



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00859

(22) Data de depozit: 01/11/2018

(41) Data publicării cererii:
30/10/2019 BOPI nr. 10/2019

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

(72) Inventatori:
• VLAD ILINCA MARGARETA,
CALEA DOROBANȚILOR NR.74, BL.13,
SC.3, ET.8, AP.75, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• LIMBAN CARMEN,
STR. RĂSCOALA DIN 1907 NR.11, BL.16,
SC.5, ET.2, AP. 178, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NUȚĂ DIANA CAMELIA,
ȘOS.ANTIAERIANĂ 6A24, BL.C3, AP.19,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIRIȚĂ CORNEL, STR.DOAMNA GHICA
NR.7, BL.4, SC.2, ET.7, AP.73, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MARINECI DANA CRISTINA,
ȘOS.OLTENIȚEI NR.220, BL.8, SC.A, ET.6,
AP. 36, BUCUREȘTI, B, RO;
• ȘTEFĂNESCU EMIL, STR.FIRIDEI NR.1,
BL.H15, SC.6, AP.110, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• CĂPROIU MIRON TEODOR,
ALEEA BĂIUȚ NR.13, BL.A 34, SC.A, ET.3,
AP.12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• DRĂGHICI CONSTANTIN, BD.
TIMIȘOARA NR. 49, BL. CC6, SC. A, ET.2,
AP. 7, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• DUMITRAȘCU FLOREA,
ALEEA ȘCOLARILOR NR.10, BL.S24, ET.9,
AP.47, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MĂRUȚESCU LUMINIȚA,
ALEEA LT.GHEORGHE STALPEANU NR.2,
BL.2, SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• AVRAM SPERANȚA,
ALEEA OBCINA MĂRE NR.9, BL.Z26, ET.3,
AP.20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• DINU PÂRVU CRISTINA ELENA,
STR.GH.LAZĂR NR.10, ET.1, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MISSIR ALEXANDRU VASILE,
STR.TURDA NR.106, BL.32, SC.2, ET.6,
AP.78, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) O-ARIL-CARBAMOIL-OXIMINO-DIBENZ[b, e]OXEPINE,
COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ CE LE CONȚINE
ȘI UTILIZAREA ACESTORA

(57) Rezumat:

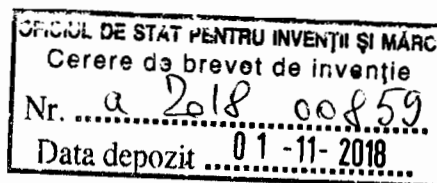
Invenția se referă la compuși O-aril-carbamoil-dibenz[b, e]oxepinici și la un procedeu de obținerea a acestora, cu utilizare în compoziții farmaceutice antimicrobiene. Compușii conform invenției au formula generală (I). Procedeuul conform invenției constă în refluxarea 11-hidroximino-6, 11-dihidro-dibenz[b, e]oxepinei (VIIa), a 2-metil-11-hidroximino-6, 11-dihidro-dibenz[b, e]oxepinei (VIIb) sau 2-etil-11-hidroximino-6, 11-dihidro-

dibenz[b, e]oxepinei (VIIc), cu arilizocianați, în mediu de reacție tetrahidrofuran anhidru, rezultând derivați ai dibenz[b, e]oxepinei cu toxicitate scăzută și eficiență antimicrobiană ridicată, atât pe tulpini microbiene de referință, cât și pe tulpini izolate cu fenotipuri de multirezistență la agenții antimicrobieni cunoscuți.

Revendicări: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





102

O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine, compoziție farmaceutică ce le conține și utilizarea acestora

În ultimii ani, emergența fenomenelor de rezistență și multirezistență la substanțe antimicrobiene și apariția de noi agenți etiologici, au determinat intensificarea preocupărilor pentru găsirea de noi agenți antimicrobieni, reprezentând și o provocare pentru a identifica noi strategii de tratament al bolilor infecțioase.

Ca urmare, dezvoltarea unor molecule prototip cu structură originală constituie o direcție prioritară a cercetării de noi chimioterapice antimicrobiene cu eficacitate maximă și toxicitate scăzută, care să reprezinte soluții terapeutice eficiente în cazul infecțiilor cu microorganisme cu rezistență multiplă, extinsă sau pan-rezistente și, în același timp, să prevină riscul permanent de emergență a noi mecanisme de rezistență.

Necesitatea stringentă a descoperirii unor noi compuși cu eficiență antimicrobiană ridicată derivă și din faptul că studii recente apreciază că în curând omenirea ar putea rămâne fără antibiotice eficiente, dacă acestea nu sunt utilizate în mod judicios.

Pe plan mondial se cunosc puține studii întreprinse în scopul obținerii unor noi agenți antimicrobieni din clasa derivaților dibenz[b,e]oxepinei.

Rezultatele încurajatoare ale cercetărilor efectuate pe compuși O-acil-oximino-dibenz[b,e]oxepinici [Limban C., Missir A., Chiriță I. C., Căproiu M. T., Chifiriuc M. C., Israil M. A., Delcaru C. Derivați de O-acil-2-etil-11-oximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină, compoziție farmaceutică ce îl cuprinde și utilizarea lor. Brevet RO 123055 (B1), 2010] [Limban C., Chifiriuc, M.C. Antibacterial Activity of New Dibenzoxepinone Oximes with Fluorine and Trifluoromethyl Group Substituents. Int. J. Mol. Sci., 12, 2011, 6432-6444; doi:10.3390/ijms12106432][Limban C., Missir A., Chiriță I. C. O-arylcarbamoil- and O-arylthiocarbamoil)-11-oximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepins. "Ovidius" University Annals of Medical Science- Pharmacy; 3(1), 2005, 21-28], precum și faptul că grupele farmacofore carbamoil și oximinică sunt prezentate în literatura de specialitate ca având certe efecte antiinfecțioase, ne-au determinat să reunim într-o singură moleculă originală aceste fragmente biologice active.

Nucleul dibenz[b,e]oxepinic reprezintă structura de bază pentru numeroase medicamente consacrate, folosite în special în terapia psihotropă ca antidepresive, anxiolitice sau antipsihotice (doxepina, cidoxepina, spiroxepina, pinoxepina), ca analgezice, antiinflamatoare, antipiretice și antiflogistice (isoxepac, oxepinac), ca β -simpatomimetice (doxaminol) sau ca inhibitori ai fosfolipazei A₂ (olopatadina). 3-((2,4-Difluorofenil)amino)dibenz[b,e]oxepin-11(6H)-ona (skeptinon-L) este un inhibitor al protein- kinazei p38 activată de mitogeni (p38 MAPK), cu rol

important în producerea de citokine proinflamatoare, ce poate fi utilizat în tratamentul artritei reumatoide, astmului și al bolii Crohn, precum și în cel al trombozelor [Storch K., Gehringer M., Baur B., Laufer S. A. Metabolism of a novel skepinone L-like p38 mitogen- activated protein kinase inhibitor. Med. Chem. Commun., 5, 2014, 808-815][Borst O., Walker B., Münzer P., Russo A., Schmid E., Faggio C., Bigalke B., Laufer S., Gawaz M., Lang F. Skepinone-L, a novel potent and highly selective inhibitor of p38 MAP kinase, effectively impairs platelet activation and thrombus formation. Cellular Physiology and Biochemistry, 31, 2013, 914-924].

În ultimii ani, nucleul dibenz[b,e]oxepinic a stat la baza proiectării unor molecule cu proprietăți antitumorale. Astfel, hidroxiamida acidului 8-(11-oxo-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-2-iloxi)octanoic inhibă activitatea histon-deacetilazei, dovedind o eficiență antitumorală asemănătoare cu cea a inductorilor apoptozei [Grossmann A., von der Saal W., Sattelkan T., Tibes U. Tricyclic alkylhydroxamate derivatives. Brevet SUA 6512123 (B2), 2003, 28 ianuarie].

Au fost sintetizați și testați ca inhibitori ai 5 α -reductazei, derivați care conțin un fragment de acid 4-fenoxibutiric legat de nucleul dibenz[b,e]oxepinic, compuși utili în tratamentul hiperplaziei benigne a prostatei, acneei și al hirsutismului [Hitoshi Takami, Hiromi Nonaka, Nobuyuki Kishibayashi, Akio Ishii, Hiroshi Kase, Toshiaki Kumazawa. Synthesis of tricyclic compounds as steroid 5 α -reductase inhibitors. Chem. Pharm. Bull., 48(4), 2000, 552- 555].

O serie de imidazol-derivați ai 6,11-dihidrodibenz[b,e]oxepinei au fost testați și s-au dovedit a avea acțiune antibacteriană și antifungică [Imidazole derivatives of 6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepines and 6,11-dihydrodibenz[b,e]thiepinines. Hoehn H. Brevet SUA 4169205, 1979, 25 septembrie].

Derivații dibenz[b,e]oxepinici izolați din fungi sunt relativ rari, fiind raportați doar câțiva astfel de metaboliți, cum ar fi arugozinul F, izolat din *Ascodesmis sphaerospora*, arugozinul G și arugozinul H, izolați din *Emericella nidulans var. acristata*, sau chaetona G, din *Aschersonia luteola* BCC 31749. Compusul analog structural cu chaetona G, care are în poziția 7 a nucleului dibenz[b,e]oxepinic o grupă metoxi, prezintă acțiune antitumorală, fiind activ pe linii celulare de cancer gastric BGC 823 [Sara M. Hein, James B. Gloer, Brenda Koster, David Malloch. Arugosin F: A New Antifungal Metabolite from the Coprophilous Fungus *Ascodesmis sphaerospora*. J. Nat. Prod., 61(12), 1998, 566-1567] [Ana Kralj, Stefan Kehraus, Anja Krick, Ekaterina Eguereva, Gerhard Kelter, Martina Maurer, Andreas Wortmann, Heinz-Herbert Fiebig, Gabriele M. König. Arugosins G and H: Prenylated Polyketides from the Marine-Derived Fungus *Emericella nidulans var. acristata*, J. Nat. Prod., 69(7), 2006, 995-1000] [Kornsakulkarn, Jitra, Saepua, Siriporn, Laksanachoen, Pattiyaa, Rachtawee, Pranee, Thongpanchang, Chawanee. Chaetone G, a new dibenzo[b,e]oxepinone from the insect pathogenic fungus *Aschersonia luteola* BCC 31749. Tetrahedron Letters, 57 (2016), 305-307].

Leptosferinul D, un nou poliketid izolat din culturile ascomicetelor *Leptosphaeria* sp., un analog cu structură dibenz[b,e]oxepinică al arugozinului F, prezintă efecte antimicrobiene și antifungice [Polyketides from the Ascomycete Fungus *Leptosphaeria* sp. Lin J., Liu S., Sun B., Niu S., Li E., Liu X., Che Y. J. Nat. Prod. 73 (2010), 905-910].

Alegerea structurii compușilor care fac obiectul acestui brevet, se bazează și pe faptul că fragmentul carbamoiloximinic se regăsește și în structura unor compuși cu acțiune antibacteriană și antifungică (O-carbamoil-tiofenmetilenoxime [Crovetti A. J., Stein R. G. Certain O-substituted thiophene oxime carbamates used as antibacterial and antifungal agents. Brevet SUA 4061764, 1977, 6 decembrie], N-metil-N-(3-trifluorometilfenilsulfenil)carbamoiloxime [Siegler P., Kühle E., Hammann I., Behrenz W., Hameyer B. N-methyl-N-(3-trifluoromethylphenylsulfenyl)-carbonyloxime-carbamates. Brevet SUA 4008328, 1977, 15 februarie], N-R-carbamoil-2-adamantanoxime [Georgiev V. S., Saeva G. A. 2-Adamantanone oxide carbamate derivatives. Brevet SUA 4652680, 1987, 24 martie]) sau antimicobacteriană, cum ar fi N,N-dimetilcarbamoiloxima 2-bromo-6-R-indeno[2,1-c]chinolin-7-onei [Shankan R. & col. Conformationally-constrained indeno[2,1-c]quinolines- a new class of anti-mycobacterial agents. Org. Biomol. Chem., 8 (2010), 2180-2197].

O serie de oxime carbamați au fost identificate ca substanțe cu potențial inhibitor pentru hidrolaza amidelor acizilor grași (FAAH) [Sonia Gattinoni, Chiara De Simone, Sabrina Dallavalle, Filomena Fezza, Raffaella Nannei, Natalia Battista, Patrizia Minetti, Gianandrea Quattrociochi, Antonio Caprioli, Franco Borsini, Walter Cabri, Sergio Penco, Lucio Merlini, Mauro MacCarrone. A new group of oxime carbamates as reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 20 (2010), 4406-4411][S. Y. Sit, Charles M. Conway, Kai Xie, Robert Bertekap, Clotilde Bourin, Kevin D. Burris. Oxime carbamate- discovery of a series of novel FAAH inhibitors. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 20 (2010), 1272- 1277].

Dealtfel, această caracteristică structurală se întâlnește și la compuși consacrați ca acaricide, insecticide și/ sau nematocide (aldicarb, aldoxicarb, oxamil, alanicarb, tirpate), precum și la N-metil-N-[(terț-butilfenil)sulfenil]carbamoiloxime utilizate ca pesticide [J. A. Durden Jr., A. A. Sousa, Tertiary butyl substituted carbamoyl oxime pesticides, Brevet SUA 3998963, 1976, 21 decembrie].

Grupa carbamoiloximino prezintă în molecula unor astfel de compuși, este o componentă de bază, care contribuie la îmbunătățirea proprietăților lor farmacologice și farmacocinetice [Ray S., Pathak S. R., Chaturvedi D. Organic carbamates in drug development. Part II: antimicrobial agents - recent reports. Drugs. Fut. 30 (2005), 161].

Problema pe care invenția de față o rezolvă, constă în sinteza unor noi compuși cu toxicitate scăzută, din clasa carbamoiloximino-dibenz[b,e]oxepinelor și demonstrarea efectului antimicrobian, pe tulpini de referință, precum și pe tulpini microbiene recent izolate din clinică cu

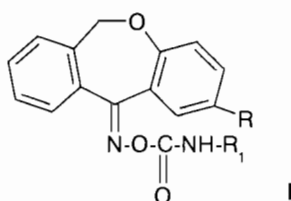
fenotipuri de multirezistență la principalele clase de agenți antimicrobieni cunoscuți și pentru care nu există alternativă terapeutică.

Originalitatea constă și într-o abordare metodologică nouă, care se bazează pe completarea studiului activității antimicrobiene cu cel al evaluării influenței noilor compuși sintetizați asupra capacității de aderență a tulpinilor microbiene la substratul inert, în vederea stabilirii utilității lor pentru dezvoltarea unei noi strategii antiinfecțioase, numită antipatogenică. Bacteriile posedă molecule de legare, numite generic adevine, care sunt capabile să se lege stereospecific cu receptorii de pe membrana celulei gazdă, în maniera analogă interacției antigen-anticorp sau lectine-zahar. Interacțiunea celor mai multe adevine cu receptorii de suprafață ai celulei sensibile este specifică și selectivă. Aderența asigură colonizarea anumitor situsuri din organism, multiplicarea bacteriilor, sinteza toxinelor și desfășurarea reacției inflamatorii de apărare. Cele mai multe bacterii au o sarcină netă negativă a suprafeței lor, dar au și zone limitate electropozitive, precum și molecule cu caracter hidrofob. Prezența grupelor cu sarcini opuse și a moleculelor hidrofobe asigură interacțiunea celulei bacteriene cu suprafața celulei epiteliale.

Studiul activității antimicrobiene s-a realizat pe o tulpină Gram-negativă recent izolată din clinică (*Klebsiella pneumoniae* 1771) și pe tulpini de referință de bacterii Gram- negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) și Gram- pozitive (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) și fungi (*Candida albicans* ATCC 10231). Testarea acțiunii antimicrobiene are în vedere screening-ul calitativ al sensibilității diferitelor tulpini, testarea cantitativă a acțiunii antimicrobiene în vederea determinării unor parametri cantitativi ai acestei acțiuni (stabilirea concentrației minime inhibitorii), precum și studiul influenței compușilor nou sintetizați asupra dezvoltării de biofilme microbiene pe substrat inert.

Determinarea citotoxicității noilor compuși s-a realizat *in vitro*, utilizând liniile celulare HeLa și HCT8 și a avut în vedere detecția apoptozei și necrozei prin citometrie de flux utilizând kitul *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I* (BD Bioscience Pharmingen, USA). De asemenea, s-a cuantificat efectul acestor substanțe asupra diferitelor faze ale ciclului celular.

Invenția de față se referă la O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine (**I**), cu formula generală următoare, în care sunt asociate într-o singură moleculă mai multe fragmente biologic active: sistemul heterociclic condensat, cu oxigen în punte (sistemul dibenz[b,e]oxepinic) și grupele farmacofore carbamoil și oximinică.



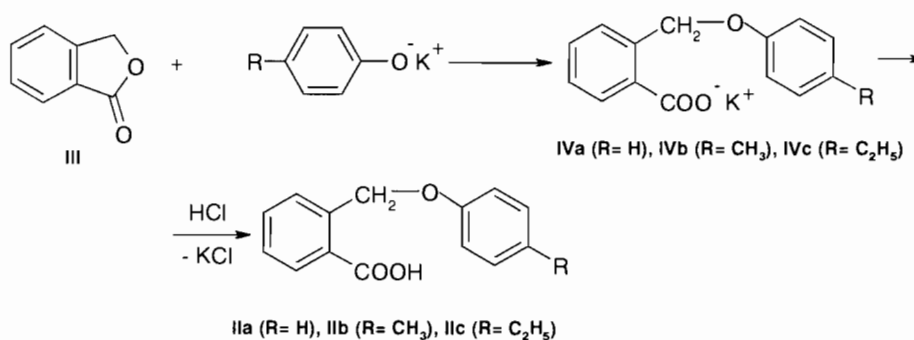
când R= H, R₁= -C₆H₄CH₃(3), -C₆H₄F(4), -C₆H₄Cl(3), -C₆H₄Cl(4), -C₆H₃Cl₂(2,4), -C₆H₄CF₃(3)

când R= -CH₃, R₁= -C₆H₃Cl₂(2,4)

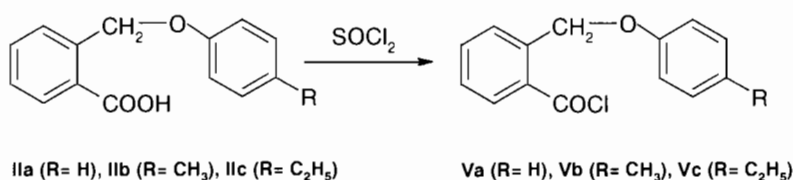
când R= -C₂H₅, R₁= -C₆H₅, -C₆H₄F(4), -C₆H₃Cl₂(2,4)

Procedul de obținere a derivaților O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinici (**I**) definiți ca mai sus, cuprinde următoarele etape:

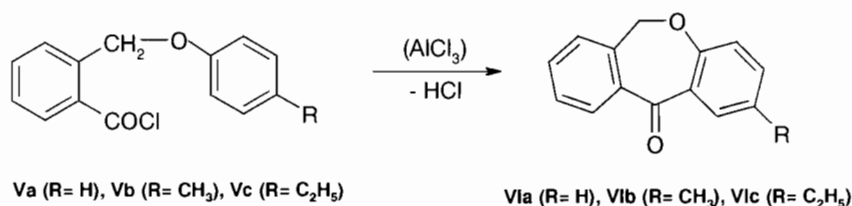
a. prepararea acidului 2-fenoximetilbenzoic (**IIa**), a acidului 2-(4-metilfenoximetil)benzoic (**IIb**) sau a acidului 2-(4-etilfenoximetil)benzoic (**IIc**) prin reacția ftalidei (**III**) cu fenoxidul de potasiu, p-crezolatul de potasiu, respectiv p-etilfenoxidul de potasiu, într-un raport molar de 1:1, în mediu de xilen și precipitarea acestor acizi din soluția sării corespunzătoare de potasiu (**IVa**, **IVb**, respectiv **IVc**), cu o soluție diluată de acid clorhidric, la pH 3. Fenoxizii de potasiu menționați se obțin prin reacția fenolilor corespunzători cu hidroxidul de potasiu într-un raport molar de 0,9 : 1, în mediu de xilen, iar apa rezultată din sistem se îndepărtează prin distilare azeotropă:



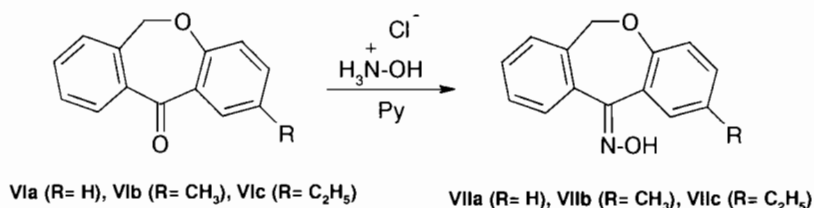
b. prepararea clorurii acidului 2-fenoximetilbenzoic (**Va**), a clorurii acidului 2-(4-metilfenoximetil)benzoic (**Vb**), respectiv a clorurii acidului 2-(4-etilfenoximetil)benzoic (**Vc**), prin refluxarea acizilor corespunzători (**IIa**, **IIb**, **IIc**) (solubilizați în prealabil în 1,2-dicloroetan anhidru) cu clorură de tionil la un raport molar de 1 : 2,1. Timpul de refluxare este de 3 ore, iar după expirarea acestuia, amestecul de 1,2-dicloroetan și clorură de tionil nereacționată se elimină prin distilare la presiune scăzută:



c. prepararea 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (**VIa**), a 2-metil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (**VIb**), respectiv a 2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (**VIc**) prin ciclizarea Friedel- Crafts a clorurilor acizilor menționate (**Va**, **Vb**, **Vc**), în prezența clorurii de aluminiu anhidre, într-un raport molar de 1 : 1, folosind ca mediu de reacție 1,2-dicloroetanul anhidru:



d. prepararea 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIa**), 11-hidroximino-2-metil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIb**), respectiv a 11-hidroximino-2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIc**), prin refluxarea 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (**VIa**), a 2-metil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (**VIb**), respectiv a 2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (**VIc**) cu clorhidrat de hidroxiilamină, în raport molar de 1 : 3, mediul de reacție fiind piridina:

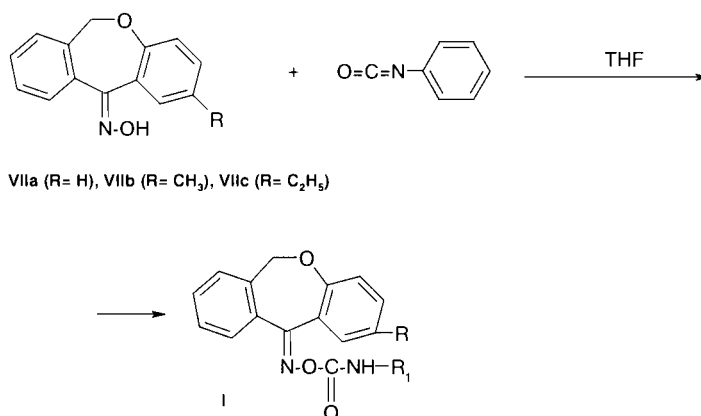


Prepararea 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei, a 11-hidroximino-2-metil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei, respectiv a 11-hidroximino-2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei este prezentată în următoarele articole:

1. Limban C., Missir A.-V., Chirita I.C., Căproiu M. T., Drăghici C., Nițulescu G.M. Novel dibenz[b,e]oxepins derivatives. *Revista de Chimie (București)*, 60(12), 2009, 1313- 1317;
2. Limban C., Missir A.-V., Chirita I.C., Nițulescu G.M., Drăghici B. Synthesis and characterization of some new 2-methyl-O-acyl-oximino-dibenz[b,e]oxepins. *Revista de Chimie (București)*, 58(2), 2007, 224- 228;

3. Derivați de O-acil-2-etil-11-oximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină, compoziție farmaceutică ce îl cuprinde și utilizarea lor; Limban C., Missir A.V., Chiriță I. C., Căproiu M. T., Chifiriuc M. C., Israil M.A., Delcaru C.; brevet RO 123055 (B1), 2010.

e. prepararea noilor O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e] oxepine (**I**) prin refluxarea 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIa**), a 2-metil-11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIb**) sau a 2-etil-11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIc**), cu arilizocianați, mediul de reacție fiind tetrahidrofuranul anhidru:



când R= H, R₁= -C₆H₄CH₃(3)(**Ia**), -C₆H₄F(4)(**Ib**), -C₆H₄Cl(3)(**Ic**), -C₆H₄Cl(4)(**Id**), -C₆H₃Cl₂(2,4)(**Ie**), -C₆H₄CF₃(3)(**If**)

când R= -CH₃, R₁= -C₆H₃Cl₂(2,4)(**Ig**)

când R= -C₂H₅, R₁= -C₆H₅(**Ih**), -C₆H₄F(4)(**Ii**), -C₆H₃Cl₂(2,4)(**Ij**)

Spectrele vibraționale de absorbție în infraroșu s-au efectuat pe un instrument Bruker Vertex 70 cu optică de diamant în tehnica ATR (*Attenuation Total Reflection*), deoarece probele analizate au fost solide, cristalizate.

Spectrele RMN s-au efectuat pe un instrument Varian Unity Inova 400, ce operează la frecvența de 400 MHz pentru proton și 100 MHz pentru carbon. Valorile deplasărilor chimice pentru hidrogen și carbon au fost precizate cu ajutorul experimentelor Apt, Gcosy, Ghmqc și Ghmbc. S-a folosit ca solvent cloroformul deuterat și ca standard intern tetrametilsilanul.

Analiza elementală s-a realizat cu un aparat Perkin Elmer CHNS/O Analyser Series II 2400.

Rezultatele obținute prin analiza spectrală și elementală confirmă structura noilor compuși conform invenției.

Temperaturile de topire au fost determinate cu un aparat Electrothermal 9100, fără corecție.

Se dau în cele ce urmează **14** exemple de realizare a invenției.

EXEMPLUL 1**Sinteza O-(3-tolil-carbamoil)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Ia)**

Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent cu tub de clorură de calciu, se solubilizează 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepina (0,01 moli; $M_r = 225,24$) în 4 mL tetrahidrofuran (THF) anhidru. Se adaugă o soluție de 3-tolilizocianat (0,01 moli; $M_r = 133,15$) în 1 mL tetrahidrofuran anhidru și amestecul de reacție se refluxează 55 ore. După răcire și filtrare, solventul se îndepărtează prin distilare la presiune scăzută și reziduul obținut se purifică din acetat de etil, în prezența cărbunelui animal.

Rezultă 2,72 g compus ($M_r = 358,38$) (randament 76% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 131,6- 132,9 °C, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

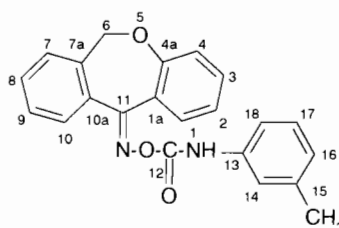
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (solid în ATR, ν cm^{-1}): 3262m (ν NH); 3149w; 3068w ($\nu =CH$); 2982w (ν CH_2 asim.); 2869w (ν CH_2 sim.); 1730s (ν C=O); 1599s (ν C=N); 1558vs; 1529s; 1483m (δ CH_2 asim.); 1442m; 1333w; 1301s (δ CH_2 sim.); 1218vs (ν C-O-C asim.); 1158m; 1108w; 1021s (ν C-O-C sim.); 975vs (ν N-O); 942m; 903m; 801w; 774m; 751s; 691m; 635m; 583w; 514w; 442w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



1H -RMN ($CDCl_3$, δ ppm): 8.26 (sl, NH^M); 8.20 (br s, NH^m); 7.74 (dd, $J = 1.7$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-10); 6.91- 7.60 (m, 11H, H-arom); 5.23 (s, H-6 M); 5.17 (s, H-6 m); 2.36 (s, CH_3^m) 2.30 (s, CH_3^M).

^{13}C -RMN ($CDCl_3$, δ ppm): 160.78 (C-12); 157.54 (C-11); 151.86 (C-4a); 138.10 (C-13); 136.78 (C-7a); 133.96 (C-17); 132.73 (C-3); 132.42 (C-10a); 130.59 (C-8); 130.36 (C-1); 129.98 (C-15); 128.95 (C-9); 128.44 (C-7); 128.35 (C-10); 121.36 (C-2); 120.35 (C-16); 119.82 (C-1a); 119.62(C-18); 117.45 (C-4); 116.85 (C-14); 70.64 (C-6 m); 70.56 (C-6 M); 21.48 (CH_3^M); 21.05 (CH_3^m).

În spectrul de proton sunt prezente semnalele celor doi diastereoizomeri *sin* și *anti*. Din acest motiv s-a adăugat asteriscul ^M sau ^m care desemnează cei doi izomeri *Major* și *minor*.

În spectrul de carbon se regăsește de asemenea o dedublare a semnalelor.

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
73.73	73.41	5.06	5.14	7.82	7.82

EXEMPLUL 2

Sinteza O-(4-fluorofenil-carbamoil)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Ib)



Compusul se prepară prin metoda menționată anterior, fiind necesare: 0,01 moli 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r = 225,24$), 0,01 moli 4-fluorofenilizocianat ($M_r = 137,11$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, timp de refluxare 55 ore, acetat de etil și cărbune pentru purificare.

Rezultă 2,6 g compus ($M_r = 362,35$) (randament 72% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 189,5- 193,1 °C, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

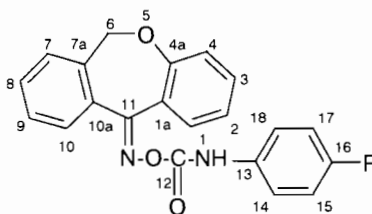
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (solid în ATR, ν cm^{-1}): 3268m; 3080w; 2930w; 2875w; 1740vs; 1601m; 1480w; 1464w; 1441m; 1423m; 1325s; 1305m; 1269m; 1250s; 1210s; 1161s; 1147s; 1133m; 1108w; 1077s; 1051m; 1006w; 981m; 846m; 752s; 731w; 707w; 675w; 631w; 548w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



^1H -RMN (CDCl_3 , δ ppm): 8.30 (br s, 1H, NH); 7.73 (dd, $J= 1.7$ Hz, $J= 7.9$ Hz, 1H, H-10); 7.35-7.62 (m, 6H, H-1, H-2, H-3, H-7, H-8, H-9); 7.06 (m, H-14, H-18); 7.04 (t, $J= 8.5$ Hz, 2H, H-15, H-17); 6.94 (dd, $J= 1.3$ Hz, $J= 8.4$ Hz, 1H, H-4); 5.16 (s, H-6^M); 5.22 (s H-6^m)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ ppm): 159.02 ($J= 243.4$ Hz, C-16); 157.52 (C-12); 156.2 (C-11); 152.04 (C-4a); 133.85 (C-13); 132.75 (C-3); 132.37 (C-7a); 130.95 (C-10a); 130.61 (C-8); 130.28 (C-1); 129.22 (C-9); 128.92 (C-7); 128.35 (C-10); 121.5 (C-14, C-18); 121.32 (C-2), 120.28 (C-4); 119.49 (C-1a); 115.78 ($J= 22.8$ Hz, C-15, C-17); 70.51 (C-6^M); 70.29 (C-6^m)

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
69.60	69.41	4.17	4.17	7.73	7.70

EXEMPLUL 3

Sinteza O-(3-clorofenil-carbamoil)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Ic)



Sinteza urmează modul de lucru descris, utilizându-se 0,01 moli 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r= 225,24$), 0,01 moli 3-clorofenilizocianat ($M_r= 153,57$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, acetat de etil și cărbune pentru purificare. Timpul de refluxare a fost de 55 ore.

Rezultă 2,54 g compus ($M_r 378,81$) (randament 67% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 175,3- 178,4 °C, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

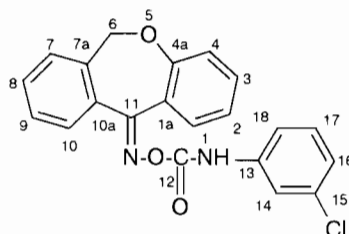
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (solid în ATR, ν cm^{-1}): 3271m; 3081w; 3001w; 2932w; 2900w; 2885w; 1740vs; 1592m; 1481s; 1461m; 1375w; 1342w; 1310m; 1283m; 1246vs; 1231s; 1216s; 1173m; 1155m; 1089m; 1065s; 1020s; 997vs; 919m; 8852w; 859m; 821m; 763m; 746s; 694w; 671w; 656w; 552w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm): 8.37 (br s, 1H, NH); 7.72 (dd, $J= 1.9$ Hz, $J= 8.0$ Hz, 1H, H-10); 7.58 (t, $J= 1.9$ Hz, 1H, H-14); 7.30- 7.48 (m, 6H, H-1, H-2, H-3, H-7, H-8, H-9); 7.25 (t, $J= 7.8$ Hz, 1H, H-17); 6.94- 7.15 (m, 2H, H-16, H-18); 6.92 (dd, $J= 1.3$ Hz, $J= 8.4$ Hz, 1H, H-4); 5.12 (s, H-6^M); 5.20 (s H-6^m)

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm): 161.25 (C-12); 157.52 (C-11); 151.57 (C-4a); 138.16 (C-13); 134.74 (C-7a); 134.40 (C-15); 132.82 (C-16); 132.40 (C-10a); 130.65 (C-3); 130.32 (C-1); 130.09 (C-8); 129.24 (C-14); 128.88 (C-9); 128.36 (C-7); 127.95 (C-10); 126.91 (C-17); 121.62 (C-2); 119.66 (C-18); 119.42 (C-1a); 117.63 (C-4); 70.49 (C-6^M); 70.29 (C-6^m)

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
66.58	66.43	3.99	3.91	7.39	7.28

EXEMPLUL 4**Sinteza O-(4-clorofenil-carbamoil)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Id)**

Se lucrează ca în cazurile precedente, cu 0,01 moli 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r= 225,24$), 0,01 moli 4-clorofenilizocianat ($M_r= 153,57$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, acetat de etil și cărbune pentru purificare. Timpul de refluxare a fost de 55 ore.

Rezultă 2,43 g compus ($M_r 378,81$) (randament 64% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 165,2- 167,4 $^{\circ}\text{C}$, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

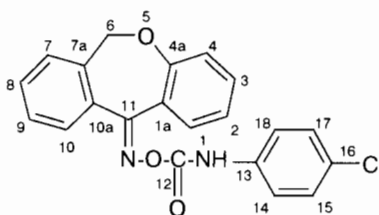
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (solid în ATR, ν cm^{-1}): 3259s; 3193w; 3124w; 3069w; 2963w; 2904w; 2862w; 1733s; 1631m; 1598s; 1542vs; 1488vs; 1441m; 1399m; 1333w; 1306m; 1257m; 1208vs; 1155w; 1086s; 1045m; 1016vs; 974vs; 922w; 853w; 797s; 774m; 752m; 634m; 504m; 450w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



^1H -RMN (CDCl_3 , δ ppm): 8.30 (br s, 1H, HN); 7.71 (dd, $J=1.6$ Hz, $J=7.7$ Hz, 1H, H-10); 7.46 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-15, H-19); 7.31(d, $J=8.8$ Hz, 2H, H-16, H-18); 7.28- 7.50 (m, 5H, H-1, H-2, H-3, H-7, H-9); 7.01 (td, $J=1.4$ Hz, $J=8.9$ Hz, 1H, H-8); 6.95 (dd, $J=1.0$ Hz, $J=8.5$ Hz, 1H, H-4); 5.17 (s, 2H, H-6).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ ppm): 161.18 (C-12); 157.58 (C-11); 151.71 (C-4a); 135.50 (C-13); 133.86 (C-7a); 132.85 (C-3); 132.42 (C-10a); 130.96 (C-16); 130.69 (C-8); 130.31 (C-1); 129.19 (C-14, C-18); 129.12 (C-9); 128.98 (C-7); 128.40 (CH-15, CH-17); 126.93 (C-10); 121.39 (C-2); 120.93 (C-1a); 120.35 (C-4); 70.56 (C-6).

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
66.58	66.24	3.99	4.14	7.40	7.47

EXEMPLUL 5

Sinteza O-(2,4-diclorofenil-carbamoi)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Ie)



Se lucrează ca în cazurile precedente, cu 0,01 moli 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r=225,24$), 0,01 moli 2,4-diclorofenilizocianat ($M_r=188,01$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, acetat de etil și cărbune pentru purificare. Timpul de refluxare a fost de 50 ore.

Rezultă 2,23 g compus (M_r 413,25) (randament 54% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 181,2- 183,3 °C, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

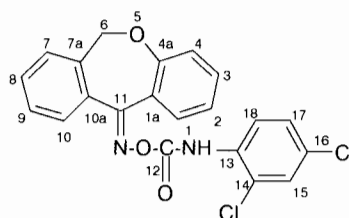
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (solid în ATR, ν cm^{-1}): 3262m; 3072w; 2961m; 2930w; 2871w; 1746vs; 1604s; 1569m; 1477m; 1475w; 1439s; 1330m; 1305s; 1235vs; 1209s; 1181s; 1153m; 1112w; 1065vs; 1044vs; 1007s; 976vs; 889s; 851m; 797w; 744s; 695m; 630m; 547w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



^1H -RMN (CDCl_3 , δ ppm): 9.25 (s, 1H, NH); 8.24 (d, $J= 8.8$ Hz, 1H, H-18); 7.76 (dd, $J= 1.8$ Hz, $J= 7.9$ Hz, 1H, H-1); 7.59 (m, 1H, H-10); 7.41 (d, $J= 2.4$ Hz, 1H, H-15); 7.30- 7.52 (m, 4H, H-2, H-7, H-8, H-9); 7.26 (dd, $J= 2.4$ Hz, $J= 8.8$ Hz, 1H, H-17); 7.03 (td, $J= 1.2$ Hz, $J= 8.4$ Hz, 1H, H-3); 6.94 (dd, $J= 1.2$ Hz, $J= 8.4$ Hz, 1H, H-4); 5.17 (s, H-6)

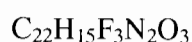
^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ ppm): 161.34 (C-12); 157.90 (C-11); 151.35 (C-4a); 133.78 (C-13); 133.61 (C-7a); 132.79 (C-3); 130.72 (C-1); 130.65 (C-8); 130.12 (C-15); 129.21 (C-10a); 128.37 (C-9); 128.27 (C-7); 128.1 (C-10); 127.89 (C-17); 126.95 (C-16); 121.48 (C-14); 121.43 (C-2); 120.57 (C-18); 120.45 (C-4); 119.61 (C-1a); 70.70 (C-6)

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
61.03	61.31	3.41	3.45	6.78	6.69

EXEMPLUL 6

Sinteza O-(3-trifluorometilfenil-carbamoil)oximei 6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (If)



Se lucrează ca în cazurile precedente, cu 0,01 moli 11-hidroximino-6,11-dihydro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r= 225,24$), 0,01 moli 4-trifluorometilfenilizocianat ($M_r= 187,12$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, acetat de etil și cărbune pentru purificare. Timpul de refluxare a fost de 55 ore.

Rezultă 3,25 g compus ($M_r 412,36$) (randament 79% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 164,2- 165,8 °C, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

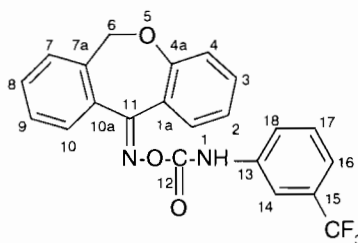
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (solid în ATR, $\nu \text{ cm}^{-1}$): 3267m; 3162w; 3105; 2964w; 2869w; 1740s; 1618m; 1564vs; 1492m; 1442m; 1335vs; 1310s; 1246m; 1204vs; 1161s; 1068s; 1023s; 982vs; 924w; 884s; 796m; 775m; 752m; 693m; 516w; 439w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm): 8.43 (br s, HN^{M}); 8.39 (br s, HN^{m}); 7.33- 7.80 (m, 10H, H-arom); 7.06 (ddd, $J= 1.2 \text{ Hz}$, $J= 7.2 \text{ Hz}$, $J= 8.4 \text{ Hz}$, 1H, H-2); 6.93 (dd, $J= 1.2 \text{ Hz}$, $J= 8.4 \text{ Hz}$, 1H, H-4); 5.22 (s, H-6^m); 5.17(s, H-6^M).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm): 161.54 (C-12); 157.60 (C-11); 151.70 (C-4a); 137.56 (C-13); 136.78 (C-7a); 133.80 (C-15); 132.93 (C-3); 132.43 (C-10a); 130.75 (C-8); 130.32 (C-1); 129.77 (C-17); 129.31 (C-9); 128.67 (C-7); 128.43 (C-10); 122.74 (CF_3); 121.43 (C-2); 121.24 (C-18); 120.91 (C-16); 120.37 (C-4); 119.40 (C-1a); 116.38 (C-14); 70.54 (C-6).

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
64.08	63.77	3.67	3.79	6.80	6.69

EXEMPLUL 7

Sinteza *O*-(2,4-diclorofenil-carbamoil)oximei 2-metil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Ig)



Se lucrează ca în cazurile precedente, cu 0,01 moli 11-hidroximino-2-metil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r = 239,26$), 0,01 moli 2,4-diclorofenilizocianat ($M_r = 188,01$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, acetat de etil și cărbune pentru purificare, timpul de refluxare fiind de 46 ore.

Rezultă 2,52 g compus ($M_r 427,28$) (randament 59% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 150,4- 152,7 °C, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

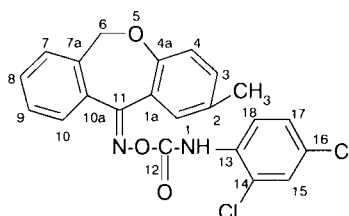
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (solid în ATR, $\nu \text{ cm}^{-1}$): 3271m; 3142w; 3089w; 3063w; 2964w; 2918w; 2869w; 1754vs; 1618w; 1565vs; 1491m; 1335s; 1310s; 1226s; 1161s; 1020s; 982vs; 775m; 752m; 742m; 516w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 9.22 (s, 1H, NH); 8.23 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-18); 7.58 (m, 2H, H-1, H-10); 7.42- 7.51 (m, 3H, H-7, H-8, H-9); 7.42 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-15); 7.29 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-17); 7.19 (dd, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-3); 6.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4); 5.14 (s, H-6); 2.33 (s, 3H, CH_3)

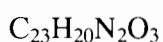
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 160.98 (C-12); 155.71 (C-11); 151.39 (C-4a); 133.73 (C-13); 133.41 (C-3); 132.87 (C-10a); 132.77 (C-2); 133.7 (C-7a); 130.76 (C-8); 130.69 (C-15); 130.04 (C-1); 128.98 (C-9); 128.83 (C-7); 128.4 (C-10); 128.35 (C-17); 128.08 (C-16); 123.52 (C-14); 121.11 (C-18); 120.18 (C-4); 118.86 (C-1a); 70.62 (C-6); 20.3 (CH_3)

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
61.83	61.97	3.77	3.69	6.55	6.49

EXEMPLUL 8

Sinteza O-(fenil-carbamoil)oximei 2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Ih)



Se lucrează ca în cazurile precedente, cu 0,01 moli 11-hidroximo-2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r = 253,31$), 0,01 moli fenilizocianat ($M_r = 119,12$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, acetat de etil și cărbune pentru purificare, timpul de refluxare fiind de 80 ore.

Rezultă 2,64 g compus ($M_r 372,42$) (randament 71% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 173,7- 175,9 °C, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

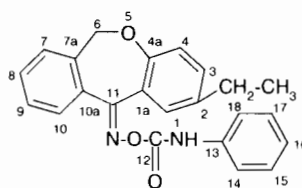
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (ATR în solid, $\nu \text{ cm}^{-1}$): 3269m; 3198w; 3137w; 3081w; 2967w; 2932w; 2878w; 1728vs; 1601s; 1574vs; 1545s; 1499s; 1488s; 1415m; 1376w; 1326m; 1315s; 1302m; 1249m; 1204vs; 1196vs; 1151m; 1015m; 991s; 968s; 929m; 829w; 807m; 755s; 694m; 655m; 507w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 8.22 (br s, 1H, NH); 7.59 (m, 1H, H-10); 7.53 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-1); 7.50 (dd, $J = 1.3$ Hz, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-14, H-18); 7.49- 7.39 (m, 3H, H-7, H-8, H-9); 7.35 (dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-15, H-17); 7.21 (dd, $J = 2.4$, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-3); 7.12 (tt, $J = 1.3$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-16,); 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4); 5.14 (s, 2H, H-6); 2.65 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.26 (t, $J = 7.6$, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , δ ppm): 161.21 (C-12); 155.64 (C-11); 151.85 (C-4a); 137.20 (C-13); 137.04 (C-7a); 134.06 (C-2); 132.56 (C-10a); 132.48 (C-3); 130.51 (C-8); 129.17 (C-15, C-17); 129.09 (C-1); 128.86 (C-10); 128.42 (C-9); 128.34 (C-7); 124.36 (C-16); 120.22 (C-4); 119.76 (C-14, C-18); 119.26 (C-1a); 70.55 (C-6); 27.85 ($\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 15.65 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_3}$)

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
74.18	74.34	5.41	5.32	7.52	7.38

EXEMPLUL 9

Sinteza O-(4-fluorofenil-carbamoil)oximei 2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Ii)

$\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{FN}_2\text{O}_3$

Se lucrează ca în cazurile precedente, cu 0,01 moli 11-hidroximino-2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r = 253,31$), 0,01 moli 4-fluorofenilizocianat ($M_r = 137,11$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, acetat de etil și cărbune pentru purificare, timpul de refluxare fiind de 80 ore.

Rezultă 2,85 g compus ($M_r 390,4$) (randament 73% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 178,2- 181 $^{\circ}\text{C}$, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

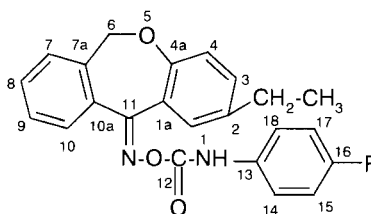
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (solid în ATR, $\nu \text{ cm}^{-1}$): 3303m; 3077w; 2959w; 2931w; 2878w; 1731s; 1612m; 1521vs; 1456m; 1407m; 1376vs; 1303s; 1251m; 1191vs; 1156s; 1126s; 1102s; 999s; 957w; 920w; 874s; 836w; 812w; 769m; 698m; 641w; 619w; 551w; 519w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 8.24 (br s, HN); 7.58 (m, 1H, H-10); 7.52 (d, $J= 2.4$ Hz, 1H, H-1); 7.45- 7.35 (m, 3H, H-7, H-8, H-9); 7.22 (dd, $J= 2.3$, $J= 8.6$ Hz, 1H, H-3); 7.06 (m, 2H, H-14, H-18); 7.04 (t, $J= 8.5$ Hz, 2H, H-15, H-17); 6.86 (d, $J= 8.4$ Hz, 1H, H-4); 5.13 (s, 2H, H-6); 2.64 (q, $J= 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.25 (t, $J= 7.6$, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 161.4 (C-16); 160.79 (C-12); 158.36 (C-11); 155.62 (C-4a); 152.11 (C-13); 137.19 (C-7a); 133.99 (C-2); 132.54 (C-3); 132.51 (C-10a); 130.55 (C-1); 129.06 (C-8); 128.86 (C-9); 128.37 (C-7); 128.35 (C-10); 121.61 (C-14, C-18); 120.25 (C-4); 119.16 (C-1a); 115.89 (C-15, C-17); 70.52 (C-6); 27.84 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 15.67 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$)

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
70.76	70.51	4.91	4.87	7.18	7.17

EXEMPLUL 10

Sinteza O-(2,4-diclorofenil-carbamoil) oximei 2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (Ij)



Se lucrează ca în cazurile precedente, cu 0,01 moli 11-hidroximino-2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepină ($M_r= 253,31$), 0,01 moli 2,4-diclorofenilizocianat ($M_r= 188,01$), THF anhidru pentru solubilizarea reactanților, acetat de etil și cărbune pentru purificare, timpul de refluxare fiind de 80 ore.

Rezultă 3,04 g compus (M_r 441,3) (randament 69% față de oximă), cristalizat, alb, cu T.t. 192- 194,1 $^{\circ}\text{C}$, solubil la rece în acetonă și cloroform și la cald în alcoolii inferiori, benzen, toluen, xilen, acetat de etil, dimetilsulfoxid, insolubil în apă.

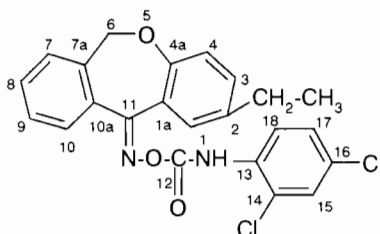
Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza IR

FT-IR (ATR în solid, ν cm^{-1}): 3340m; 3110w; 2965w; 2931w; 2870w; 1756vs; 1618s; 1594vs; 1574w; 1503s; 1460s; 1412m; 1381w; 1315s; 1298m; 1249m; 1219vs; 1179vs; 1148m; 1126w; 1099m; 1057w; 1007w; 992s; 958s; 909m; 884w; 864w; 836w; 820m; 789w; 767s; 741w; 635m; 617m; 576w.

w – bandă slabă; m – bandă medie; s – bandă intensă; vs – bandă foarte intensă.

Analiza RMN



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 9.27 (s, 1H, NH); 8.26 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-18); 7.59 (m, 1H, H-10); 7.53 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-1); 7.47- 7.41 (m, 3H, H-7, H-8, H-9); 7.41 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-15); 7.29 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-17); 7.21 (dd, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-3); 6.85 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-4); 5.14 (s, 2H, H-6); 2.63 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1.25 (t, $J = 7.6$, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 161.12 (C-12); 155.95 (C-11); 151.44 (C-4a); 137.30 (C-13); 133.51 (C-7a); 132.97 (C-2); 132.85 (C-10a); 132.74 (C-3); 130.74 (C-1); 129.03 (C-16); 128.90 (C-8); 128.87 (C-9); 128.52 (C-7); 128.38 (C-10); 128.15 (C-17); 123.52 (C-14); 121.10 (C-18); 120.32 (C-4); 119.0 (C-1a); 70.7 (C-6); 27.92 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 15.67 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$)

Analiza elementală:

C%		H%		N%	
teoretic	experimental	teoretic	experimental	teoretic	experimental
62.59	62.78	4.11	4.02	6.35	6.39

EXEMPLUL 11

Studiul bioinformatic al compușilor Ia- Ij

Studiul biofarmaceutic *in silico* permite anticiparea anumitor proprietăți ale moleculelor studiate, utilizând o vastă bază de date ce cuprinde caracteristici ADMET ale compușilor chimici deja studiați.

Caracterizarea biofarmaceutică a noilor compuși sintetizați s-a realizat *in silico* cu ajutorul metodelor computerizate de predicție.

Modelarea moleculară a compușilor

Seria de molecule **Ia- Ij** a fost modelată în soft-ul Discovery Studio (Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016), pornind de la compusul template doxepina. Aceasta a constat în modelarea structurilor 2D, cu adăugarea substituenților specifici și adăugarea valențelor maxime. Structurile au fost obținute, în final, în spațiul 3D și salvate sub forma fișierelor .mol.

Minimizarea energetică

Minimizarea acestor molecule s-a făcut utilizând metoda Hamiltonian: Forcefield MMFF94x, la un gradient de 0,05. După calcularea energiei minime, s-au aplicat sarcinile parțiale Gasteiger (PEOE).

Determinarea caracterului drug-like și a biodisponibilității pentru compușii Ia- Ij.

O primă etapă în stabilirea caracterului farmacologic al compușilor nou sintetizați este ca structura acestora să respecte cel puțin două reguli- regula Lipinski și regula Veber [Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. J. Med. Chem.,45 (12), 2002, 2615–2623].

Caracterul drug-like al acestor molecule a fost determinat aplicând regula lui Lipinski, iar biodisponibilitatea compușilor **Ia- Ij** a fost testată cu ajutorul regulii lui Veber. Regula Lipinski menționează că, pentru a avea o posibilă acțiune medicamentoasă, un compus trebuie să respecte cel puțin 3 dintre următoarele caracteristici: o masă moleculară mai mică de 500 g/ mol, coeficientul de partiție dintre apă și octanol (LogP (o/w)) mai mic de 5, numărul de legături de hidrogen donoare de maxim 5, numărul de legături de hidrogen acceptoare de maxim 10. Regula Veber menționează că un compus cu o bună biodisponibilitate trebuie să aibă maxim 10 legături rotabile, iar suprafața polară totală trebuie să fie de maxim 140 Å².

Identificarea profilului farmacocinetic al compușilor Ia- Ij

În ceea ce privește predicția Absorbției, Distribuției, Metabolizării, Excreției și Toxicității (ADMET) compușilor **Ia- Ij**, am utilizat platforma pkCSM [Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. Journal of Medicinal Chemistry, 58 (9), 2015, 4066- 4072], iar în ceea ce privește toxicitatea acestora, am comparat predicțiile din platforma pkCSM cu cele prezise în platforma .admetSAR [Feixiong Cheng, Weihua Li, Yadi Zhou, Jie Shen, Zengrui Wu, Guixia Liu, Philip W. Lee, Yun Tang. admetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. J. Chem. Inf. Model., 52(11), 2012, 3099- 3105].

Din seria de proprietăți ADMET oferite de aceste baze de date, am selectat pentru compușii **Ia- Ij**: 1. absorbția intestinală, 2. permeabilitatea la nivelul barierei hematoencefalice (BBB), 3. permeabilitatea la nivelul sistemului nervos central (CNS), 4. toxicitatea AMES, 5. doza maximă tolerată la om, capacitatea de a inhiba gena human ether-a-go-go (hERG I și hERG II), 6. doza letală 50 (șobolan) (LD50), 7. hepatotoxicitatea, 8. toxicitatea asupra protozoarului ciliat *Tetrahymena pyriformis* și toxicitatea Minnow și 9. capacitatea substanței de a da efecte cancerigene.

REZULTATE

Regula Lipinski și regula Veber

În ceea ce privește respectarea regulii Lipinski, toate moleculele respectă această regulă. Moleculele **Ie**, **Ig** și **Ij**, prezintă o încălcare a regulii Lipinski, din cauză că $\log P(o/w)$ este mai mare decât 5 și, deoarece respectă 3 din cele 4 reguli, putem spune că acești compuși respectă regula lui Lipinski (Tabelul 1).

Toate moleculele testate (**Ia- Ij**), prezintă o bună biodisponibilitate, conform regulii Veber (Tabelul 1).

Tabelul 1. Validarea regulii Lipinski și a regulii Veber pentru moleculele **Ia- Ij**

Molecula	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	Ig	Ih	Ii	Ij
Regula										
Lipinski	Da	Da	Da	Da	Da (o încălcare)	Da	Da (o încălcare)	Da	Da	Da (o încălcare)
Veber	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da

Predicții ADMET

Predicțiile ADMET sugerează că, în ceea ce privește absorbția intestinală, toate moleculele prezintă o bună absorbție. Valorile sunt prezise numeric, iar o valoare a absorbției intestinale mai mare de 30% a unei molecule, reprezintă o bună absorbție a acesteia la nivelul intestinului subțire [Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. Journal of Medicinal Chemistry, 58 (9), 2015, 4066- 4072] (Tabelul 2).

Permeabilitatea unui compus pentru linia celulară Caco2, ne ajută să prezicem dacă acest compus este absorbit când este administrat pe cale orală. O permeabilitate mai mare de 0,9 este considerată o permeabilitate ridicată. Toate moleculele testate prezintă o bună permeabilitate a liniei celulare Caco2, prin urmare o bună absorbție [Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. Journal of Medicinal Chemistry, 58 (9), 2015, 4066- 4072], (Tabelul 2).

Moleculele **Ia- Ij** prezintă o permeabilitate a barierei hematoencefalice medie. În ceea ce privește permeabilitatea la nivelul sistemului nervos central, moleculele **Ia- Ij** au o bună permeabilitate a acestuia (Tabelul 2).

Tabelul 2. Predicția absorbției intestinale, permeabilității Caco2, BBB și CNS pentru **Ia- Ij**

Molecula	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	Ig	Ih	Ii	Ij	Unitate de măsură
Descriptor											
Absorbția intestinală	92,1	92,7	92,3	91,8	89,7	90,9	89,9	90,9	92,2	89,2	% Absorbit
Permeabilitatea Caco-2 pkCSM	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,4	1,0	0,9	log Papp in ¹⁰⁻⁶ cm/s
Permeabilitatea Caco-2 admetSAR	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,3	1,4	1,5	LogPapp, cm/s
Permeabilitatea BBB	0,2	-0,0	-0,1	-0,0	0,0	-0,1	-0,3	0,2	-0,3	-0,2	log BB
Permeabilitatea CNS	-1,5	-1,6	-1,5	-1,5	-1,3	-1,4	-1,2	-1,5	-1,6	-1,3	log PS

Toxicitatea AMES prezice potențialul mutagen al unui compus, testul pozitiv indicând un compus mutagen [Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58 (9), 2015, 4066- 4072]. Conform bazei de date pkCSM doar compusul **Ia** are potențial mutagen. Predicțiile din baza de date admetSAR, ne arată că toți compușii testați prezintă potențial mutagen (Tabelul 3).

Doza maximă tolerată prezisă pentru om este considerată mică pentru toate moleculele testate (Tabelul 3).

Inhibarea canalelor de potasiu codificate de gena hERG, reprezintă principala cauză a dezvoltării sindromului de prelungire a intervalului QT pe electrocardiogramă. Predicțiile din baza de date pkCSM, sugerează faptul că toate moleculele inhibă hERG II, iar cele din baza de date admetSAR sugerează faptul că toate moleculele au activitate inhibitorie slabă asupra hERG I. Conform acestor predicții putem afirma că moleculele **Ia- Ij** ar putea acționa prin blocarea canalelor de potasiu codificate de gena hERG (Tabelul 3).

LD50 reprezintă doza letală la care mor 50% din șobolanii testați. În Tabelul 3 sunt prezentate valorile LD50 pentru moleculele **Ia- Ij**, calculate în baza de date pkCSM și în baza de date admetSAR.

LOAEL, doza cea mai mică la care se observă apariția unui efect advers, este prezentată în Tabelul 3.

În ceea ce privește hepatotoxicitatea, predicțiile sugerează faptul că moleculele **Ia, Ic, Id** și **Ih** nu prezintă hepatotoxicitate (Tabelul 3).

În ceea ce privește toxicitatea asupra protozoarului *T. pyriformis*, ambele baze de date sugerează că moleculele **Ia- Ij** prezintă toxicitate asupra acestui microorganism.

Peștele Fathead Minnow este considerat un indice de toxicitate, iar rezultatele arată că moleculele **Ia** și **Ih** prezintă toxicitate Minnow (pkCSM).

În ceea ce privește efectul cancerigen al moleculelor **Ia- Ij**, predicțiile sugerează că moleculele nu prezintă efecte cancerigene.

Tabelul 3. Descriptorii pentru toxicitate prezisi pentru moleculele **Ia- Ij**

Molecula	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	Ig	Ih	Ii	Ij	Unitate de măsură
Descriptor											
Tox. AMES pkCSM	Da	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	DA/NU
Tox. AMES admetSAR	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	DA/NU
DMT(om)	0,14	0,04	0,07	0,08	-0,28	0,05	-0,32	0,28	0,01	-0,21	log mg/kg/zi
I. hERGI pkCSM	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	DA/NU
I. hERGII pkCSM	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	DA/NU
I. hERGI admetSAR	slab	slab	slab	slab	slab	slab	slab	slab	slab	slab	Da/slab/Nu
I. hERGII admetSAR	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Da/slab/Nu
LD50 pkCSM	2,4	2,3	2,4	2,3	2,4	2,5	2,4	2,3	2,4	2,4	mol/kg
LD50 admetSAR	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,7	2,5	2,5	2,5	2,5	mol/kg
LOAEL	1,1	0,9	0,9	0,8	0,6	0,6	0,5	0,9	0,7	0,4	log mg/kg_bw/zi
Hepatotoxicitate	Nu	Da	Nu	Nu	Da	Da	Da	Nu	Da	Da	DA/NU
Tox. <i>T. pyriformis</i> pkCSM	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	log µg/L
Tox. <i>T. pyriformis</i> admetSAR	0,7	0,9	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	0,8	0,9	1,1	log µg/L
Tox. Minnow pkCSM	-0,9	0,8	0,1	0,5	0,1	0,3	-0,2	-0,9	0,7	-0,1	log mM
Tox. Minnow admetSAR	0,7	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,8	0,9	0,6	log mg/L
Efecte cancerigene	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	pericol/avertisment/nu

Tox- toxicitate, I- inhibitor, DMT- doza maximă tolerată

În concluzie, valorile estimate pentru compușii sintetizați sugerează un profil farmacocinetic optim, cu un caracter lipofil mediu, ce permite atât traversarea membranelor celulare, cât și absorbția la nivel digestiv. Conform rezultatelor obținute, compusul **Ia** are potențial mutagen. Doza maximă tolerată prezisă pentru om este considerată mică pentru toate moleculele testate. Noile molecule ar putea acționa prin blocarea canalelor de potasiu codificate de gena hERG. Compușii analizați au un potențial toxic, dar niciunul dintre aceștia nu a prezentat toxicitate în toate testele de determinare a toxicității. Predicțiile sugerează că moleculele studiate nu prezintă efecte cancerigene.

EXEMPLUL 12

Evaluarea in vivo a toxicității acute

Toxicitatea acută după administrare orală, a fost determinată la șoareci prin metoda “up & down”, conform Ghidurilor Europene în vigoare privind etica cercetării experimentale pe animale de laborator. Această metodă permite estimarea unui interval de siguranță în care se află DL50, fără a mai fi neapărat necesară determinarea cu exactitate a valorii acestui parametru. Limitele intervalului respectiv permit încadrarea substanței într-o anumită clasă de toxicitate după administrare orală, în acord cu Sistemul Global Armonizat de clasificare a substanțelor cu potențial de toxicitate. Aceste ghiduri specifică faptul că substanțele chimice pentru care se presupune o toxicitate foarte redusă pot fi testate folosind un test limită la doza de 2000 mg/ kg [Organization for Economic Co-operation and Development. Guidelines for testing of chemicals - OECD 425/2008].

Pentru determinarea toxicității acute a doi dintre noii compuși sintetizați, O-(4-fluorofenil-carbamoil)oxima 2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (**II**) și O-(2,4-diclorofenil-carbamoil)oxima 2-etil-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepin-11(6H)onei (**Ij**), compuși care conform rezultatelor testelor predictive au un potențial toxic crescut, au fost utilizați cincisprezece șoareci. Șoarecii cu greutate de 25 ± 3 g au fost furnizați de către biobaza Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila” București. Animalele au fost cazate în cuști de plexiglas cu așternut de talaș. Apa și hrana au fost furnizate ad libitum. Temperatura și umiditatea relativă au fost monitorizate continuu cu ajutorul unui higro-termometru electronic. Temperatura a fost cuprinsă între 21- 23 °C, iar umiditatea relativă a fost în general menținută între 40- 60%. Programul de iluminare a fost cel necesar pentru șoareci, și anume cicluri de 12 ore lumină/ întuneric. Înaintea administrărilor, animalele au fost ținute la post timp de 12 ore. Două loturi de câte cinci animale fiecare au primit compușii în doză de 2000 mg/ kg corp *per os*. Lotul martor a primit apă distilată *per os*, în același volum cu loturile tratate.

Au fost monitorizați timp de 14 zile următorii parametri: letalitatea, greutatea determinată din două în două zile, comportamentul motor, reacțiile la stimulii externi, apariția ptozei palpebrale, aspectul blanei și cozii.

Cercetările au fost efectuate ținând cont de prevederile Directivei 2010/63/UE, privind protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale și în alte scopuri științifice. Toate procedurile experimentale au fost aprobate de Comitetul de Etică al Facultății de Farmacie București.

Analiza statistică

Rezultatele au fost analizate cu softul GraphPad Prism 5 pentru Windows (GraphPad Software - San Diego, California, SUA, www.graphpad.com).

Datele sunt prezentate ca valori medii ale celor 5 animale/ lot \pm DS (deviația standard). Tipul de distribuție a datelor în cadrul lotului a fost stabilită cu ajutorul testului Kolmogorov-Smirnov. Testul T Student a fost utilizat pentru aprecierea semnificației statistice a rezultatelor obținute la loturile tratate față de lotul martor.

Rezultatele se consideră semnificative statistic atunci când $p < 0,05$.

Rezultate

Cercetarea toxicității acute nu a condus la vreun caz de letalitate în cazul celor doi noi compuși administrați în doză de 2000 mg/ kg corp. Am concluzionat că doza letală per os este probabil mult mai mare și din considerente bioetice nu am efectuat cercetări de toxicitate la doze mai mari.

Greutatea animalelor a fost determinată din două în două zile, timp de 14 zile. Evoluția greutății corporale a fost similară între șoarecii tratați și cei martor. Modificările de greutate au fost mici, fiind ne semnificative statistic. Valorile medii inițiale și finale ale greutății animalelor din fiecare lot sunt prezentate în tabelul 4, iar variația greutății pe parcursul experimentului este ilustrată în figura 1.

Tabelul 4. Greutatea șoarecilor (g) în prima zi și după 14 zile de la administrarea acută *per os*

Lot	Martor	Compus II	Compus Ij
Greutate (g)			
Inițial (i) \pm DS	25,0 \pm 1,22	24,8 \pm 1,79	24,8 \pm 1,48
Final (f) \pm DS	25,8 \pm 1,45	25,6 \pm 1,96	25,8 \pm 1,72
Δ (f-i)	+0,8	+0,8	+1,0
t Student		P > 0,05	P > 0,05

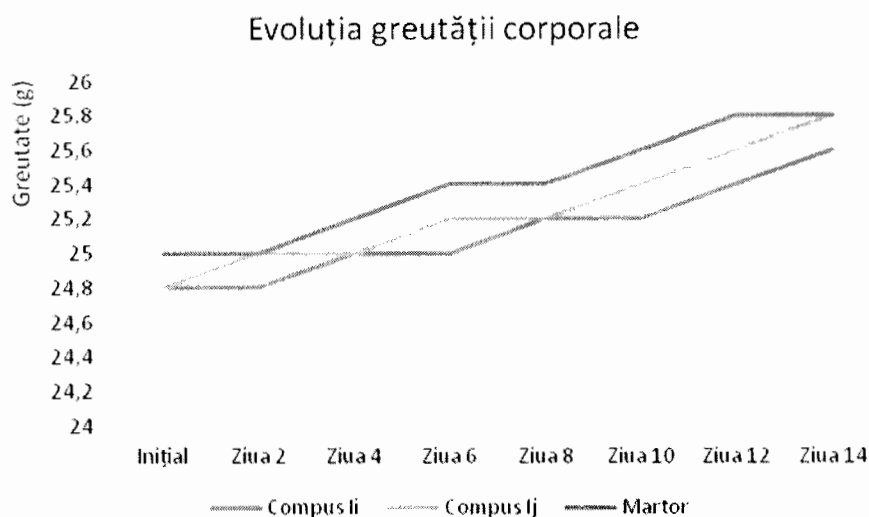


Figura 1. Evoluția greutății corporale a șoarecilor după administrare acută *per os*

În ceea ce privește ceilalți parametri monitorizați, nu s-a evidențiat nicio diferență între șoarecii tratați și lotul martor. Comportamentul motor a fost similar, răspunsul la stimulii auditivi și tactili a fost prezent. Niciun animal nu a manifestat ptoză palpebrală, iar aspectul blanei și al cozii a rămas neschimbat pe parcursul experimentului.

Concluzii

Cei doi compuși nou-sintetizați **Ii** și **Ij** au o toxicitate acută foarte redusă după administrare orală, dozele letale fiind mai mari de 2000 mg/ kg corp.

EXEMPLUL 13

Evaluarea activității antimicrobiene

Activitatea antimicrobiană a noilor carbamoiloximino-dibenz[b,e]oxepine a fost testată pe tulpini bacteriene Gram –negative (*Klebsiella pneumoniae* 1771, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), Gram-pozitive (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) și fungice (*Candida albicans* ATCC 10231), utilizând 3 abordări experimentale.

a. Screening-ul calitativ al sensibilității diferitelor tulpini bacteriene față de oxepinele nou sintetizate cu potențială acțiune antimicrobiană.

S-a realizat printr-o metodă adaptată celei difuzimetrice, și anume: pe plăcile Petri cu mediul Mueller Hinton însămânțate „în pânză” cu inocul bacterian standardizat (cu densitate corespunzătoare standardului nefelometric 0,5 MacFarland), au fost repartizate în spot, câte 10

μ L soluție stoc realizată în DMSO (10 mg/mL) din produsul de testat. Plăcile au fost lăsate în repaus la temperatura camerei pentru adsorbția picăturii de soluție în mediu, după care au fost incubate la termostat (37 °C) cu capacul în jos, timp de 24 de ore. Citirea rezultatelor s-a efectuat prin măsurarea diametrelor zonelor de inhibiție generate de prezența substanțelor în mediu, cu ajutorul unei rigle gradate. Solventul utilizat, DMSO, a fost testat comparativ, pentru evidențierea unei potențiale activități antimicrobiene. Efectul bactericid al compusului (inhibarea creșterii bacteriene) a fost cuantificat prin apariția unei zone de inhibiție (zonă clară) în jurul spotului.

Rezultatele obținute în urma metodei calitative de testare a acțiunii antimicrobiene a noilor compuși sunt prezentate în tabelul 5:

Tabelul 5. Rezultatele testării calitative a sensibilității tulpinilor bacteriene la compușii studiați (diametrele zonelor de inhibiție a creșterii sunt exprimate în mm)

Compusul chimic	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	Ig	Ih	Ii	Ij
Tulpina microbiană										
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	8 mm	7 mm	0	0	0	11 mm	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0	0	0	0	0	8 mm	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	4 mm	0	0	10 mm	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> 1771	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	8 mm	0	8 mm	0	0	12 mm	0	0	0	0

Cel mai activ compus s-a dovedit a fi compusul **If**. Acesta inhibă creșterea a patru tulpini microbiene: Gram-pozitive (*B. subtilis*, *S. aureus*), Gram-negative (*E. coli*) și fungice (*C. albicans*). Compusul **Ia** prezintă acțiune antibacteriană, față de *B. subtilis* și antifungică, față de *C. albicans*, iar compusul **Ic** inhibă tulpinile de *E. coli* și *C. albicans*. Compusul **Ib** prezintă un spectru antimicrobian restrâns, fiind activ exclusiv pe *B. subtilis*. Niciunul dintre compușii testați nu sunt activi pe tulpinile de *P. aeruginosa* și *K. pneumoniae*. Compușii **Ig - Ij** (cu grupe metil sau etil în poziția 2 a nucleului dibenz[b,e]oxepinic) au fost inactivi față de tulpinile bacteriene și fungice testate.

b. Testarea cantitativă a activității antimicrobiene în vederea determinării concentrației minime inhibitorii (CMI).

Testarea cantitativă pentru determinarea CMI (cantitatea minimă de antibiotic capabilă să inhibe creșterea unui microorganism) s-a realizat prin metoda microdiluțiilor seriale în mediu lichid (Mueller Hinton) folosindu-se plăci cu 96 de godeuri, *numai pentru compușii dovediți activi în etapa de screening calitativ și numai pentru tulpinile față de care au avut activitate.* Astfel, au fost testați doar compușii **Ia, Ib, Ic, If**, față de tulpinile de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* și *C. albicans*.

Într-un volum de 100 μL de mediu s-au realizat diluții seriale binare ale soluției stoc de compus realizată în DMSO (10 mg/mL). În primul godeu s-au repartizat 180 μL mediu și 20 μL compus, iar în godeurile următoare s-au transferat serial câte 100 μL din godeul anterior și așa mai departe până la ultimul godeu, din care s-au aruncat 100 μL . Ulterior godeurile au fost însămânțate cu câte 20 μL suspensie microbiană cu densitate MacFarland 0,5. La fiecare testare s-a lucrat și cu un martor de cultură microbiană (un șir de godeuri conținând exclusiv mediu de cultură inoculat cu suspensie microbiană) și un martor de sterilitate a mediului (mediu neînsămânțat). După incubarea plăcilor la 37 °C timp de 24 de ore, au fost analizate rezultatele obținute prin observare macroscopică. Concentrația de antibiotic corespunzătoare ultimului godeu în care nu s-a mai observat dezvoltarea culturii a reprezentat valoarea CMI ($\mu\text{g/mL}$) pentru compusul respectiv. În godeurile următoare, inclusiv godeul martor de creștere, mediul a fost tulbure ca urmare a creșterii microbiene. Godeul martor de sterilitate obligatoriu nu a prezentat creștere microbiană, conținutul lichid rămânând clar, transparent.

Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene (tabelul 6) au evidențiat o puternică acțiune antimicrobiană, demonstrată prin valoarea scăzută a CMI, pentru compușii **Ia, Ib** și **If**, față de *B. subtilis* (4,8 - 39 $\mu\text{g/mL}$), pentru compusul **If** pe *S. aureus* (4,8 $\mu\text{g/mL}$) și *E. coli* (78 $\mu\text{g/mL}$) și pentru compusul **Ia** pe *C. albicans* (4,8 $\mu\text{g/mL}$). Compusul **Ic** prezintă o acțiune antimicrobiană scăzută (CMI 1250 $\mu\text{g/mL}$) față de tulpinile *E. coli* și *C. albicans*.

Tabelul 6. Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene pentru compușii selectați prin *screening* calitativ și valorile corespunzătoare CMI ($\mu\text{g/mL}$)

Tulpină microbiană \ Compus chimic	Ia	Ib	Ic	If
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	4,8	4,8	-	39
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	4,8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	1250	78
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4,8	-	1250	-

Așadar, compușii testați s-au dovedit a fi mai activi față de tulpinile bacteriene Gram- pozitive și fungice, cele Gram- negative fiind rezistente, probabil datorită impermeabilității crescute, datorate prezenței unui înveliș suplimentar reprezentat de membrana externă a acestor bacterii.

Metoda cantitativă confirmă rezultatele *screening*-ului calitativ, demonstrând că cel mai activ compus este **If**. Prezența grupei $-\text{CF}_3$ din structura acestuia se corelează cu o activitate antimicrobiană intensă, demonstrată de valorile scăzute ale CMI și de spectrul larg de activitate, atât pe bacterii Gram - pozitive, cât și pe bacterii Gram - negative.

c. Studiul influenței compușilor testați asupra dezvoltării de biofilme microbiene pe substrat inert.

În acest scop, celulele microbiene au fost cultivate în plăci cu 96 de godeuri cu bulion Muller-Hinton, în prezența diluțiilor binare ale compușilor testați (similar determinării CMI) și au fost incubate la 37°C timp de 24 ore. Plăcile au fost golite și spălate de două ori cu ser fiziologic steril și fixate timp de 5 minute cu $100\ \mu\text{L}$ metanol. Soluția de metanol s-a îndepărtat prin răsturnarea plăcilor, iar colorarea celulelor aderente s-a realizat cu soluție alcalină de cristal violet 1% ($100\ \mu\text{L/godeu}$), timp de 15 minute. După colorare, plăcile au fost spalate sub jet de apă de robinet, iar biofilmele microbiene formate pe pereții plăcilor de plastic, fixate cu metanol și colorate cu cristal violet, au fost resuspendate în acid acetic 33% (și omogenizate prin barbotare), iar intensitatea suspensiei colorate a fost evaluată prin măsurarea absorbției la $490\ \text{nm}$.

Rezultatele determinării influenței compușilor testați asupra dezvoltării de biofilme microbiene au arătat că aceștia prezintă un *efect inhibitor al aderenței microbiene*, manifestat prin reducerea valorilor absorbției la $490\ \text{nm}$. Cea mai mică concentrație inhibitorie a fost desemnată concentrația minimă de eradicare a biofilmului (CMEB) ($\mu\text{g/mL}$) (tabelul 7).

Tabelul 7. Rezultatele testării activității antibiofilm pentru compușii selectați prin *screening* calitativ și valorile corespunzătoare CMEB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Compus chimic	Ia	Ib	Ic	If
Tulpină microbială				
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	156	-	-	39
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	39	19,5	-	39
<i>E. coli</i> ATCC 25922	625	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	39	-	4,8	-

Compușii nou sintetizați care manifestă cel mai puternic efect inhibitor asupra sintezei de adevine celulare, sunt monosubstituiți la radicalul fenil al catenei laterale. Astfel, cea mai mică valoare CMEB a fost obținută pentru compusul **Ic**, care are un atom de -Cl în poziția *meta*, urmat de compusul **Ib**, care are un atom de -F în poziția *para* și de compușii **Ia**, cu o grupă metil în *meta* și **If**, care are o grupă -CF₃ în poziția *meta*.

Compușii **Ia**, **Ib** și **If** prezintă un efect inhibitor asupra capacității de aderare în cazul tulpinii *S. aureus* testate, efectul de inhibiție fiind exprimat până la o concentrație de 39, 19,5 și respectiv 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compușii **Ia** și **If** inhibă dezvoltarea biofilmului microbial de *B. subtilis* până la 156 și respectiv 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compusul **Ia** inhibă biofilmul de *E. coli* la concentrații mari, de până la 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compusul **Ic** este extrem de activ pe biofilmul de *C. albicans* pe substrat inert, până la o concentrație de 4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, urmat de **Ia**, care prezintă activitate până la 39 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

EXEMPLUL 14

Evaluarea in vitro a toxicității compușilor cu activitate antimicrobială confirmată prin analizele de la exemplul 13

Pentru evaluarea citotoxicității s-au utilizat celule HCT. Un număr de 3×10^5 celule au fost însămânțate în godeuri de 3,5 cm și tratate cu o concentrație de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ compus, pentru 24 ore, la 37 °C, 5% CO₂ și atmosferă umedă. Pentru *determinarea apoptozei*, s-a utilizat kitul Anexin V-FITC- iodura de propidium (BD Bioscience Pharmingen, USA). La 24 ore de la tratament, celulele au fost tripsinizate și spălate cu tampon fosfat salin. Celulele au fost resuspendate în 100 μL de tampon și colorate cu 5 μL de Anexin V-FITC și 5 μL de iodură de propidium, 10 minute la întuneric. Au fost achiziționate 10000 evenimente pentru fiecare probă utilizând citometrul în flux Beckman Coulter. Analiza s-a realizat utilizând software FlowJo.

Pentru *analiza ciclului celular* celulele HeLa, cultivate în condiții similare cu cele prezentate mai sus, au fost spălate în tampon fosfat (pH 7,5), fixate în 70% etanol și menținute la -20 °C, peste noapte. Fiecare probă a fost spălată în tampon fosfat salin, tratat cu 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

RNAză A, pentru 15 minute și colorată cu 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iodură de propidium prin incubare la 37 $^{\circ}\text{C}$, pentru o oră. Ulterior, achiziția s-a realizat utilizând citometrul de flux Epics Beckman Coulter, iar datele analizate utilizând software FlowJo 7.2.5 (Ashland, Oregon, USA).

Rezultatele privind efectul compușilor testați asupra apoptozei celulelor HCT, au arătat că **If** prezintă toxicitate crescută prin inducerea apoptozei, 69,3% din populația celulară suferind apoptoză târzie și 10,5% apoptoză timpurie. Toți ceilalți compuși prezintă citotoxicitate redusă, numărul celulelor afectate fiind în proporție redusă, de aproximativ 10-15% (tabelul 8, figura 2).

Tabelul 8. Rezultatele analizei influenței compușilor testați asupra apoptozei celulelor HCT

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	HCT	1a	1b	1c	1f
Necroza	2,58	7,21	3,14	7,81	5,39
Apoptoză tarzie	1,99	7,39	7,89	1,9	69,3
Apoptoză timpurie	0,844	1,17	4,7	0,46	10,5
Celule vii	94,6	84,2	84,3	89,8	14,8

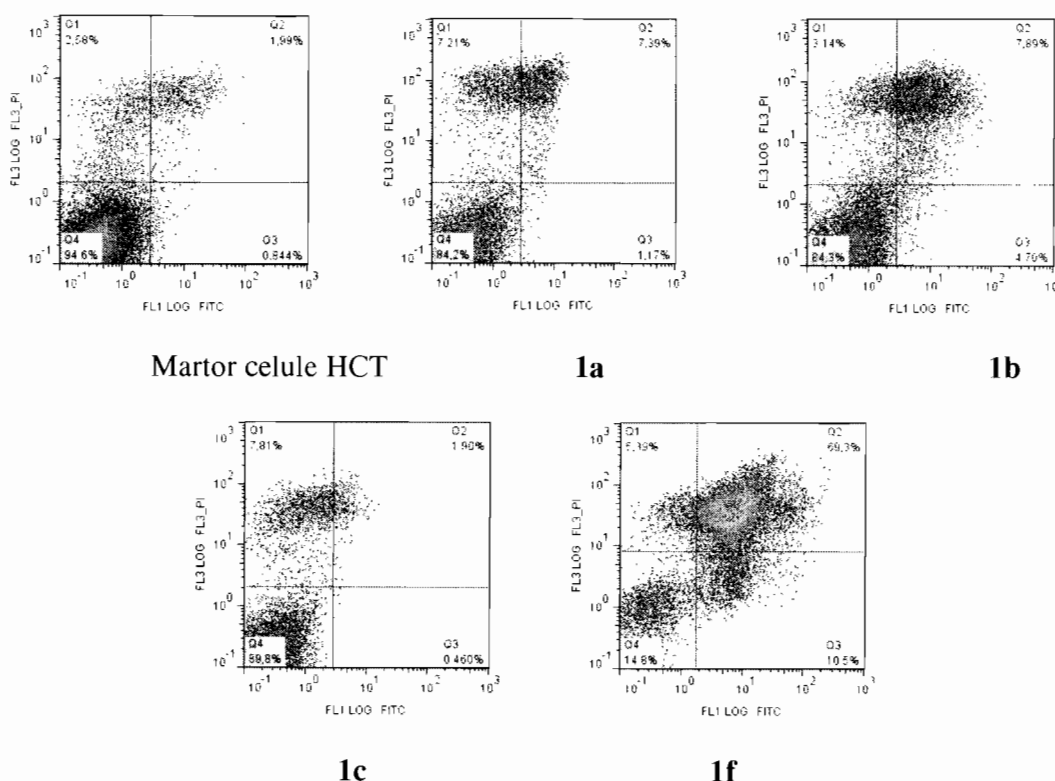


Figura 2. Analiza apoptozei prin citometrie în flux. Figurile dot plot prezintă următoarele populații: necrotice (Q1-stânga sus), apoptoză târzie (Q2-dreapta sus), apoptoză timpurie (Q3-dreapta jos), celule viabile (Q4-stânga jos).

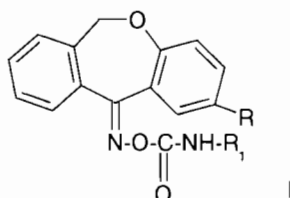
Toți compușii testați au indus o creștere a fazei de sinteză în celulele HeLa tratate cu 100 $\mu\text{g/mL}$ compus pentru 24 ore (tabelul 9).

Tabelul 9. Procentul de celule aflate în fazele G1, S, G2/M rezultat în urma analizei ciclului celular.

	G0/G1	S	G2/M
Compus Ia	61,01	37,43	8,46
Compus Ib	61,14	37,45	7
Compus Ic	61,75	36,48	8,03
Compus If	53,36	43,56	6,21
HeLa-MARTOR	69,35	24,72	5,12

Revendicări

1. O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine, caracterizate prin aceea că au următoarea formulă generală:



când R= H, R₁= -C₆H₄CH₃(3), -C₆H₄F(4), -C₆H₄Cl(3), -C₆H₄Cl(4), -C₆H₃Cl₂(2,4), -C₆H₄CF₃(3)

când R= -CH₃, R₁= -C₆H₃Cl₂(2,4)

când R= -C₂H₅, R₁= -C₆H₅, -C₆H₄F(4), -C₆H₃Cl₂(2,4)

2. Procedeu de obținere a O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinelor, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că are loc prin refluxarea 11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIa**), a 2-metil-11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIb**) sau a 2-etil-11-hidroximino-6,11-dihidro-dibenz[b,e]oxepinei (**VIIc**), cu arilizocianați, mediul de reacție fiind tetrahidrofurantul anhidru.

3. Compoziții farmaceutice, caracterizate prin aceea că acestea conțin ca unic principiu activ antimicrobian și antibiofilm O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepine, definite ca în revendicarea 1.

4. Utilizarea O-aril-carbamoil-oximino-dibenz[b,e]oxepinelor definite în revendicarea 1 pentru prepararea compozițiilor farmaceutice cu toxicitate scăută, destinate tratamentului antimicrobian și antibiofilm.