



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00668**

(22) Data de depozit: **23/10/2019**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2021** BOPI nr. **9/2021**

(41) Data publicării cererii:
28/08/2020 BOPI nr. **8/2020**

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

(72) Inventatori:
• **APOSTOL THEODORA - VENERA,
STR. ANTON PANN, NR.24, ET.1, AP.6,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA,
STR.AGRICULTORI, NR.44, BL.1, ET.4,
AP.14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SOCEA LAURA ILEANA, STR.BUDILĂ,
NR.9, ET.5, AP.31, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ȘARAMET IOANA, STR.TOAMNEI, NR.87,
ET.2, AP.6, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **DRĂGHICI CONSTANTIN, BD. TIMIȘOARA
NR. 49, BL. CC6, SC. A, ET.2, AP. 7,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RĂDULESCU VALERIA,
STR.ION FILIBILIU, NR.1, BL.4, ET.1, AP.4,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CHIFIRIUC MARIANA-CARMEN,
STR.STAMATE COSTACHE NR.5, BL.A8,
SC.1, ET.9, AP.37, SECTOR 4, BUCUREȘTI,
B, RO;**
• **MĂRUȚESCU LUMINIȚA GABRIELA,
ALEEA LT. GHEORGHE STĂLPEANU, NR.2,
BL.2, SC.1, ET.3, AP.8, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **OLARU OCTAVIAN TUDOREL,
STR.ZBOINA NEAGRĂ NR.5, BL.98, SC.1,
ET.1, AP.8, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **NIȚULESCU GEORGE MIHAI,
ȘOS.OLTENIȚEI NR.40-44, BL.6A, SC.4,
ET.7, AP.145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 97/34882 A1; WO 97/34882 A2

(54) **DERIVAȚI DE 4-IZOPROPIL-1,3-OXAZOL- 5(4H)-ONĂ CARE
CONȚIN UN SUBSTITUENT DIARILSULFONIL ÎN POZIȚIA 2
CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ**



1 Invenția se referă la derivați de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(*H*)-onă, care conțin un
substituent diarilsulfonil în poziția 2, cu potențiale aplicații în terapia antimicrobiană.

3 Invenția se înscrie în cadrul preocupărilor pe plan mondial pentru descoperirea unor
noi agenți antimicrobieni cu eficacitate maximă, în special asupra tulpinilor bacteriene rezis-
5 tente la antibioticele actuale.

7 De-a lungul timpului, atenția comunității științifice a fost îndreptată către identificarea
unor noi alternative de tratament. În acest scop, s-au sintetizat o serie de derivați cu nucleu
oxazolonic care prezintă acțiune antimicrobiană [Friedli, A. și colab., „**Antibacterial
9 oxazolone derivatives**”, WO 2014/108832 A1, 2014]. Jadomycin B (un antibiotic natural
produs de bacteria *Streptomyces venezuelae* ISP 5230, care conține în structură un nucleu
11 1,3-oxazolidin-5-onic condensat) și analogi structurali ai acestuia au fost testați *in vitro* pentru
activitatea antimicrobiană [Jakeman, D. L. și colab., „**Antimicrobial Activities of
13 Jadomycin B and Structurally Related Analogues**”, Antimicrob. Agents Chemother.,
2009, 53 (3), 1245-1247]. În plus, unii derivați din clasa 1,3-oxazol-5(4*H*)-onelor au acțiune
15 antivirală [Pinto, I. L. și colab., „**Novel, selective mechanism-based inhibitors of the
herpes proteases**”, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, 6 (20), 2467-2472].

17 Cercetările biologice în domeniul compușilor din clasa diarilsulfonelor au pus în
evidență faptul că și aceștia prezintă diverse acțiuni terapeutice printre care efect
19 antibacterian [Bera, S., Mondal, D., „**Insights of synthetic analogues of anti-leprosy
agents**”, Bioorg. Med. Chem., 2019, 27 (13), 2689-2717; Noordeen, S. K., „**History of
21 chemotherapy of leprosy**”, Clin. Dermatol., 2016, 34 (1), 32-36; Mady, M. F. și colab.,
„**Ultrasound-assisted synthesis of novel 1,2,3-triazoles coupled diaryl sulfone moieties
23 by the CuAAC reaction, and biological evaluation of them as antioxidant and
antimicrobial agents**”, Eur. J. Med. Chem., 2014, 84, 433-443; Pezzella, A. T., Fang, W.,
25 „**Surgical Aspects of Thoracic Tuberculosis: A Contemporary Review - Part 1**”, Curr.
Probl. Surg., 2008, 45 (10), 675-758], antiprotozoaric [Mishra, M. și colab.,
27 „**Comprehensive review on various strategies for antimalarial drug discovery**”, Eur.
J. Med. Chem., 2017, 125, 1300-1320], antiviral [Zanger, M., „**Diarylsulfone non-
29 nucleoside reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus**”,
US 6303630 B1, 2001] etc., derivați din această clasă fiind utilizați ca substanțe active în
31 compoziția unor medicamente folosite pentru prevenirea sau tratarea leprei, tuberculozei,
malariai și a altor boli infecțioase.

33 Având în vedere aceste date de literatură și cercetările noastre anterioare întreprinse
în domeniul derivaților care conțin un fragment diarilsulfonil [Apostol, T.-V. și colab.,
35 „**Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Evaluation of New Compounds from
Oxazol-5(4*H*)-ones and Oxazoles Class Containing 4-(4-Bromophenylsulfonyl)phenyl
37 Moiety**”, Rev. Chim. (Bucharest), 2019, 70 (4), 1099-1107; Apostol, T.-V. și colab.,
„**Synthesis and Characterization of New 5-Aryl-2-[para-(4-chlorophenylsulfonyl)
39 phenyl]-4-methyloxazoles**”, Rev. Chim. (Bucharest), 2011, 62 (5), 486-492; Apostol, T.-
V., și colab., „**Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of New 5-aryl-4-
41 methyl-2-[para-(phenylsulfonyl)phenyl]oxazoles**”, Rev. Chim. (Bucharest), 2011, 62 (2),
142-148], s-a realizat sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unei noi serii de compuși în
43 structura cărora s-au reunit două centre farmacofore și anume: un heterociclu pentaatomic
reprezentat de nucleul 1,3-oxazol-5(4*H*)-onic și un fragment de diarilsulfonă grefat în poziția
45 2 a nucleului heterociclic, cu scopul de a obține noi compuși cu acțiune antimicrobiană.

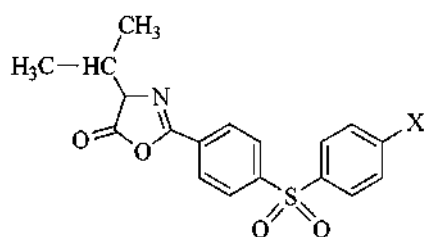
47 Invenția de față se referă la design-ul și la procedeul de obținere a noi derivați de 4-
izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă, care conțin un substituent diarilsulfonil în poziția 2 și la
evaluarea toxicității și a acțiunii antimicrobiene, în vederea utilizării în terapie a acestora.

RO 134367 B1

Obiectul invenției constă în: procedeul de obținere a trei compuși noi, derivați de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea *in vitro* a citotoxicității (folosind biotestul *Daphnia magna*) și a acțiunii antimicrobiene a acestora (utilizând tulpini bacteriene gram-pozitive: *Enterococcus faecium* E5, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6683 și gram-negative: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27857, *Escherichia coli* ATCC 8739 și un fung: *Candida albicans* 393). În ambele procedee de testare a acțiunii biologice, determinările s-au efectuat atât în cazul compușilor heterociclici cu nucleu 1,3-oxazol-5(4H)-onic, cât și în cazul intermediarilor din clasa N-acil- α -aminoacizilor, cu scopul de a se compara proprietăților produșilor de ciclizare față de cele ale precursorilor aciclici.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față constă în obținerea unor noi compuși heterociclici pentaatomici din clasa 1,3-oxazol-5(4H)-onelor stabili, cu structuri și proprietăți fizico-chimice, care să asigure o bună acțiune antimicrobiană.

Derivații de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă, care conțin un substituent diarilsulfonil în poziția 2, conform invenției, sunt reprezentați prin formula generală I:

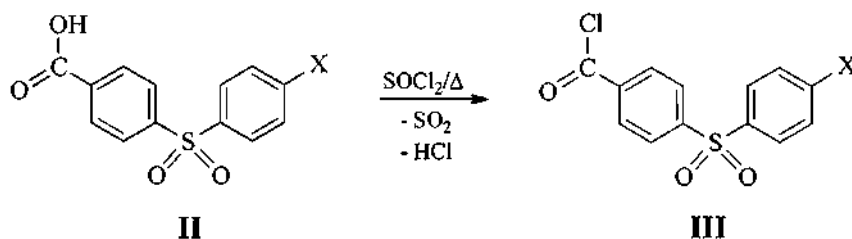


în care: X = hidrogen, clor sau brom.

Conform invenției, procedeul general de obținere a derivaților de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă, care conțin un substituent diarilsulfonil greșat în poziția 2, definiți anterior, decurge prin următoarele etape.

a. Sinteza clorurilor de 4-(4-X-fenilsulfonil)benzoil III (conform schemei 1)

Pentru obținerea compușilor cu nucleu 1,3-oxazol-5(4H)-onic, la care se referă invenția, s-au folosit ca materii prime acizii 4-(4-X-fenilsulfonil)benzoici II din care s-au sintetizat clorurile corespunzătoare III sub acțiunea clorurii de tionil, utilizată într-un exces molar de 24 ori mai mare, la reflux, conform datelor din literatură [Apostol, T.-V. și colab., „*Synthesis and Characterization of New 5-Aryl-2-[para-(4-chlorophenylsulfonyl)phenyl]-4-methyloxazoles*”, Rev. Chim. (Bucharest), 2011, 62 (5), 486-492; Apostol, T.-V., și colab., „*Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of New 5-aryl-4-methyl-2-[para-(phenylsulfonyl)phenyl]oxazoles*”, Rev. Chim. (Bucharest), 2011, 62 (2), 142-148].



Schema 1

condus la observația că nu este indicat ca în locul <i>N</i> -metilmorfolinei să se utilizeze, ca fixator de proton, o bază mai tare, cum este hidroxidul de sodiu deoarece în aceste condiții se produce hidroliza intermediarilor aciclici din clasa <i>N</i> -acil- α -aminoacizilor IV la nivelul grupei amidice.	1
Avantajele aplicării invenției sunt:	5
- compușii cu nucleu 1,3-oxazol-5(4 <i>H</i>)-onic pot fi obținuți cu randamente de reacție mari, cu o puritate ridicată, într-un interval de timp scurt, la temperatura camerei;	7
- se elimină produși secundari (clorhidrat de 4-metilmorfolină, etanol și dioxid de carbon), care se îndepărtează cu ușurință din mediul de reacție prin prelucrările ulterioare;	9
- prin particularitățile structurale și proprietățile fizico-chimice, compușii sintetizați prezintă avantajul unei bune acțiuni antimicrobiene;	11
- derivații de 1,3-oxazol-5(4 <i>H</i>)-onă obținuți pot fi folosiți ca intermediari pentru sinteza altor clase de compuși, printre care o importanță deosebită prezintă derivații de 1,3-oxazol cu utilizări în diferite domenii, de exemplu în medicină ca agenți analgezici, antiinflamatori [Rainsford, K. D. și colab., „Recent pharmacodynamic and pharmacokinetic findings on oxaprozin”, <i>InflammoPharmacology</i> , 2002, 10 (3), 185-239], antidiabetici [Mirza, A. Z. și colab., „Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications”, <i>Eur. J. Med. Chem.</i> , 2019, 166, 502-513], cu acțiune antimicrobiană [Li Q., Seiple, I. B., „A concise route to virginiamycin M2”, <i>Tetrahedron</i> , 2019, 75 (24), 3309-3318] etc.	13
Confirmarea structurii compușilor sintetizați s-a realizat prin diferite metode fizico-chimice (punct de topire, analiză elementală, spectrometrie de absorbție în UV-Viz și în IR, SM, ¹ H-RMN și ¹³ C-RMN). Pentru determinarea purității noilor compuși, s-a folosit metoda RP-HPLC.	15
<i>Reactivi, aparatură și metode de analiză utilizate</i>	17
Toți reactanții și solvenții folosiți au fost achiziționați comercial cu cea mai mare puritate și au fost utilizați fără purificare ulterioară.	19
Temperaturile de topire sunt necorectate și au fost determinate cu un aparat Bötius, cu o viteză a încălzirii de 3°C/min.	21
Spectrele de absorbție în UV-Viz au fost înregistrate cu un spectrofotometru Analytic Jena AG Specord 40, în soluții metanolice (de concentrație $\approx 2,5 \times 10^{-5}$ M), în intervalul 200-600 nm.	23
Spectrele absorbție în IR au fost înregistrate cu un spectrometru FT-IR, Bruker Vertex 70, în pastilă de KBr, în intervalul 4000-400 cm ⁻¹ ; intensitățile benzilor de absorbție în IR sunt raportate în termeni semicantitativi notați cu simbolurile: fi -absorbție foarte intensă, i -absorbție intensă, m - absorbție medie, s - absorbție slabă.	25
Spectrele de RMN au fost înregistrate cu un aparat cu magnet supraconductor Varian Gemini 300BB, la 300 MHz pentru ¹ H-RMN și la 75 MHz pentru ¹³ C-RMN, la temperatura ambiantă, folosind ca solvenți deuterati (cu grad de deuterare de minim 98%): dimetilsulfoxidul deuterat (DMSO-d ₆) sau deuterocloroformul (CDCl ₃). Ca standard intern s-a folosit tetrametilsilanul (TMS) și semnalele reziduale ale solvenților (2,5 ppm în spectrele de ¹ H-RMN și 39,5 ppm în spectrele de ¹³ C-RMN pentru DMSO-d ₆ ; 7,24 ppm în spectrele de ¹ H-RMN și 77,2 ppm în spectrele de ¹³ C-RMN pentru CDCl ₃). Deplasările chimice (δ) sunt raportate în părți pe milion (ppm) față de TMS și constantele de cuplaj (<i>J</i>) sunt exprimate în hertz (Hz). În ¹ H-RMN, pentru exprimarea multiplicității semnalelor s-au folosit următoarele abrevieri: s - singlet; d - dublet; dd - dublet de dublete; t - triplet; tt - triplet de triplete; oct - octet. Pentru atribuirea univocă a semnalelor s-au efectuat și experimente de conectivitate bidimensionale: ¹ H- ¹ H COSY și ¹ H- ¹³ C HETCOR.	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 134367 B1

1 1,3-Oxazol-5(4*H*)-onele nou obținute au putut fi analizate prin GC-SM, datorită
2 polarității lor mai scăzute, a stabilității și a volatilității ridicate la temperaturi înalte în compa-
3 rație cu noii *N*-acil- α -aminoacizi, intermediarii aciclici de la care provin prin ciclodehidratare
4 intramoleculară. Spectrele de masă au fost înregistrate cu un cromatograf de gaze Fisons
5 Instruments GC 8000, cuplat cu un detector spectrometru de masă (cu ionizare prin impact
6 electronic și analizor quadrupol), model MD 800. S-a utilizat o coloană capilară din silice
7 topită acoperită la interior cu poli (5% difenil/95% dimetil siloxan) (model SLB-5ms, L x I.D.
8 30 m x 0,32 mm, cu grosimea filmului de fază staționară de 0,25 μ m). Debitul de gaz purtător
9 (heliu) a fost de 2 mL/min. Probele au fost solubilizate în diclorometan, iar volumul injectat
10 de soluție a probelor a fost de 1 μ L.

11 Cromatogramele RP-HPLC au fost înregistrate folosind un cromatograf de lichide
12 Beckman System Gold 126, echipat cu un detector UV-Viz System Gold 166, o coloana
13 cromatografică nepolară (tip LiChrosorb RP-18, cu mărimea particulelor de 5 μ m, L x I.D.
14 25 cm x 4 mm) și un sistem de injecție Rheodyne. Faza mobilă a fost un amestec de metanol
15 - apă în diferite proporții, cu un debit de 1 mL/min. S-a raportat și timpul de reținere (t_R) al
16 compușilor analizați în minute.

17 Analiza elementală a fost efectuată utilizând un microanalizor elemental Costech
18 ECS 4010.

19 Se dau în cele ce urmează trei exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

21 *Sinteza 2-[4-(fenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei*

22 *a. Sinteza clorurii de 4-(fenilsulfonil)benzoil*

23 Acidul 4-(fenilsulfonil)benzoic (5,25 g, 20 mmoli) se refluxează în prezență de clorură
24 de tionil în exces (35 ml, 480 mmoli), până când nu se mai degajă dioxid de sulf și acid
25 clorhidric. Clorura de tionil nereacționată se îndepărtează prin distilare la presiune redusă.
26 Clorura de 4-(fenilsulfonil)benzoil brută, obținută sub formă de cristale slab colorate, se utili-
27 zează în continuare în sinteză fără o purificare prealabilă.

28 Rezultă 5,56 g compus; randament = 99%; p.t. = 148-149°C.

29 Analiza FT-IR (KBr, ν cm^{-1}): 3092fi; 3038m; 1776fi; 1741fi; 1581m; 1474m; 1446i;
30 1327fi; 1300fi; 1161fi; 889fi; 856i.

31 *b. Sinteza acidului 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic*

32 Valina (2,34 g, 20 mmoli) se dizolvă în 20 mL (20 mmoli) soluție de hidroxid de sodiu
33 1 N. În soluția obținută, răcită pe baie de gheață la 0-5°C, se adaugă timp de 30 min,
34 simultan, în picături și sub continuă agitare, două soluții, după cum urmează: soluția clorurii
35 de 4-(fenilsulfonil)benzoil (5,61 g, 20 mmoli) în 45 mL diclorometan anhidru și respectiv
36 10 mL (20 mmoli) soluție de hidroxid de sodiu 2 N. Amestecul de reacție se agită la tempe-
37 ratura camerei, timp de o oră, apoi stratul superior apos se separă și se acidulează cu acid
38 clorhidric 2 N, până la un pH acid. Precipitatul format se filtrează la presiune redusă, se spală
39 pe filtru cu apă până la pH neutru și se usucă. Purificarea produsului de reacție se realizează
40 prin recristalizare din apă, când se obțin cristale albe, aciculare, de puritate ridicată.

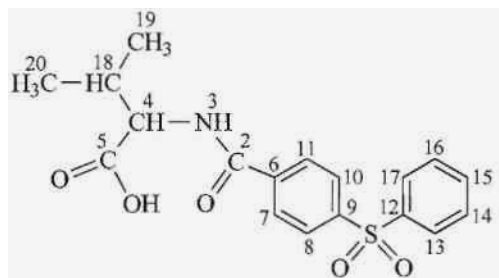
41 Rezultă 6,43 g compus; randament = 89%; p.t. = 84-86°C (apă).

42 Analiza UV-Viz (CH_3OH , λ nm) ($\lg \epsilon$): 202,6 (4,49); 241,0 (4,11).

43 Analiza FT-IR (KBr, ν cm^{-1}): 3424fi; 3088m; 3069m; 2967i; 2933i; 2875m; 1720fi;
44 1674fi; 1655fi; 1533fi; 1449m; 1311fi; 1296fi; 1156fi; 858m.

RO 134367 B1

Analiza RMN:



$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 0,90 (d, 6,6, 3H, H-19); 0,91 (d, 6,6, 3H, H-20); 2,12 (oct, 6,6, 1H, H-18); 4,26 (dd, 8,0, 6,6, 1H, H-4); 7,56 (dd, 7,8, 7,4, 2H, H-14, H-16); 7,62 (tt, 7,4, 1,5, 1H, H-15); 7,91 (dd, 7,8, 1,5, 2H, H-13, H-17); 7,96 (s, 4H, H-7, H-8, H-10, H-11); 8,38 (d, 8,0, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 18,61 (C-19); 19,24 (C-20); 29,48 (C-18); 58,43 (C-4); 127,41 (C-13, C-17); 127,46 (C-8, C-10); 129,00 (C-7, C-11); 129,85 (C-14, C-16); 133,96 (C-15); 138,87 (C-6); 140,69 (C-12); 143,18 (C-9); 165,87 (C-2); 172,81 (C-5).

Analiza RP-HPLC (CH₃OH:H₂O = 30:70, 1 mL/min, 250 nm): puritate = 99,99%; t_R = 3,78 min.

Analiza elementală: Calculat pentru C₁₈H₁₉NO₅S (361,41 g/mol): C, 59,82; H, 5,30; N, 3,88; S, 8,87%. Găsit: C, 59,87; H, 5,28; N, 3,89; S, 8,85%.

c. Sinteza 2-[4-(fenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei

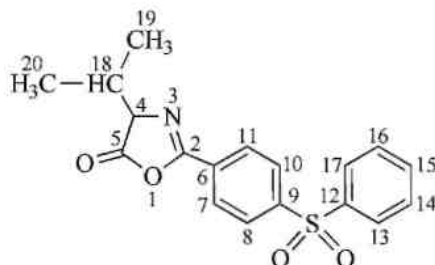
În 50 mL diclorometan anhidru, se adaugă sub agitare, la temperatura camerei, 3,79 g (10,5 mmoli) acid 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic brut și apoi 1,15 mL (10,5 mmoli) 4-metilmorfolină. Peste amestecul de reacție eterogen, se adaugă în picături și sub agitare o cantitate echimolară de cloroformiat de etil (1 mL). Soluția formată se agită în continuare la temperatura camerei, timp de 30 min, apoi se toarnă peste 100 mL amestec de apă cu gheață. Stratul organic se separă, se spală cu soluție de hidrogenocarbonat de sodiu 5% și apoi cu apă. După uscare pe sulfat de magneziu anhidru, solventul se îndepărtează prin distilare la presiune redusă. Produsul solid se purifică prin recristalizare din ciclohexan, când se obțin cristale albe.

Rezultă 3,24 g compus; randament = 90%; p.t. = 115-117°C (ciclohexan).

Analiza UV-Viz (CH₃OH, λ nm) (lg ϵ): 202,6 (4,48); 247,6 (4,32).

Analiza FT-IR (KBr, ν cm⁻¹): 3093s; 3066m; 2964i; 2931m; 2875m; 1827fi; 1649fi; 1599m; 1584m; 1570m; 1447i; 1466m; 1326fi; 1309fi; 1295fi; 1244i; 1159fi; 1037fi; 843i.

Analiza RMN:



$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 0,99 (d, 6,9, 3H, H-19); 1,14 (d, 6,9, 3H, H-20); 2,39 (2oct, 6,9, 4,4, 1H, H-18); 4,32 (d, 4,4, 1H, H-4); 7,54 (t, 7,8, 2H, H-14, H-16); 7,61 (tt, 7,8, 1,8, 1H, H-15); 7,90 (dd, 7,8, 1,8, 2H, H-13, H-17); 8,07 (d, 8,8, 2H, H-8, H-10); 8,15 (d, 8,8, 2H, H-7, H-11).

RO 134367 B1

1 ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 17,65 (C-19); 18,89 (C-20); 31,40 (C-18); 71,02 (C-4);
127,99 (C-13, C-17); 128,18 (C-8, C-10); 128,88 (C-7, C-11); 129,63 (C-14, C-16); 130,32
3 (C-6); 133,82 (C-15); 140,85 (C-12); 145,38 (C-9); 160,44 (C-2); 177,05 (C-5).

Analiza GC-SM (m/z, abund. rel. %): 301 (100, PB) $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6]^{++}$; 245 (37,71)
5 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CHNH}]^{++}$ sau $[\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}]^+$; 218 (17,37) $[\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_5]^{++}$; 152 (6,57); 132
(12,92); 125 (38,56) $[\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}]^+$; 104 (7,42) $[\text{C}_6\text{H}_4\text{CHNH}]^+$; 97 (4,24) $[\text{C}_3\text{H}_7\text{CNCO}]^{++}$; 77 (25,85)
7 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$; 76 (9,75) $[\text{C}_6\text{H}_4]^{++}$; 51 (10,17) $[\text{C}_4\text{H}_3]^+$; 44 (17,80) $[\text{C}_3\text{H}_8]^{++}$ sau $[\text{CO}_2]^{++}$; 43 (21,82)
 $[\text{C}_3\text{H}_7]^+$; $t_R = 26,25$ min.

9 Analiza RP-HPLC ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 60:40$, 1 mL/min, 250 nm): puritate = 91,85%;
 $t_R = 3,47$ min.

11 Analiza elementală: Calculat pentru $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$ (343,40 g/mol): C, 62,96; H, 4,99;
N, 4,08; S, 9,34%. Găsit: C, 62,89; H, 4,98; N, 4,09; S, 9,31%.

13 Exemplul 2

Sinteza 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei

15 a. Sinteza clorurii de 4-(4-clorofenilsulfonil)benzoil

Compusul, sub formă de cristale slab colorate, se obține prin metoda generală
17 descrisă în exemplul 1.a, din 5,93 g acid 4-(4-clorofenilsulfonil)benzoic.

Rezultă 6,24 g compus; randament = 99%; p.t. = 138-139°C.

19 Analiza FT-IR (KBr, ν cm^{-1}): 3097i; 3039m; 1781i; 1740fi; 1581m; 1475m; 1332fi;
1302i; 1285i; 1162fi; 888fi; 851i; 762fi.

21 b. Sinteza acidului 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic

Compusul, sub formă de cristale aciculare, de culoare albă, se obține prin metoda
23 generală descrisă în exemplul 1.b, din 6,30 g clorură de 4-(clorofenilsulfonil)benzoil.

Rezultă 7,36 g compus; randament = 93%; p.t. = 191-193°C (apă).

25 Analiza UV-Viz (CH_3OH , λ nm) (lg ϵ): 202,6 (4,48); 248,5 (4,08).

Analiza FT-IR (KBr, ν cm^{-1}): 3358i; 3090m; 3074m; 2964i; 2937m; 2876m; 1737fi;
27 1641fi; 1601m; 1554i; 1478m; 1468m; 1320fi; 1290i; 1283i; 1160fi; 849m; 759i.

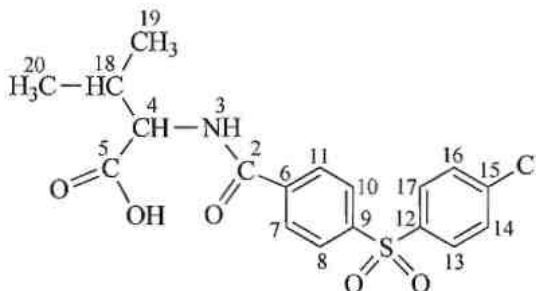
Analiza RMN:

29

31

33

35



37 ^1H -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 0,92 (d, 6,6, 3H, H-19); 0,93 (d, 6,6, 3H, H-20);
2,12 (oct, 6,6, 1H, H-18); 4,29 (dd, 8,0, 6,6, 1H, H-4); 7,71 (d, 8,5, 2H, H-14, H-16); 8,00 (d,
39 8,5, 2H, H-13, H-17); 8,05 (d, 8,8, 2H, H-8, H-10); 8,09 (d, 8,8, 2H, H-7, H-11); 8,73 (d, 8,0,
1H, NH).

41 ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , δ ppm): 18,61 (C-19); 19,25 (C-20); 29,48 (C-18); 58,43 (C-4);
127,49 (C-8, C-10); 129,07 (C-13, C-17); 129,46 (C-7, C-11); 130,01 (C-14, C-16); 139,02
43 (C-6); 139,10 (C-15); 139,51 (C-12); 142,70 (C-9); 165,78 (C-2); 172,80 (C-5).

Analiza RP-HPLC ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 30:70$, 1 mL/min, 250 nm): puritate = 99,99%;
45 $t_R = 4,38$ min.

Analiza elementală: Calculat pentru $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClNO}_5\text{S}$ (395,86 g/mol): C, 54,61; H, 4,58;
47 N, 3,54; S, 8,10%. Găsit: C, 54,66; H, 4,57; N, 3,54; S, 8,13%.

RO 134367 B1

c. Sinteza 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei

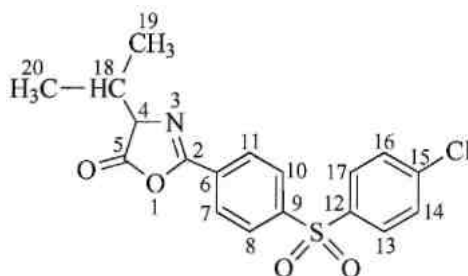
Compusul, sub formă de cristale de culoare albă, se obține prin metoda generală descrisă în exemplul 1.c, din 4,16 g acid 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic.

Rezultă 3,69 g compus; randament = 93%; p.t. = 139-141°C (ciclohexan).

Analiza UV-Viz (CH₃OH, λ nm) (lg ε): 202,6 (4,48); 222,9 (4,14); 249,3 (4,32).

Analiza FT-IR (KBr, ν cm⁻¹): 3098m; 3072s; 3048s; 2968m; 2933m; 2876s; 1830fi; 1650fi; 1598m; 1579m; 1476m; 1328fi; 1289i; 1245m; 1158fi; 1040fi; 847m; 768fi.

Analiza RMN:



¹H-RMN (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz): 0,99 (d, 6,8, 3H, H-19); 1,13 (d, 6,8, 3H, H-20); 2,39 (2oct, 6,8, 4,7, 1H, H-18); 4,33 (d, 4,7, 1H, H-4); 7,51 (d, 8,5, 2H, H-14, H-16); 7,91 (d, 8,5, 2H, H-13, H-17); 8,05 (d, 8,5, 2H, H-8, H-10); 8,15 (d, 8,5, 2H, H-7, H-11).

¹³C-RMN (DMSO-d₆, δ ppm): 17,65 (C-19); 18,89 (C-20); 31,42 (C-18); 71,04 (C-4); 128,18 (C-8, C-10); 128,98 (C-7, C-11); 129,44 (C-13, C-17); 129,98 (C-14, C-16); 130,57 (C-6); 139,38 (C-15); 140,63 (C-12); 144,95 (C-9); 160,36 (C-2); 176,98 (C-5).

Analiza GC-SM (m/z, abund. rel. %): 335 (³⁵Cl)/337 (³⁷Cl) (100, PB/26,69) [M-C₃H₆]⁺; 279 (43,22) [³⁵ClC₆H₄SO₂C₆H₄CHNH]⁺ sau [³⁵ClC₆H₄SO₂C₆H₄CO]⁺; 280 (18,22) [³⁷ClC₆H₄SO₂C₆H₄CHNH]⁺; 252 (16,31) [³⁵ClC₆H₄SO₂C₆H₅]⁺; 159/161 (44,07/13,14) [³⁵ClC₆H₄SO]⁺/[³⁷ClC₆H₄SO]⁺; 131/133 (7,63/5,30); 111 (13,98) [³⁵ClC₆H₄]⁺; 44 (18,22) [C₃H₈]⁺ sau [CO₂]⁺; 43 (34,53) [C₃H₇]⁺; t_R = 31,30 min.

Analiza RP-HPLC (CH₃OH:H₂O = 60:40, 1 mL/min, 250 nm): puritate = 96,28%; t_R = 3,93 min.

Analiza elementală: Calculat pentru C₁₈H₁₆ClNO₄S (377,84 g/mol): C, 57,22; H, 4,27; N, 3,71; S, 8,49%. Găsit: C, 57,17; H, 4,26; N, 3,71; S, 8,46%.

Exemplul 3

Sinteza 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei

a. Sinteza clorurii de 4-(4-bromofenilsulfonil)benzoil

Compusul, sub formă de cristale slab colorate, se obține prin metoda generală descrisă în exemplul 1.a, din 6,82 g acid 4-(4-bromofenilsulfonil)benzoic.

Rezultă 7,12 g compus; randament = 99%; p.t. = 154-155°C.

Analiza FT-IR (KBr, ν cm⁻¹): 3097i; 3040m; 1779fi; 1740fi; 1591m; 1572fi; 1470m; 1332fi; 1302i; 1287i; 1162fi; 888fi; 851i; 575fi.

b. Sinteza acidului 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic

Compusul, sub formă de cristale aciculare, de culoare albă, se obține prin metoda generală descrisă în exemplul 1.b, din 7,19 g clorură de 4-(bromofenilsulfonil)benzoil.

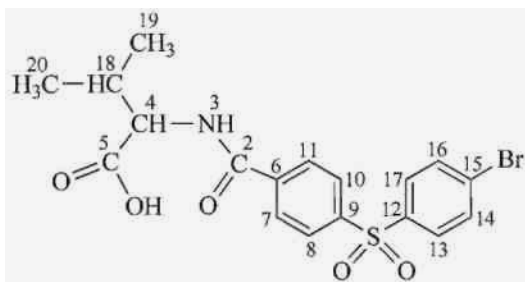
Rezultă 8,28 g compus; randament = 94%; p.t. = 194-196°C (apă).

Analiza UV-Viz (CH₃OH, λ nm) (lg ε): 202,6 (4,48); 252,0 (4,20).

Analiza FT-IR (KBr, ν cm⁻¹): 3347i; 3092m; 3069m; 2966i; 2933i; 2876m; 1746fi; 1635fi; 1599m; 1573fi; 1536fi; 1487m; 1467i; 1324fi; 1296i; 1281i; 1161fi; 852m; 613fi; 575fi.

RO 134367 B1

Analiza RMN:



$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 0,94 (d, 6,7, 3H, H-19); 0,95 (d, 6,7, 3H, H-20); 2,17 (oct, 6,7, 1H, H-18); 4,29 (dd, 8,1, 6,7, 1H, H-4); 7,85 (d, 8,8, 2H, H-14, H-16); 7,92 (d, 8,8, 2H, H-13, H-17); 8,04 (d, 8,8, 2H, H-8, H-10); 8,07 (d, 8,8, 2H, H-7, H-11); 8,73 (d, 8,1, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 18,61 (C-19); 19,25 (C-20); 29,48 (C-18); 58,43 (C-4); 127,49 (C-13, C-17); 128,22 (C-15); 129,07 (C-8, C-10); 129,48 (C-7, C-11); 132,96 (C-14, C-16); 139,03 (C-6); 139,92 (C-12); 142,66 (C-9); 165,78 (C-2); 172,79 (C-5).

Analiza RP-HPLC (CH₃OH:H₂O = 30:70, 1 mL/min, 250 nm): puritate = 99,99%; t_R = 4,47 min.

Analiza elementală: Calculat pentru C₁₈H₁₈BrNO₅S (440,31 g/mol): C, 49,10; H, 4,12; N, 3,18; S, 7,28%. Găsit: C, 49,06; H, 4,11; N, 3,19; S, 7,28%.

c. Sinteza 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei

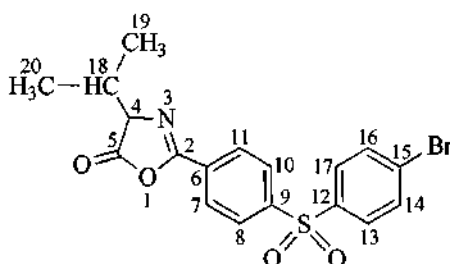
Compusul, sub formă de cristale de culoare albă, se obține prin metoda generală descrisă în exemplul 1.c, din 4,62 g acid 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic.

Rezultă 3,99 g compus; randament = 90%; p.t. = 144-145°C (ciclohexan).

Analiza UV-Viz (CH₃OH, λ nm) (lg ϵ): 202,6 (4,49); 227,3 (4,14); 252,0 (4,35).

Analiza FT-IR (KBr, ν cm⁻¹): 3092m; 3067s; 2963m; 2930m; 2875m; 1825fi; 1650fi; 1599s; 1573i; 1469m; 1329fi; 1293i; 1243m; 1160fi; 1040fi; 845m; 614fi; 574i.

Analiza RMN:



$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm, J Hz): 0,98 (d, 6,8, 3H, H-19); 1,13 (d, 6,8, 3H, H-20); 2,34 (2oct, 6,8, 4,7, 1H, H-18); 4,32 (d, 4,7, 1H, H-4); 7,68 (d, 8,5, 2H, H-14, H-16); 7,83 (d, 8,5, 2H, H-13, H-17); 8,05 (d, 8,5, 2H, H-8, H-10); 8,15 (d, 8,5, 2H, H-7, H-11).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 16,90 (C-19); 17,65 (C-20); 31,42 (C-18); 71,04 (C-4); 128,17 (C-8, C-10); 128,99 (C-7, C-11); 129,23 (C-15); 129,49 (C-13, C-17); 130,58 (C-6); 132,97 (C-14, C-16); 139,92 (C-12); 144,89 (C-9); 160,34 (C-2); 176,98 (C-5).

Analiza GC-SM (m/z, abund. rel. %): 379 (^{79}Br)/381 (^{81}Br) (71,61/100, PB) [M-C₃H₆]⁺; 323/325 (41,31/38,56) [$^{79}\text{BrC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CHNH}$]⁺/[$^{81}\text{BrC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CHNH}$]⁺ sau [$^{79}\text{BrC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$]⁺/[$^{81}\text{BrC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$]⁺; 207 (29,87); 203 (40,89) [$^{79}\text{BrC}_6\text{H}_4\text{SO}$]⁺; 76 (24,15) [C₆H₄]⁺; 43 (37,71) [C₃H₇]⁺; t_R = 36,53 min.

Analiza RP-HPLC (CH₃OH:H₂O = 60:40, 1 mL/min, 250 nm): puritate = 94,16%; t_R = 4,05 min.

RO 134367 B1

Analiza elementală: Calculat pentru C₁₈H₁₆BrNO₄S (422,29 g/mol): C, 51,19; H, 3,82; N, 3,32; S, 7,59%. Găsit: C, 51,24; H, 3,81; N, 3,33; S, 7,57%. 1

Evaluarea citotoxicității 3

Metoda este utilizată în determinarea toxicității medicamentelor, biocompușilor, a extractelor vegetale, precum și în evaluări ecotoxicologice [Guilhermino, L. și colab., „*Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile Daphnia magna*”, *Chemosphere*, 1996, 32 (4), 727-738]. Daphniile utilizate în experiment provin dintr-o cultură partenogenetică de femele din specia *Daphnia magna*, înființată în 2012, în cadrul Facultății de Farmacie din UMF „Carol Davila”, București. Principiul metodei constă în menținerea nevertebratelor *Daphnia magna* în șase diluții succesive (2,2-44 μg/mL) obținute dintr-o substanță de testat și numărarea supraviețuitorilor după 24 și 48 h. 5 7 9 11

S-a folosit metoda descrisă în literatura de specialitate cu unele modificări [Olaru, O. T. și colab., „*Anticancer potențial of selected Fallopia Adans species*”, *Oncology letters*, 2015, 10 (3), 1323-1332]. Daphniile utilizate în experiment sunt menținute în condiții de temperatură și iluminare constante (temperatură: 25 ± 1 °C; ciclul iluminare: 16 h lumină și 8 h întuneric) și hrănite cu *Saccharomyces cerevisiae*. Au fost folosite exemplare în vârstă de 7-10 zile. Loturile au fost alcătuite din 10 daphnii, la un volum final de 4 mL. Pe toată perioada experimentului, organismele nu au fost hrănite, iar mediul nu a fost aerat. Determinările au fost efectuate în duplicat. 13 15 17 19

Cu excepția acidului 4-(4-clorofenilsulfonil)benzoic (II; X = Cl) și acidului 4-(4-bromofenilsulfonil)benzoic (II; X = Br), după 24 h nu s-a înregistrat letalitate > 10% (tabelul 1). La 48 h, cei mai toxici compuși au fost tot acidul 4-(4-clorofenilsulfonil)benzoic (II; X = Cl) și acidul 4-(4-bromofenilsulfonil)benzoic (II; X = Br), urmați de acidul 4-(fenilsulfonil)benzoic (II; X = H), la care însă nu s-a putut stabili o relație între concentrație și letalitate. 21 23 25

Rezultatele biotestului *Daphnia magna* 27

Tabelul 1

Compus testat	LC50 24h (μg/mL)	IC95% 24h (μg/mL)	LC50 48h (μg/mL)	IC95% 48h (μg/mL)
Acid 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = H)	ND	ND	ND	ND
Acid 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Cl)	ND	ND	ND	ND
Acid 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Br)	ND	ND	43,5	ND
Exemplul 1	ND	ND	21,73	ND
Exemplul 2	ND	ND	44	42,84-45,19
Exemplul 3	ND	ND	31,25	22,32-43,75

Tabelul 1 (continuare)

Compus testat	LC50 24h (µg/mL)	IC95% 24h (µg/mL)	LC50 48h (µg/mL)	IC95% 48h (µg/mL)
Valină (Martor 1)	ND	ND	ND	ND
Acid 4-(fenilsulfonil)benzoic (II; X = H) (Martor 2)	ND	ND	ND*	ND
Acid 4-(4-clorofenilsulfonil)benzoic (II; X = Cl) (Martor 3)	21,92	ND	1,794	1,136- 2,833
Acid 4-(4-bromofenilsulfonil)benzoic (II; X = Br) (Martor 4)	31,11	ND	1,144	0,1317- 9,929

LC50 - concentrație letală 50%.

IC95% - interval de încredere de 95% al LC50.

ND - nedeterminat datorită valorilor letalității mai mici de 30%.

ND* - compusul a indus valori ale letalității cuprinse între 70 și 100%, concentrația nefiind proporțională cu efectul biologic.

Testarea a evidențiat o toxicitate scăzută până la medie a: intermediarilor aciclici din clasa N-acil- α -aminoacizilor (IV; X = H, Cl, Br), derivaților de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă (I; X = H, Cl, Br), valinei și ridicată pentru materiile prime: acizii 4-(4-X-fenilsulfonil)benzoici (II; X = H, Cl, Br). Totuși, valorile obținute pentru derivații cu nucleu 1,3-oxazol-5(4H)-onic din exemplele 1-3 au arătat o oarecare toxicitate, aceasta indicând activitate biologică a compușilor.

Testarea activității antimicrobiene

Noii derivați de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă, care conțin un substituent diarilsulfonil în poziția 2 (I; X = H, Cl, Br), la care se referă invenția, au fost testați, comparativ cu noii precursori aciclici din clasa N-acil- α -aminoacizilor (IV; X = H, Cl, Br), pentru activitatea antimicrobiană. În acest scop au fost realizate soluții de concentrație 5 mg/mL în DMSO, testate față de tulpini bacteriene gram-pozitive: *Enterococcus faecium* E5, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6683, gram-negative: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27857, *Escherichia coli* ATCC 8739 și o tulpină levurică reprezentată de *Candida albicans* 393.

Testarea activității antimicrobiene s-a realizat prin metode calitative și cantitative.

Screening-ul calitativ al sensibilității diferitelor tulpini microbiene față de compușii testați, cu potențială acțiune antiinfecțioasă

S-a realizat printr-o metodă adaptată disc difuzimetrică. Un volum de 5 µL soluție a fiecărui compus testat (5 mg/mL în DMSO) a fost repartizat „în spot” pe mediu Mueller-Hinton însămânțat „în pânză” cu o suspensie microbiană standardizată (cu densitate McFarland 0,5). După însămânțare, 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 h. Citirea rezultatelor și efectul bactericid al compusului (inhibarea creșterii bacteriene) a fost cuantificat prin măsurarea diametrelor zonelor de inhibiție generate de prezența substanțelor în mediu, cu ajutorul unei rigle gradate.

Rezultatele analizei calitative a activității antimicrobiene a noilor compuși sintetizați sunt prezentate în tabelul 2.

Rezultatele obținute arată că cea mai sensibilă tulpină la acțiunea compușilor testați a fost *E. faecium* E5, în cazul acesteia fiind observată apariția de zone de inhibiție a creșterii în prezența tuturor compușilor testați (I și IV; X = H, Cl, Br). Tulpinile de *S. aureus* ATCC

RO 134367 B1

6538 și *B. subtilis* ATCC 6683 au fost sensibile numai la acțiunea 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei (I; X = Cl), 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei (I; X = Br) și respectiv a 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei (I; X = Cl). 2-[4-(4-Clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-ona a prezentat un spectru de activitate antibacterian mai larg, fiind activă față de toate tulpinile bacteriene gram-pozitive testate.

Testarea calitativă a activității antimicrobiene a compușilor testați

Tabelul 2

Compus testat	Tulpina microbiană / Diametrul zonelor de inhibiție a creșterii (mm)					
	<i>Enterococcus faecium</i> E5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6683	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27857	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Candida albicans</i> 393
Acid 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = H)	20	-	-	-	-	-
Acid 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Cl)	15	-	-	-	-	-
Acid 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Br)	17	-	-	-	-	-
Exemplul 1	17	-	-	-	-	-
Exemplul 2	10	8	9	-	-	-
Exemplul 3	15	8	-	-	-	-

Testarea cantitativă a activității antimicrobiene a compușilor testați pe tulpini microbiene de referință și izolate din clinică

S-a realizat prin metoda microdiluțiilor seriale în mediu lichid (bulion nutritiv) în plăci cu 96 de godeuri, în vederea determinării valorii concentrației minime inhibitorii (CMI). Într-un volum de 100 μL de mediu lichid s-au realizat diluții seriale binare ale soluției stoc de compus realizată în DMSO (5 mg/mL), cuprinse între 0,500 și 0,0009 mg/mL. Ulterior godeurile au fost însămânțate cu câte 20 μL suspensie microbiană cu densitatea McFarland 0,5. Suspensiile microbiene au fost realizate în ser fiziologic steril din culturi de 24 h obținute pe geloză simplă. 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. După incubarea plăcilor la 37°C, timp de 24 h au fost analizate rezultatele obținute prin examinare macroscopică, iar concentrația cea mai mică de compus testat corespunzătoare ultimului godeu în care nu s-a mai observat dezvoltarea culturii microbiene a reprezentat valoarea CMI (mg/mL) pentru compusul respectiv. Rezultatele obținute la evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene a compușilor testați sunt prezentate în tabelul 3.

La interpretarea rezultatelor, se ține cont de faptul că o valoare CMI < 0,125 mg/mL indică o activitate antimicrobiană bună, o valoare CMI cuprinsă între 0,125-0,250 mg/mL o activitate antimicrobiană moderată și o valoare CMI > 0,250 mg/mL o activitate redusă.

2-[4-(4-Clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (I; X = Cl) a prezentat o activitate antimicrobiană bună față de tulpinile de *S. aureus* ATCC 6538 și *B. subtilis* ATCC 6683, iar 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (I; X = Br) o activitate antimicrobiană moderată față de tulpina de *S. aureus* ATCC 6538.

RO 134367 B1

Valorile CMI (mg/mL) ale compușilor testați

Tabelul 3

Tulpina microbiană	Compus testat	Valoare CMI (mg/mL)
<i>E. faecium</i> E5	Acid 2-[4-(fenilsulfoni)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = H)	0,5
	Acid 2-[4-(4-clorofenilsulfoni)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Cl)	0,5
	Acid 2-[4-(4-bromofenilsulfoni)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Br)	0,5
	Exemplul 1	0,5
	Exemplul 2	0,5
	Exemplul 3	0,5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Exemplul 2	0,125
	Exemplul 3	0,25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6683	Exemplul 2	0,125

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

În acest scop, plăcile cu 96 de godeuri utilizate pentru determinarea valorii CMI au fost golite și apoi spălate de două ori cu ser fiziologic steril, celulele aderate au fost fixate cu 100 μ L metanol 80% timp de 5 min, colorate cu soluție alcalină de cristal violet 1% (100 μ L/godeu) timp de 15 min și resuspendate în acid acetic 33% (prin barbotare), intensitatea suspensiei colorate fiind evaluată macroscopic.

Bacteriile posedă structuri de suprafață specializate denumite generic adezine, capabile să interacționeze în mod stereospecific cu receptorii de pe membrana celulei gazdă, similar interacției antigen-anticorp sau lectine-glicide. Aderența la un substrat reprezintă etapa inițială și esențială a formării unui biofilm microbial, care manifestă o rezistență crescută, atât la mecanismele de apărare ale gazdei, cât și la dozele convenționale de antibiotice și biocizi, celulele manifestând proprietatea de tolerență sau rezistență fenotipică față de substanțele antimicrobiene.

Valorile concentrației minime de eradicare a biofilmului (CMEB în mg/mL) determinate pentru compușii testați sunt prezentate în tabelul 4.

RO 134367 B1

Valorile CMEB (mg/mL) ale compușilor testați

Tabelul 4

Tulpina microbiană	Compus testat	Valoare CMEB (mg/mL)
<i>E. faecium</i> E5	Acid 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = H)	0,016
	Acid 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Cl)	0,125
	Acid 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Br)	0,063
	Exemplul 1	0,016
	Exemplul 2	0,125
	Exemplul 3	0,002
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Exemplul 2	0,125
	Exemplul 3	0,25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6683	Exemplul 2	0,5

Cu o excepție, toți compușii testați au prezentat o activitate antibiofilm bună sau moderată. Rezultatele au arătat că efectul inhibitor asupra sintezei de adevine microbiene s-a manifestat de la o concentrație de 0,002 mg/mL până la o concentrație de 0,25 mg/mL. Cea mai bună activitate antibiofilm a fost înregistrată în cazul tulpinii de *E. faecium* E5 pentru compușii: 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (I; X = Br) > 2-[4-(fenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-ona (I; X = H) = acidul 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = H) > acidul 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Br).

Investigarea influenței compușilor testați asupra sensibilității tulpinilor studiate la antibiotice

A fost realizată în mediu de cultură lichid steril. Suspensiile de *E. faecium* E5 și *S. aureus* ATCC 6538, cu densitate McFarland 0,5 au fost cultivate timp de 24 h, la 37°C în prezența unor concentrații subinhibitorii (0,25 mg/mL) ale tuturor compușilor testați (I și IV; X = H, Cl, Br), respectiv ale: 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei (I; X = Cl) și 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei (I; X = Br) și a martorului de DMSO. După incubare, culturile microbiene lichide au fost sedimentate prin centrifugare la 10000 g timp de 5 min, iar sedimentul celular obținut a fost spălat de 3 ori în ser fiziologic steril prin centrifugare la 10000 g timp de 5 min. Sedimentul celular a fost repus în suspensie în ser fiziologic steril până la obținerea unei turbidități corespunzătoare standardului McFarland 0,5. Suspensiile astfel obținute au fost utilizate ca inocul pentru testarea sensibilității la antibiotice prin metoda disc difuzimetrică standardizată, utilizând următoarele paneluri de chimioterapice: ampicilină (AM), penicilină (P), linezolid (LZD), vancomicină (VA) pentru *E. faecium* E5 și azitromicină (AZT), penicilină (P), vancomicină (VA), linezolid (LZD), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), clindamicină (DA), rimfapicină (RA), cefoxitin (FOX) pentru *S. aureus* ATCC 6538. Rezultatele au fost înregistrate după 24 h de incubare la 37°C. Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii bacteriene au fost interpretate conform recomandărilor ediției curente a standardului *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

RO 134367 B1

1 Rezultatele sunt prezentate în tabelele 5 și 6.

2 În cazul tulpinii de *E. faecium* E5, 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-
3 oxazol-5(4H)-ona (I; X = Br) a determinat o creștere a sensibilității tulpinii microbiene la AM,
4 P, LZD și VA. De asemenea, s-a constatat că toți ceilalți compuși testați nu au influențat sensi-
5 bilitatea la antibioticele testate, cu excepția acidului 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metil-
6 butanoic (IV; X = H), care a determinat o mărire a eficienței LZD.

7

8 *Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii obținute pentru cultura de E. faecium E5*
9 *cultivată în prezența concentrațiilor subinhibitorii de compuși*

Tabelul 5

Compus testat	Antibiotic testat/Diametrul zonei de inhibiție a creșterii (cm)			
	AM	P	LZD	VA
Acid 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = H)	2,4	1,3	2,8	1,9
Acid 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Cl)	2,1	1,2	2,5	1,8
Acid 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic (IV; X = Br)	2,2	1,3	2,5	1,7
Exemplul 1	2,3	1,2	2,7	1,8
Exemplul 2	2,3	1,3	2,7	1,9
Exemplul 3	2,9	1,5	3,9	2,3
DMSO	2,2	0	2,3	1,8
Martor de cultură <i>E. faecium</i> E5	2,4	1,4	2,7	1,9

25

26 În cazul tulpinii de *S. aureus* ATCC 6538, cultivată în prezența 2-[4-(4-clorofenil-
27 sulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei (I; X = Cl) s-a observat o creștere a zonei de
28 inhibiție în cazul AZT, P și FOX, iar în prezența 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-
29 1,3-oxazol-5(4H)-onei (I; X = Br) o creștere a diametrului la FOX.

30 *Diametrele zonelor de inhibiție a creșterii obținute pentru cultura de S. aureus ATCC*
31 *6538 cultivată în prezența concentrațiilor subinhibitorii de compuși*

32

Tabelul 6

Compus testat	Antibiotic testat/Diametrul zonei de inhibiție a creșterii (cm)							
	AZT	P	VA	LZD	SXT	DA	RA	FOX
Exemplul 2	1,9	3	1,5	2,6	0	2,3	1,2	2,5
Exemplul 3	1,5	0	2,1	2,9	0	2,3	1,9	2,1
DMSO	1,3	0	1,8	2,8	0	2	1,9	1,5
Martor de cultură: <i>S. aureus</i> ATCC 6538	1,5	0	2,3	3,2	0	2,6	2,1	2

43

Concluzii

S-au sintetizat și caracterizat trei noi derivați de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă, care conțin un substituent diarilsulfonil în poziția 2, cu formula generală I, prin ciclizarea unor noi intermediari aciclici din clasa N-acil- α -aminoacizilor, sub acțiunea cloroformiatului de etil și în prezență de N-metilmorfolină.

Evaluarea *in vitro* a citotoxicității utilizând biotestul *Daphnia magna* a pus în evidență faptul că noii compuși cu nucleu 1,3-oxazol-5(4H)-onic prezintă o oarecare toxicitate, aceasta indicând activitate biologică.

Comparând rezultatele obținute în cadrul testării activității antimicrobiene se observă că prin ciclizarea precursorilor aciclici din clasa N-acil- α -aminoacizilor la compușii heterociclici cu nucleu 1,3-oxazol-5(4H)-onic, la care se referă invenția, activitatea antibacteriană se menține cu aceeași intensitate față de tulpina gram-pozitivă *E. faecium* E5. De asemenea, se remarcă faptul că spectrul de activitate se lărgeste și la celelalte două tulpini gram-pozitive testate: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 și *Bacillus subtilis* ATCC 6683, care au fost active față de 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă, 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-3-oxazol-5(4H)-onă și respectiv față de 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă.

Din punct de vedere al potențialului antipatogenic, evaluarea influenței compușilor testați asupra dezvoltării de biofilme microbiene pe substrat inert a arătat că 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-ona a inhibat dezvoltarea biofilmului microbial de *E. faecium* E5 până la o concentrație de 0,002 mg/mL, iar 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-ona și 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-ona au manifestat efect inhibitor asupra sintezei de adezine microbiene produse de tulpina de *S. aureus* ATCC 6538 până la o concentrație de 0,125 mg/mL și respectiv de 0,25 mg/mL.

În cazul tulpinii de *E. faecium* E5 cultivată în prezența 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei, s-a observat faptul că acest compus a determinat o mărire a activității antimicrobiene a tuturor antibioticelor testate (AM, P, LZD și VA). Dintre noii intermediari aciclici din clasa N-acil- α -aminoacizilor, numai acidul 2-[4-(fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoic a determinat o mărire a zonei de inhibiție a creșterii tulpinii de *E. faecium* E5 în cazul linezolidului.

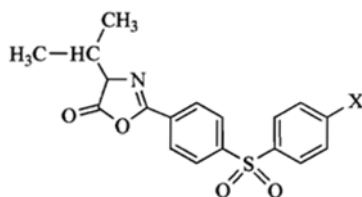
În cazul tulpinii de *S. aureus* ATCC 6538, cultivată în prezența 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei și 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onei, s-a observat faptul că acești compuși au determinat o mărire a activității antimicrobiene a AZT, P, FOX și respectiv a FOX.

Determinările biologice efectuate demonstrează efectul antimicrobial al derivaților de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4H)-onă, care conțin un substituent diarilsulfonil în poziția 2, cu formula generală I, prezentați în această invenție.

RO 134367 B1

Revendicări

1. Derivați de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(*H*)-onă, care conțin un substituent diarilsulfonil în poziția 2, cu formula generală I:



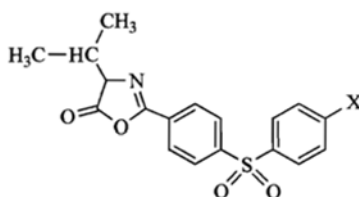
în care X este hidrogen, clor sau brom.

2. Derivat de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, este 2-[4-(fenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă.

3. Derivat de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, este 2-[4-(4-clorofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă.

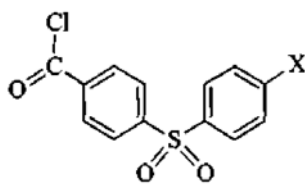
4. Derivat de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, este 2-[4-(4-bromofenilsulfonil)fenil]-4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă.

5. Procedeu de preparare a derivaților de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă cu formula structurală I, definiți în revendicarea 1:

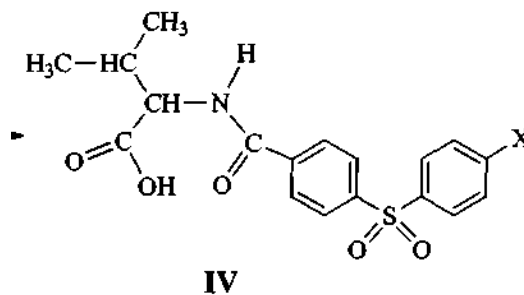


în care X este H, clor sau brom, **caracterizat prin aceea că**, acesta cuprinde etapele de:

a) reacție a acizilor 4-(4-X-fenilsulfonil)benzoici corespunzători cu clorură de tionil, în raport molar de 1:24, la reflux, cu obținerea clorurilor de 4-(4-X-fenilsulfonil)benzoil, cu formula III;



b) *N*-acilare a valinei dizolvate în soluție de hidroxid de sodiu cu cloruri de 4-(4-X-fenilsulfonil)benzoil, cu formula III, solubilizate în diclorometan anhidru, în prezență de hidroxid de sodiu, la un pH bazic, sub agitare, pe baie de gheață, timp de 30 min, apoi timp de 1 h la temperatura camerei pentru definitivarea reacției, urmată de acidularea stratului apos cu acid clorhidric, până la un pH acid, filtrarea precipitatului format; și purificarea prin recristalizare din apă a acizilor 2-[4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoici, cu formula IV;



c) heterociclizare a acizilor 2-[4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido]-3-metilbutanoici, cu formula IV, sub acțiunea cloroformiatului de etil, în prezență de 4-metilmorfolină, în raport echimolar, sub agitare, la temperatura camerei, timp de 30 min, în diclorometan anhidru, urmată de distilare a solventului și purificare prin recristalizare din ciclohexan, cu obținerea derivaților de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă, cu formula generală I.

6. Derivați de 4-izopropil-1,3-oxazol-5(4*H*)-onă cu formula structurală I, conform revendicării 1, pentru utilizare în terapia antimicrobiană.

