenil)-tioureei*
 $C_{14}H_{16}N_4OS$

Se lucrează ca și în cazurile precedente, folosind 1,21 g (0,01 moli) 2,3-dimetil-anilină (M_r 121,18), alcool izopropilic și cărbune pentru purificare.

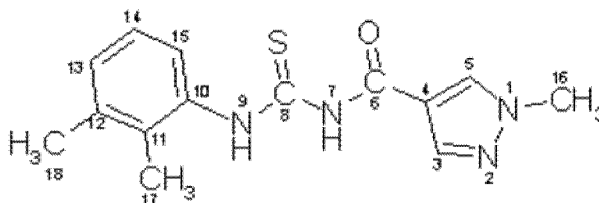
RO 123418 B1

1 Rezultă 2,05 g compus (M_r 288,37) (randament 71,1 % față de clorura acidului),
cristalizat, alb, cu T.t. 141-142°C, ușor solubil la rece în acetonă și cloroform, și la cald în
3 alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, insolubil în apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

5 Analiza IR: Principalele benzi caracteristice sunt (cm^{-1}): 3853s; 3734s; 3673s; 3648s;
2987s; 1717s; 1660m; 1525m; 1472s; 1455s; 1393s; 1310s; 1269s; 1208m; 1169s; 1152m;
7 1096s; 1068s; 996s; 969s; 875s; 817s; 765m; 729m; 698m; 648s; 612s; 549s; 476s; 415s.

Analiza RMN:



17 ^1H -RMN (DMSO-d_6 , δ ppm, J Hz): 12,34 (s, NH, H-9); 11,35 (s, NH, H-7); 8,58 (s, 1H,
19 H-3); 8,21 (s, 1H, H-5); 7,27 (t, 4,9, 1H, H-14); 7,11 (d, 4,9, 2H, H-13, H-15); 3,89 (s, 3H, H-
16); 2,26 (s, 3H, H-18); 2,10 (s, 3H, H-17).

21 ^{13}C -RMN (DMSO-d_6 , δ ppm): 180,63 (C-8); 163,18 (C-6); 140,42 (C-5); 137,27 (C-10);
136,86 (C-12); 134,62 (C-3); 132,40 (C-11); 128,55 (C-14); 125,48 (C-13(15)); 124,89 (C-
23 15(13)); 115,62 (C-4); 39,09 (C-16); 20,05 (C-18); 13,96 (C-17).

25 Analiza UV: λ max (nm): 227; 259; 299,5.

Analiza elementală:

27

C%		H%		N%		S%	
teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental
58,31	58,53	5,59	5,71	19,43	19,91	11,12	11,51

29

31 **Exemplul 4. Sinteza N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2,4-dimetilfenil)-tioureei**

33 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$

35 Sinteza urmează modul de lucru descris, utilizându-se 1,21 g (0,01 moli) 2,4-dimetil-
anilină (M_r 121,18), alcool izopropilic și cărbune pentru purificare.

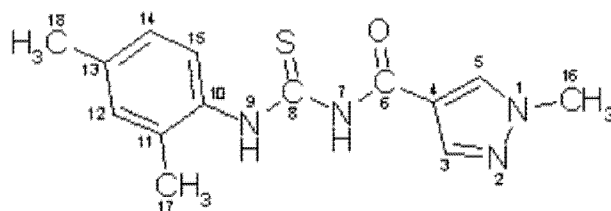
37 Rezultă 2,15 g compus (M_r 288,37) (randament 74,5% față de clorura acidului),
cristalizat, alb, cu T.t. 169-170°C, ușor solubil la rece în acetonă și cloroform, și la cald în
alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, insolubil în apă.

39 Dovedirea structurii noului compus conform invenției

41 Analiza IR: Principalele benzi caracteristice sunt (cm^{-1}): 3853s; 3734s; 3673s; 2971s;
1748s; 1656s; 1592s; 1540s; 1490s; 1455s; 1392s; 1339s; 1229s; 1208s; 1144s; 1066s;
993s; 866s; 813s; 748s; 660s; 612s; 531s; 425s.

RO 123418 B1

Analiza RMN:



^1H -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 12,36 (s, NH, H-9); 11,34 (s, NH, H-7); 8,60 (s, 1H, H-3); 8,22 (s, 1H, H-5); 7,44 (d, 8,0, 1H, H-15); 7,10 (d, 1,5, 1H, H-12), 7,02 (dd, 8,0, 1,5, 1H, H-14); 3,89 (s, 3H, H-16); 2,29 (s, 3H, H-17(18)); 2,19 (s, 3H, H-18(17)).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 180,28 (C-8); 163,15 (C-6); 140,41 (C-5); 136,23 (C-10); 134,61 (C-3); 134,40 (C-13); 133,02 (C-11); 130,95 (C-12); 126,67 (C-14); 126,43 (C-15); 115,60 (C-4); 39,08 (C-16); 20,61 (C-18); 17,60 (C-17).

Analiza UV: λ max (nm): 235; 258; 314,5.

Analiza elementală:

C%		H%		N%		S%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
5831	5813	559	547	1943	1954	1112	1092

Exemplul 5. Sinteza *N*-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-*N'*-(2,5-dimetilfenil)-tioureei
 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{OS}$

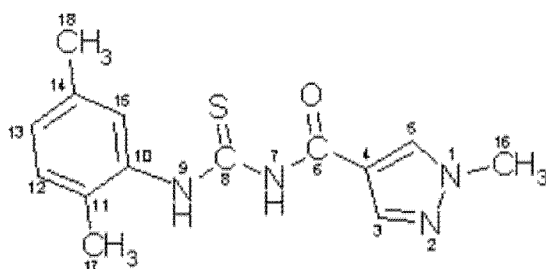
Se procedează la fel ca și pentru sinteza compușilor precedenți, folosind 1,21 g (0,01 moli) 2,5-dimetilanilină (M_r 121,18), alcool izopropilic și cărbune pentru purificare.

Rezultă 2,11 g compus (M_r 288,37) (randament 73,2% față de clorura acidului), cristalizat, alb, cu T.t. 137-137,5°C, ușor solubil la rece în acetonă și cloroform, și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, insolubil în apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR: Principalele benzi caracteristice sunt (cm^{-1}): 3853s; 3838s; 3734s; 3673s; 3648s; 3629s; 2974s; 2341s; 1748s; 1716s; 1669s; 1620s; 1542m; 1456s; 1402s; 1339s; 1297s; 1259s; 1226s; 1204s; 1152s; 1109s; 1082s; 991s; 872s; 795s; 763s; 670s; 613s; 557s; 482s; 443s; 422s.

Analiza RMN:



RO 123418 B1

¹H-RMN (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 12,39 (s, NH, H-9); 11,34 (s, NH, H-7); 8,59 (s, 1H, H-3); 8,21 (s, 1H, H-5); 7,39 (d, 1,5, 1H, H-15); 7,16 (d, 7,8, 1H, H-12); 7,02 (dd, 7,8, 1,5, 1H, H-13); 3,89 (s, 3H, H-16); 2,27 (s, 3H, H-18); 2,18 (s, 3H, H-17).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 180,19 (C-8); 163,19 (C-6); 140,43 (C-5); 136,72 (C-14); 135,34 (C-10); 134,63 (C-3); 130,29 (C-11); 130,22 (C-12); 127,73 (C-13); 126,97 (C-15); 115,61 (C-4); 39,11 (C-16); 20,58 (C-18); 17,29 (C-17).

Analiza UV: λ max (nm): 234; 310,5.

Analiza elementală:

C%		H%		N%		S%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
58,31	58,01	5,59	5,45	19,43	19,99	11,12	11,37

Exemplul 6. Sinteza N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2-etilfenil)tioureei

C₁₄H₁₆N₄OS

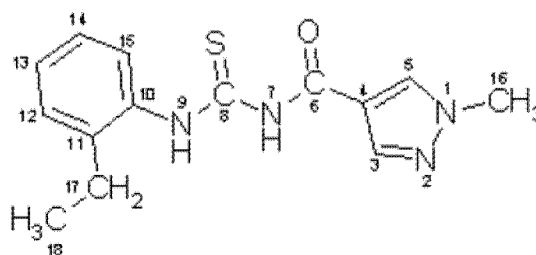
Sinteza este similară celorlalți compuși, luându-se în lucru 1,21 g (0,01 moli) 2-etilanilină (M_r 162,02), purificarea făcându-se prin recristalizare cu alcool izopropilic și cărbune animal.

Rezultă 2,07 g compus (M_r 288,37) (randament 71,8 % față de clorura acidului), cristalizat, alb, cu T.t. 130-131°C, ușor solubil la rece în acetonă și cloroform, și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, insolubil în apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR: Principalele benzi caracteristice sunt (cm⁻¹): 3126s; 1658s; 1579s; 1511m; 1319s; 1216s; 1199s; 1151m; 990s; 944s; 879s; 832s; 755m; 666s; 612m; 570s; 530s; 460s.

Analiza RMN:



¹H-RMN (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 12,47 (s, NH, H-9); 11,40 (s, NH, H-7); 8,60 (s, 1H, H-3); 8,22 (s, 1H, H-5); 7,55-7,52 (m, 1H, H-15), 7,32-7,23 (m, 3H, H-12, H-13, H-14); 3,89 (s, 3H, H-16); 2,57 (q, 7,6, 2H, H-17); 1,14 (t, 7,6, 3H, H-18).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 180,80 (C-8); 163,34 (C-6); 140,47 (C-5); 139,04 (C-10); 136,30 (C-11); 134,70 (C-3); 128,84 (C-12); 127,44 (C-14); 127,36 (C-13); 126,15 (C-15); 115,58 (C-4); 39,12 (C-16); 24,21 (C-17); 14,51 (C-18).

RO 123418 B1

Analiza UV: λ max (nm): 237,5; 294,5; 252.

Analiza elementală:

C%		H%		N%		S%	
teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental
58,31	58,07	5,59	5,64	19,43	19,32	11,12	10,63

Exemplul 7. Sinteza *N*-[(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)carbonil]-*N'*-(2-*n*-propilfenil)tioureei
 $C_{15}H_{18}N_4OS$

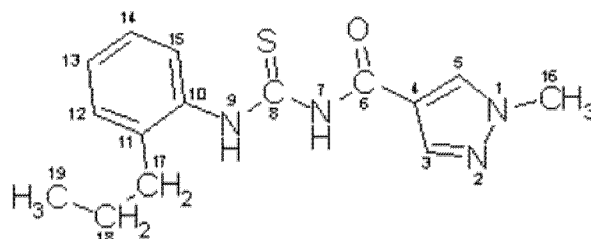
Se lucrează conform tehnicii menționate, folosind 1,35 g (0,01 moli) 2-*n*-propil-anilină (M_r 135,21), alcool izopropilic și cărbune animal pentru purificare.

Rezultă 2,15 g (randament 71,1%) compus alb, cristalizat (M_r 302,40), cu T.t. 118,5-120°C, ușor solubil la rece în acetonă și cloroform, și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, insolubil în apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR: Principalele benzi caracteristice sunt (cm^{-1}): 3124s; 2950s; 1657m; 1579s; 1510m; 1362s; 1321s; 1247s; 1211m; 1196m; 1152m; 1115s; 1090s; 989m; 872s; 837s; 810s; 774m; 756m; 689; 656m; 611m; 592s; 552s; 532s; 465s; 417s.

Analiza RMN:



1H -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 12,49 (s, NH, H-9); 11,39 (s, NH, H-7); 8,60 (s, 1H, H-3); 8,23 (s, 1H, H-5); 7,58-7,55 (m, 1H, H-15); 7,30-7,22 (m, 3H, H-12, H-13, H-14); 3,89 (s, 3H, H-16); 2,51 (t, 7,6, 2H, H-17); 1,54 (sxt, 7,6, 2H, H-18); 0,87 (t, 7,6, 3H, H-19).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 180,74 (C-8); 163,35 (C-6); 140,44 (C-5); 137,37 (C-10); 136,45 (C-11); 134,73 (C-3); 129,73 (C-12); 127,47 (C-14); 127,14 (C-13); 126,17 (C-15); 115,55 (C-4); 39,10 (C-16); 33,11 (C-17); 23,07 (C-18); 13,83 (C-19).

Analiza UV: λ max (nm): 206,5; 235; 330,5; 351.

Analiza elementală:

C%		H%		N%		S%	
teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental
59,58	59,64	6,00	6,18	18,53	18,66	10,60	10,76

RO 123418 B1

1 **Exemplul 8. Sinteza N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2-i-propilfenil)tioureei**
C₁₅H₁₈N₄OS

3 Se lucrează conform tehnicii menționate folosind 1,35 g (0,01 moli) 2-izopropil-anilină
(M_r, 135,21), alcool izopropilic și cărbune animal pentru purificare.

5 Rezultă 1,97 g (randament 65,2%) compus alb, cristalizat (M_r, 302,40), cu T.t. 177,5-
179°C, ușor solubil la rece în acetonă și clorofom, și la cald în alcoolii inferiori, benzen,
7 toluen, xilen, insolubil în apă.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

9 Analiza IR: Principalele benzi caracteristice sunt (cm⁻¹): 3181s; 2679s; 1670s; 1552s; 1515m;
1315s; 1241s; 1216m; 1198s; 1157m; 1061s; 995s; 976s; 865s; 834s; 761m; 720s; 666m;
11 620s; 582s; 557s; 532s; 469s; 439s.

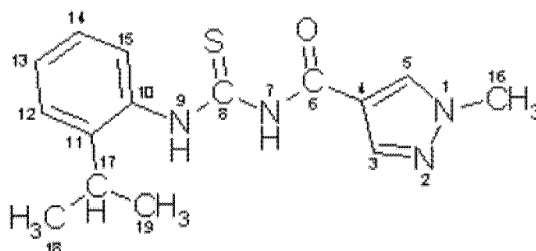
Analiza RMN:

13

15

17

19



21

23 ¹H-RMN (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 12,41 (s, NH, H-9); 11,40 (s, NH, H-7); 8,60 (s, 1H,
H-3); 8,22 (s, 1H, H-5); 7,41 (dd, 7,5, 1,8, 1H, H-12); 7,38 (dd, 7,5, 1,8, 1H, H-15); 7,30 (td,
25 7,5, 1,8, 1H, H-13); 7,23 (td, 7,5, 1,8, 1H, H-14); 3,89 (s, 3H, H-16); 3,04 (septet, 6,7, 1H, H-
17); 1,18 (d, 6,7, 6H, H-18, H-19).

27 ¹³C-RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 181,26 (C-8); 163,33 (C-6); 143,74 (C-10); 140,46 (C-5);
135,64 (C-11); 134,69 (C-3); 127,96 (C-12); 127,71 (C-13); 125,98 (C-14); 125,86 (C-15);
29 115,58 (C-4); 39,12 (C-16); 27,99 (C-17); 23,07 (C-18, C-19).

31 Analiza UV: λ max (nm): 221; 261; 330,5.

Analiza elementală:

33

35

C%		H%		N%		S%	
teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental	teoretic	experi- mental
5958	5944	600	607	1853	1868	1060	1076

37

Testarea activității antimicrobiene

39 Testarea s-a realizat prin metode calitative și cantitative.

41 *Screening-ul calitativ al spectrului de sensibilitate al diferitelor tulpini microbiene față
de compusul testat, prin variante adaptate ale metodei disc-difuzimetrice (metoda Kirby-
Bauer)*

43 Materiale necesare:

45 a) Plăci Petri sterile cu diametrul de 10 cm în care s-a repartizat mediu Mueller-
Hinton cu grosimea de 4 mm, agarizat 1,5% (pH= 7,2...7,4);

RO 123418 B1

b) Tulpini microbiene testate:	1
Activitatea antimicrobiană a fost testată față de tulpini bacteriene de referință sau recent izolate din clinică (<i>Acinetobacter baumannii</i> 15896, <i>Bacillus subtilis</i> 10.10.2006, <i>Enterococcus faecalis</i> 13773, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5541, <i>Klebsiella pneumoniae</i> 126/2007, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> 637/2007).	3
Trebuie precizat că tulpinile microbiene menționate, recent izolate din clinică, au prezentat fenomene de multirezistență la principalele clase de agenți antimicrobieni, utilizate în tratamentul infecțiilor cu respectivele tulpini de microorganisme. Aceste tulpini au fost izolate din infecții persistente, dificil de tratat, pentru care nu a existat alternativă terapeutică cunoscută.	5
Din aceste tulpini se realizează inoculul microbial reprezentat de o suspensie în bulion Mueller Hinton sau în A.F.S. (apă fiziologică sterilă), realizată dintr-o cultură tânără (4...5 colonii izolate) dezvoltată pe un mediu solid, în vârstă de 15... 18 h, cu o densitate de $1-3 \times 10^8$ UFC/mL, ajustată nefelometric (utilizând un etalon McFarland 0,5 = $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) sau spectrofotometric, prin măsurarea absorbției la 660 nm ($A_{660} = 0,12$).	7
c) soluția stoc de substanță testată în DMSO (concentrație 1000 μ g/mL).	9
Metoda 1. Testarea activității antimicrobiene a compusului prin metoda disc-difuzimetrică	11
Impregnarea discurilor de hârtie de filtru cu soluție de compus (concentrație 1000 μ g/mL) se realizează astfel: cu ajutorul unei pense sterile, rondellele de hârtie de filtru se așază într-o placă Petri la distanță unele de altele. Cu ajutorul micropipetei, se distribuie 5 μ L de compus, astfel încât toate discurile să fie acoperite. Se plasează la termostat placa închisă, pentru uscarea discurilor.	13
Discurile impregnate vor fi în continuare folosite la realizarea antibiogramei pe diferite tulpini microbiene prin metoda disc-difuzimetrică.	15
În acest scop, se însămânțează plăcile "în pânză", cu ajutorul tamponului de vată steril, după care, pe suprafața mediului însămânțat, se dispun individual discurile impregnate cu compus, cu ajutorul unei pense sterile flambată în prealabil. Plasarea discurilor pe suprafața mediului se face la o distanță de 3 cm față de centrele discurilor și la cel puțin 1,5 cm de marginea plăcii. După depunere, discul se apasă ușor cu pensa, pentru a asigura contactul intim cu suprafața mediului. După dispunerea discurilor, plăcile se lasă în repaus la temperatura camerei 20...30 min, pentru a asigura difuzarea uniformă a substanței active în mediu. Plăcile se incubează timp de 24 h, la 37°C, cu capacul în jos.	17
Citirea rezultatelor se realizează prin vizualizarea apariției unor zone de inhibiție a creșterii microbiene în jurul discului impregnat cu soluție de compus.	19
Metoda 2. Testarea activității antimicrobiene a noului compus prin metoda repartizării soluției de compus în godeuri decupate în agar.	21
Se repartizează în plăcile Petri mediul Mueller Hinton / YPG însămânțat cu inocul bacterian/ fungic, după care se decupează în mediul solidificat godeuri cu latura de 0,5 cm, în care se repartizează câte 5 μ L din soluția produsului de testat. Plăcile se incubează la 37°C, timp de 24 h.	23
Pentru citirea rezultatelor, se va observa apariția unor zone de inhibiție a creșterii microbiene în jurul godeurilor cu compus.	25
Metoda 3. Testarea calitativă a activității antimicrobiene a compusului analizat incubat în prealabil cu suspensia microbială.	27
5 μ L soluție din compus se repartizează sub formă de spoturi pe mediul de cultură însămânțat în prealabil "în pânză" cu tulpina de testat. Suspensiile martor microbiene se însămânțează în aceleași condiții, dar în absența produsului de testat, care constituie martorul de cultură. Plăcile se incubează la termostat cu capacul în jos, la 37°C, timp de 24 h.	29

RO 123418 B1

1 Pentru citirea și interpretarea rezultatelor, se examinează mai întâi plăcile martor de
cultură unde trebuie să se observe dezvoltarea striurilor de cultură microbiană. Dacă în placa
3 ce conține produs nu s-a dezvoltat tulpina însămânțată, înseamnă că substanța a avut efect
bactericid.

5 Dacă în placa respectivă se observă creștere microbiană, se compară abundența
culturii cu cea a striurilor obținute pe placa martor de cultură.

7 Dacă creșterea și dezvoltarea culturii bacteriene este mai puțin intensă comparativ
cu martorul de cultură, se apreciază că substanța ar avea efect bacteriostatic.

9 Se poate constata o creștere și o dezvoltare a culturilor bacteriene, în prezența
compusului de testat, superioară ca intensitate martorului de cultură. Acest fapt denotă că
11 soluția respectivă conține substanțe cu efect stimulator pentru dezvoltarea microorganismelor
respective.

13 Dacă intensitatea creșterii microbiene în placa cu compus este comparabilă cu cea
din martorul de cultură, înseamnă că respectivul compus nu influențează vizibil creșterea și
15 dezvoltarea tulpinii microbiene respective.

Evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene a compusului testat

17 *Metoda microdiluțiilor în mediu lichid (bulion Mueller Hinton și respectiv bulion YPG)*

19 Se realizează diluții binare seriale ale produsului de testat (obținându-se concentrații
de la 1000 $\mu\text{g/mL}$ până la 1,95 $\mu\text{g/mL}$) într-un volum final de 200 μL de mediu de cultură,
repartizat în plăci cu 96 de godeuri, după care, în fiecare godeu se adaugă 30 μL de
21 suspensie microbiană cu densitate corespunzătoare standardului MacFarland 0,5. La fiecare
testare se lucrează cu martor de cultură microbiană (un șir de godeuri care conține exclusiv
23 mediu de cultură inoculat cu suspensie microbiană) și cu martor de sterilitate a mediului (un
șir de godeuri care conțin exclusiv mediul de cultură).

25 După incubarea adecvată a plăcilor la 37°C, timp de 24 h, se citește valoarea
concentrației minime inhibitorii (C.M.I.), exprimată în $\mu\text{g/mL}$, prin observarea macroscopică
27 a godeurilor: în primele godeuri, cu concentrații mari de compus, creșterea culturii nu este
vizibilă, microorganismele fiind omorâte sau inhibitate în prezența compusului. Cantitatea de
29 compus corespunzătoare godeului cu cea mai mică concentrație care inhibă creșterea
vizibilă a culturii microbiene reprezintă valoarea C.M.I. pentru produsul respectiv. În godeurile
31 următoare, inclusiv șirul de godeuri martor de creștere, mediul se tulbură ca urmare a
creșterii microbiene. În șirul de godeuri martor de sterilitate obligatoriu, mediul trebuie să
33 rămână limpede. Din ultimul godeu ce prezintă activitate antimicrobiană și din primul godeu
pozitiv pentru creșterea microorganismelor, se realizează frotiuri colorate Gram pentru
35 confirmarea rezultatelor.

37 Tulpinile folosite pentru testarea activității antimicrobiene a compusului conform
invenției menționate și în tabelul anterior sunt tulpini recent izolate din clinică și care nu au
răspuns la tratamentul cu substanțe antimicrobiene cunoscute, cu excepția tulpinii de *B.*
39 *subtilis*, care este o tulpină de referință.

RO 123418 B1

Rezultatele obținute la evaluarea cantitativă a acțiunii antimicrobiene sunt prezentate în tabelul următor:

	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Exemplul 1	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000
Exemplul 2	> 1000	1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000
Exemplul 3	250	> 1000	> 1000	1000	500	> 1000	> 1000
Exemplul 4	> 1000	> 1000	500	> 1000	1000	> 1000	1000
Exemplul 5	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Exemplul 6	250	1000	> 1000	500	1000	250	> 1000
Exemplul 7	250	500	250	1000	500	500	1000
Exemplul 8	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000

Determinarea citotoxicității compușilor brevetati

S-au utilizat culturi de celule aderente HeLa menținute la 37°C, în atmosferă de 5% CO₂, în mediu de cultură DMEM:F12 = 1:1 (Sigma), suplimentat cu 10% ser fetal de vițel (Sigma) și 400 UI/mL penicilină, 200 mg/mL streptomicină. Celulele au fost cultivate în plăci Falcon cu 96 de godeuri, 1 x 10⁵ celule/godeu și au fost menținute la 37°C în atmosferă cu 5% CO₂. La 24 h s-a realizat tratamentul, utilizând diferite concentrații ale substanțelor testate, respectiv: 1 mg/mL; 100 μg/mL; 10 μg/mL; 1 μg/mL; 100 ng/mL; 10 ng/mL; 1 ng/mL, 100 pg/mL. S-a lucrat în triplicat. La 24 h de la tratament, s-a cuantificat viabilitatea, folosind trusa Cell Titer (Promega).

Citotoxicitatea compușilor analizați este dependentă de concentrația analizată, compuşii manifestând niveluri foarte scăzute sau, respectiv, citotoxicitate absentă la concentrații ≤10 μg/mL. Toți compușii testați au prezentat niveluri foarte scăzute de citotoxicitate (viabilitate celulară >90%) la 10 μg/mL.

La concentrația de 100 μg/mL, compușii prezentați în exemplele 1, 2 și 7 au prezentat niveluri ridicate de citotoxicitate (viabilitatea celulară <80%)

La concentrația de 1000 μg/mL, niciun compus nu a prezentat niveluri acceptabile de citotoxicitate, cu viabilitate celulară >80%.

Detectarea influenței concentrațiilor subinhibitorii a compușilor testați asupra producerii de factori de virulență solubili

Pentru a stabili influența compușilor asupra expresiei factorilor de virulență, tulpinile bacteriene au fost cultivate în prezența substanțelor sintetizate. După incubare la 37°C, timp de 24 h, tulpinile bacteriene au fost investigate pentru evidențierea diferiților factori de virulență.

RO 123418 B1

1 Pentru evidențierea producerii de lecitinază, culturile au fost însămânțate în spot pe
mediu solid cu galbenuş de ou și incubate la 37°C până la 7 zile. Prezența unei zone opace
3 (de precipitare) în jurul ariei de creștere a indicat producerea de lecitinază. Producerea de
lipază a fost evidențiată prin însămânțarea culturilor în spot pe mediu solid cu adaos de
5 Tween 80 în concentrație finală de 1% și au incubare la 37°C până la 7 zile. Prezența unei
zone opace (de precipitare) în jurul ariei de creștere a indicat producerea de lipază. Pentru
7 evidențierea producerii de proteaze, tulpinile au fost însămânțate în spot pe două tipuri de
medii solide - cu cazeină, respectiv, cu gelatină, și incubate 24 h, la 37°C. Prezența unei
9 zone de precipitare în jurul ariei de creștere a indicat proteoliza cazeinei/gelatinei și prezența
cazeinazei, respectiv, a gelatinazei. Pentru observarea producerii de ADN-ază, tulpinile au
11 fost însămânțate în spot pe geloză cu ADN și incubate 24 h, la 37°C. După incubare, peste
culturile în spot s-au adăugat câteva picături de soluție HCl 1N, clarificarea zonei în jurul ariei
13 de creștere a fost înregistrată ca reacție pozitivă. Producerea de amilază se observă prin
însămânțarea tulpinilor în spot, pe geloză cu amidon, și incubare 24 h, la 37°C. După
15 incubare, peste culturile în spot s-au adăugat câteva picături de soluție Lugol, clarificarea
zonei în jurul ariei de creștere, față de fondul albastru al mediului, fiind înregistrată ca reacție
17 pozitivă. Hidroliza esculinei se evidențiază prin însămânțarea tulpinilor în tuburi cu citrat de
fer și esculină și incubare 24 h, la 37°C. După incubare, apariția unor precipitate de culoare
19 neagră a fost înregistrată ca reacție pozitivă (Lazăr și col., *Roum. Biotechnol. Lett.*, 2005, 10,
2225-32).

21 Testele pentru determinarea influenței compușilor asupra exprimării factorilor de
virulență solubili au evidențiat, în general, o inhibare, în diferite grade, a exprimării unor
23 factori de virulență. Cel mai eficient s-a dovedit a fi compusul din exemplul 5, care a inhibat
producerea de lipază la *S. aureus* și lecitinază la *Klebsiella pneumoniae*, ambele enzime fiind
25 implicate în liza celulelor eucariote și invazia procesului infecțios. Producerea de lecitinază
de către *Klebsiella pneumoniae* a fost de asemenea inhibată de către compușii prezentați
27 în exemplele 3, 4, și 6. Compusul de la exemplul 7 a inhibat producerea de cazeinază la *E.*
faecalis, protează implicată de asemenea în invazia țesuturilor gazdă.

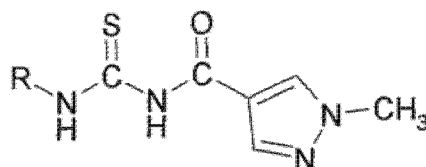
29 În schimb, compusul prezentat la exemplul 5 a stimulat producerea de lipază, amilază
și gelatinază la *Klebsiella pneumoniae*, iar cel din exemplul 8 producerea de cazeinază.

31 Așadar, în concentrații subinhibitorii, unii dintre compușii testați interferează expresia
coordonată a factorilor de virulență enzimatici și, consecutiv, capacitatea bacteriilor patogene
33 de a invada țesuturile gazdei.

RO 123418 B1

Revendicări

1. Derivați de tioureidă N,N-substituită a acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic, cu formulă generală I:



caracterizați prin aceea că R este alchil C₁-C₄ normal sau ramificat C₃-C₄, cicloalchil C₃-C₆, alchenil C₂-C₄, alchinil C₂-C₄, fenil nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil C₁-C₄, alcoxi C₁-C₃, halogeni, nitro, heterociclu penta sau hexa atomic cu N, S, O.

2. Derivați de tioureidă N,N-substituită a acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** sunt selectați dintre:

N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-fenil-tiourea

N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(3-metilfenil)-tiourea

N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2,3-dimetilfenil)-tiourea

N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2,4-dimetilfenil)-tiourea

N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2,5-dimetilfenil)-tiourea

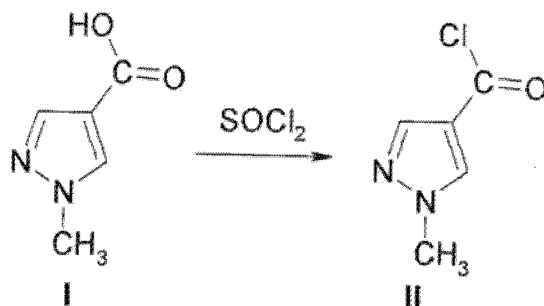
N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2-etilfenil)tiourea

N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2-n-propilfenil)tiourea

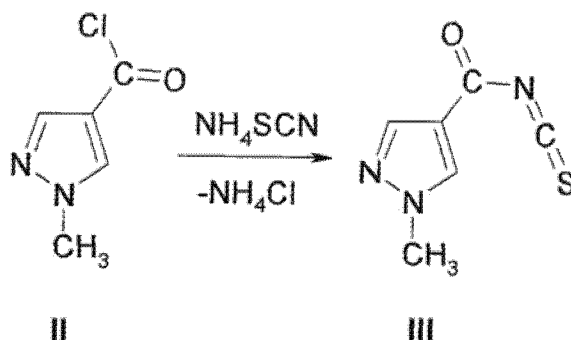
N-[(1-metil-1H-pirazol-4-il)carbonil]-N'-(2-i-propilfenil)tiourea.

3. Procedeu de obținere a unui derivat de tioureidă N,N-substituită a acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic, cu formula generală I, definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** are loc în următoarele etape:

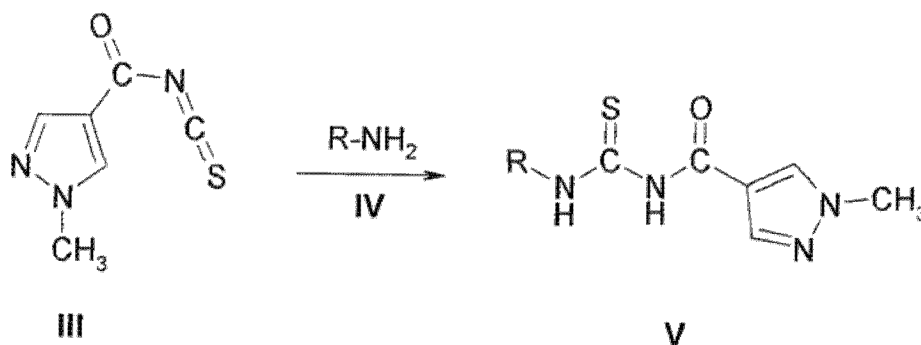
a. prepararea clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic prin refluxarea acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic în 1,2-dicloroetan anhidru cu clorură de tionil într-un raport molar de 1:2,1;



b. obținerea 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil izotiocianatului prin încălzirea la reflux a clorurii acidului 1-metil-1H-4-pirazol-carboxilic cu tiocianat de amoniu, în mediu de acetona anhidră, în raport stoichiometric.



1 c. obținerea noilor tioureide prin reacția 1-metil-1H-4-pirazol-carbonil izotiocianatului
3 cu aminele corespunzătoare.



15 4. Compoziții farmaceutice, **caracterizate prin aceea că** acestea conțin ca unic
17 principiu activ antimicrobian un derivat de tioureidă N,N-substituită a acidului 1-metil-1H-4-
pirazol-carboxilic, cu formula generală I, definit în revendicarea 1, împreună cu excipienți
acceptabili farmaceutic.

19 5. Utilizare a unui derivat de tioureidă N,N-substituită a acidului 1-metil-1H-4-pirazol-
carboxilic, cu formula generală I, definit în revendicarea 1, pentru prepararea unui medica-
ment destinat tratamentului antimicrobian.

21 6. Utilizare conform revendicării 5, în care medicamentul antimicrobian este destinat
23 inhibării expresiei virulenței tulpinilor bacteriene selectate dintre *Staphylococcus aureus*,
Klebsiella pneumoniae 126/2007, *Enterococcus faecalis* 13773.

