



MD 4878 B1 2023.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4878** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07D 235/30* (2006.01)
C07C 13/48 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/015 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A01N 43/52 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

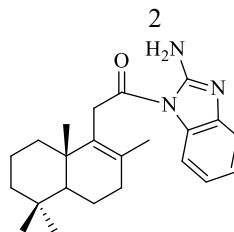
În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2022 0029 (22) Data depozit: 2022.05.30 (41) Data publicării cererii: 2023.11.30, BOPI nr. 11/2023	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2023.12.31, BOPI nr. 12/2023
(71) Solicitant: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: LUNGU Lidia, MD; CIOCÂRLAN Alexandru, MD; CUCICOVA Caleria, MD; BLAJA Svetlana, MD; ARÎCU Aculina, MD; VORNICU Nicoleta, RO (73) Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) 2-Amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoil)-benzimidazol cu proprietăți antifungice și antibacteriene

(57) Rezumat:

Invenția se referă la domeniul chimiei și medicinei, în special la un compus cu schelet hibrid terpenic și benzimidazolic, care poate găsi aplicare în medicină în calitate de preparat antifungic și antibacterian.

Conform invenției, se revendică compusul
2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoil)-benzimidazol cu formula:



care manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate la valori ale concentrației minime inhibitorii de 0,064 $\mu\text{g/mL}$ și 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectiv.

Revendicări: 2

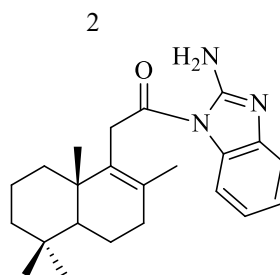
MD 4878 B1 2023.12.31

(54) 2-Amino-1-($\Delta^{8,9}$ -bicyclohomofarnesenoil)-benzimidazole with antifungal and antibacterial properties

(57) Abstract:

The invention relates to the field of chemistry and medicine, particularly to a compound with hybrid terpenic and benzimidazole skeleton, which can be used in medicine as an antifungal and antibacterial drug.

According to the invention, claimed is 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -bicyclohomofarnesenoil)-benzimidazole compound with the formula:



which has pronounced antifungal and antibacterial properties with minimum inhibitory concentration values of 0,064 $\mu\text{g/mL}$ and 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

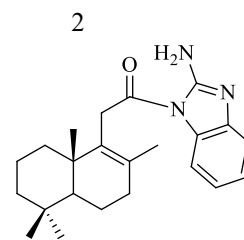
Claims: 2

(54) 2-Амино-1-($\Delta^{8,9}$ -бициклогомофарнезеноил)-бензимидазол с антигрибковыми и антибактериальными свойствами

(57) Реферат:

Изобретение относится к области химии и медицины, в частности к соединению с гибридным терпеновым и бензимидазоловым скелетом, которое может найти применение в медицине в качестве антигрибкового и антибактериального препарата.

Согласно изобретению, заявляется соединение 2-амино-1-($\Delta^{8,9}$ -бициклогомофарнезеноил)-бензимидазол с формулой:



которое обладает выраженными антигрибковыми и антибактериальными свойствами при значениях минимальной ингибирующей концентрации 0,064 $\mu\text{г/мл}$ и 0,5 $\mu\text{г/мл}$, соответственно.

П. формулы: 2

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Invenția se referă la compușii organici cu schelet hibrid terpenic și benzimidazolic, și anume la 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenol)-benzimidazol, care poate fi utilizat în calitate de compus cu proprietăți antifungice și antibacteriene.

Bolile infecțioase cauzate de fungi și bacterii au cunoscut o răspândire vertiginoasă în ultimii ani, devenind una dintre preocupările de maximă importanță în majoritatea țărilor din lumea întreagă. Majoritatea preparatelor antimicrobiene existente nu asigură vindecarea stabilă și completă a afecțiunilor. Tratamentele existente, ca regulă, nu conduc la dispariția definitivă a infecției, ci doar ameliorează temporar starea generală a pacienților, aceasta recidivând frecvent cu manifestări clinice mai pronunțate.

Dintre preparatele frecvent utilizate în practica medicală este bine cunoscută Caspofungina, un antifungic din clasa echinocandinelor, fiind utilizat în tratamentul următoarelor infecții fungice: candidemie sau alte infecții candidozice invazive și aspergiloză invazivă. Acest preparat inhibă sinteza (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanului și crește permeabilitatea membranelor celulare ale fungilor patogeni, fapt ce favorizează citoliza și ca urmare, moartea acestora [1].

Kanamicina este un antibiotic cu acțiune bactericidă din clasa aminoglicozidelor, fiind utilizat în tratamentul unor infecții bacteriene. Printre acestea se numără infecțiile produse de *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella pneumoniae* și *Acinetobacter baumannii* [2].

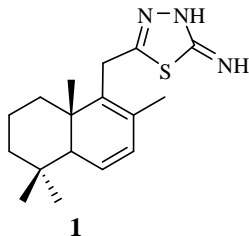
Preparatele menționate însă au și un șir de dezavantaje, ce constau în:

- eficiență redusă a preparatului;
- provoacă reacții alergice și iritații în locul aplicării;
- tulburări renale și ale căilor urinare;
- intoleranță gastro-intestinală, etc.

Prin urmare, există o necesitate stringentă de a proiecta noi structuri moleculare cu proprietăți antimicrobiene, care ar putea servi pentru obținerea unor preparate medicinale noi și eficiente în tratamentul infecțiilor provocate de fungi și bacterii. Produsele naturale reprezintă o sursă importantă de compuși noi biologic activi. Originea naturală a acestora presupune biocompatibilitate, activitate biologică selectivă și toxicitate redusă. Terpenoidele sunt tocmai astfel de compuși naturali sau obținuți prin sinteză, cu o aplicare largă în medicină, farmaceutică, cosmetică și agricultură. Un loc aparte le revine compușilor cu schelet combinat terpenic și heterociclic care manifestă bioactivitate superioară față de medicamentele cunoscute.

În calitate de cea mai apropiată soluție este cunoscut compusul hibrid **1** cu proprietăți biologice, care conține scheletul homodrimdianic și suplimentar unitatea structurală 2-imino-1,3,4-tiadiazolică nesubstituită la atomul de azot lateral [3].

Acest compus a fost testat *in vitro* atât pe tulpinile de fungi (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*) cât și pe speciile de bacterii Gram-pozitive (*Bacillus* sp.) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*). Autorii au stabilit că compusul sintetizat, 5-(homodrim-6,8-dien-11-il)-1,3,4-tiadiazol-2(3H)-imina **1**, cu formula:



manifestă o activitate antifungică și antibacteriană ridicată în raport cu preparatele medicamentoase de referință Caspofungina și Kanamicina. Reieșind din proprietățile biologice și structura sa hibridă constituită din unități structurale relativ apropiate, compusul **1** poate fi selectat în calitate de analog proxim. Compusul revendicat **4** se deosebește de analogul proxim **1** prin faptul că unitatea sa structurală terpenică nu este homodrimandianică, ci bishomodrimenică cu grupa cetonică în poziția C₁₂, iar fragmentul structural heterociclic este un 2-amino-benzimidazol substituit la atomul de azot N₁, versus 1,3,4-tiadiazol-2-imina nesubstituită la atomul de azot lateral.

Dezavantajul analogului proxim, constă în activitatea antifungică și antibacteriană mai redusă în comparație cu compusul revendicat.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în lărgirea gamei de compuși enantiopuri cu schelet hibrid terpeno-benzimidazolic, cu activitate antifungică și antibacteriană înaltă. De o importanță primordială separată este faptul că materia primă de bază este autohtonă, renovabilă și ușor accesibilă, reprezentând deșeurile din industria uleiurilor eterice.

5 Esența invenției constă în obținerea unui compus nou, terpeno-benzimidazolic 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolul (**4**), care poate fi utilizat pentru tratarea unor afecțiuni de natură fungică și bacteriană.

Avantajele compusului revendicat constau în:

10 1. Activitatea antimicrobiană mai ridicată a 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolului în raport cu preparatele comerciale Caspofungina și Kanamicina;

2. Accesibilitatea compusului revendicat sub aspect eficiență/preț;

3. Accesibilitatea materiei prime și originea ei locală;

4. Componenta heterociclică folosită în reacția de cuplare cu componenta terpenică, 2-aminobenzimidazolul, este un reagent comercial, accesibil și ieftin.

15 Invenția soluționează problema prin aceea că 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazol (**4**), ce posedă un schelet hibrid terpenic și benzimidazolic poate fi utilizat în calitate de compus cu proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate, fapt confirmat de testările biologice a acestuia *in vitro* pe tulpinile de fungi (*Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium frequentans* și *Alternaria alternata*). Totodată compusul revendicat a fost testat și pe ambele

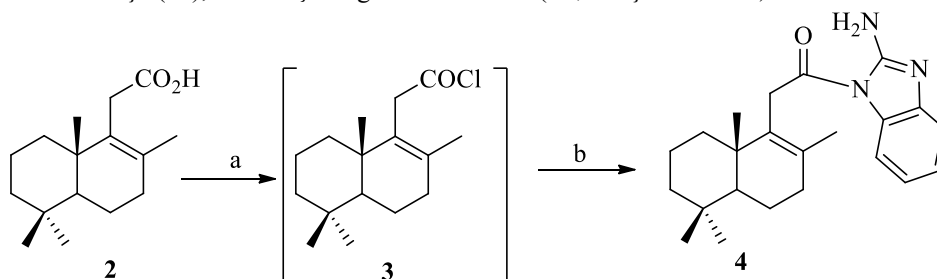
20 tipuri de specii de bacterii Gram-positiv (*Bacillus* sp.) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*).
Avantajul compusului revendicat constă în faptul că el posedă o activitate antifungică și antibacteriană superioară în raport cu preparatul cunoscut Caspofungina și Kanamicina, și în raport cu analogul proximal.

25 Este necesar de menționat, că compusul 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolul (**4**) revendicat, dar și rezultatele testărilor biologice ale acestui compus nu au fost descrise anterior în literatura de specialitate.

În calitate de materie primă pentru obținerea compusului revendicat a fost utilizată (+)-sclareolida accesibilă comercial, care în șase etape a fost transformat în acidul $\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenic **2**, cu un randament total de 62 %, în conformitate cu metoda descrisă în literatură (Aricu A.N., Kuchkova K.I., Barba A.N., Dragalin I.P., Shova S.G., Vornicu N., Gorincioi E.K., Secara E.S., Lungu L.V., Niculaua M., Ungur N.D., Vlad P.F. Synthesis from norambreinolide, structure, and antimicrobial activity of dihomodrimane sesquiterpenoids with azine, hydrazide, and dihydrazide fragments. Chem. Nat. Compd., 2016, vol. 52, nr. 6, p. 1029-1036).

35 În continuare, acidul **2** a fost tratat *in situ* cu clorură de oxalil în benzen anhidru ce a condus la cloranhidrida acidului $\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenic **3**, care în continuare a fost supusă reacției de cuplare cu 2-aminobenzimidazolul, în clorură de metilen la agitare, cu formarea 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolului **4** revendicat, cu un randament de 85% (Schema 1).

Structura compusului revendicat a fost confirmată prin metode de analiză obligatorii, spectroscopie în infraroșu (IR), rezonanță magnetică nucleară (^1H , ^{13}C și ^{15}N RMN).



40 Reagenți și condiții: a. $(\text{COCl})_2$, C_6H_6 , 20°C , o oră, Δ , o oră; b. 2-Aminobenzimidazol, CH_2Cl_2 , 20°C , 3 ore, Δ , 4 ore, 85%.

Schema 1. Sinteza 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolului (**4**).

45 În rezultatul testărilor biologice s-a demonstrat că 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolul (**4**) manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene excelente la valori ale concentrației minime inhibitorie (CMI, $\mu\text{g/mL}$) de 0,064 și 0,5, respectiv, care sunt net superioare celor caracteristice compuşilor de referință Caspofungina și Kanamicina (vezi tabelul).

Compusul revendicat **4** este stabil în contact cu aerul, parțial solubil în alcoolii, solubil în dimetilsulfoxid (DMSO), clorura de metilen, acetat de etil și acetonă.

Exemplu de realizare a invenției

Sinteza 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolului (**4**).

5 La soluția formată din acidul **2** (100 mg, 0,4 mmol) în benzen anhidru (2 mL) se adaugă (COCl)₂ (0,4 mL) în benzen anhidru (1 mL). Amestecul de reacție se agită o oră la 20°C, după care se refluxează timp de o oră. Benzenul și excesul de clorură de oxalil se distilează la presiune redusă. La reziduul format se adaugă soluția 2-aminobenzimidazolului (109 mg, 0,8 mmol) în diclorometan anhidru (10 mL). Amestecul de reacție se agită la 20°C, timp de 3 ore, după care se refluxează timp de 4 ore. Sedimentul
10 format se filtrează și se spală cu CH₂Cl₂. Filtratul se distilează până la uscat, iar reziduul obținut se recrystalizează din hexan cu formarea aminei **4** (124 mg, randament 85%), compus cristalin, p.t. 91-92°C; $[\alpha]_D^{20} = 67.98^\circ$ ($c=2.7$, CHCl₃).

Structura compusului **4** a fost confirmată de datele analizelor spectrale:

15 Spectroscopie în IR (ν , cm⁻¹): 688, 719, 739, 753, 805, 894, 1056, 1064, 1076, 1110, 1164, 1262, 1298, 1336, 1394, 1461, 1540, 1599, 1656, 1709, 2922, 2960, 3431, 3676.

Rezonanță magnetică ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz, ppm, J/Hz): δ 0.85 (3H, s, H-15), 0.92 (3H, s, H-14), 1.01 (3H, s, H-16), 1.33 (1H, dd, J 12.5, J 1.3, H-5), 1.54 (3H, s, H-13), 3.67 (1H, d, J 12.2, H-11 α), 3.72 (1H, d, J 19.2, H-11 β), 7.0 (2H, s.l., NH₂), 7.11 (1H, t, J 8.1, H-19), 7.26 (1H, t, J 7.5, H-20), 7.37 (1H, d, J 7.7, H-21), 7.48 (1H, d, J 8.2, H-18).

20 Rezonanță magnetică ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz, ppm): δ 18.79 (C-2), 18.88 (C-6), 20.04 (C-16), 20.14 (C-13), 21.60 (C-15), 33.06 (C-14), 33.27 (C-4), 33.4 (C-7), 36.0 (C-1), 37.40 (C-11), 38.35 (C-10), 41.42 (C-3), 51.43 (C-5), 113.25 (C-18), 117.0 (C-21), 120.58 (C-19), 124.86 (C-20), 129.82 (C-17), 131.71 (C-8), 132.35 (C-9), 142.99 (C-22), 154.90 (C-23), 173.25 (C=O).

Rezonanță magnetică ¹⁵N RMN (CDCl₃, 40.54 MHz, ppm): δ 191 (>C=N-).

25 Testarea activității biologice a 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolului (**4**).

Activitatea biologică a compusului revendicat a fost testată *in vitro* pe 5 specii de fungi (*Aspergillus niger* ATCC 53346, *Fusarium solani* ATCC 20327, *Penicillium chrysogenum* ATCC 20044, *Penicillium frequentans* ATCC 10110 și *Alternaria alternata* ATCC 8741) provenite din culturi pure și 2 specii de bacterii: Gram-pozitive (*Bacillus* sp. ATCC 15970) și Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27813). Rezultatele testării activității biologice exprimate în valori CMI (concentrația minimă inhibitoare) sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Tabel.

Rezultatele testării activității antimicrobiene a 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoi)-benzimidazolului (**4**)

Compusul	Concentrație minimă inhibitoare (CMI, $\mu\text{g/mL}$)						
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Compusul revendicat 4	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,5	0,5
Casprofungina 0,25 $\mu\text{g/mL}$	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-
Kanamicina 4,0 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	2,0	2,0
Analog proxim 1	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	2,5	2,5

35

Microorganismele au fost furnizate de American Type Culture Collection (ATCC), USA.

Se pregătește soluția compusului revendicat în DMSO cu o concentrație de 0,5%. Pentru aceste determinări se utilizează plăci Petri cu mediul de cultură de tip agar Sabouraud cu 4% dextroză (SDA) pentru fungi și mediu agar nutritiv Standard I pentru bacterii de la firma Merck (Schwalbach Hesse, Germania).

40 Conform procedurilor standard de cultivare (SR-EN 1275:2006 și NCCLS guidelines) [National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Antimicrobial Susceptibility Standards (ATS) 2003, for M7 (CMI) and M100] se aplică metoda diluțiilor succesive pentru pregătirea suspensiei de microorganisme [Carrillo R., Martin V.S., López M., Martin T. Synthesis and cation complexation properties of new macrolides. Tetrahedron, 2005, vol. 61, nr. 34, p. 8177-8191].

45

Caspofungina (strip test) se utilizează ca un compus standard de referință pentru activitatea antifungică și Kanamicina (strip test) se utilizează pentru activitate antibacteriană. Compușii standard sunt furnizați de firma Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Italia).

- 5 Încărcătura finală a inoculului-stoc astfel pregătit este de 1×10^{-4} $\mu\text{g/mL}$. Plăcile inoculate se incubează la temperatura de 30°C timp de 7 zile. Primele observații se fac după 48 de ore, iar analiza finală după 7 zile, stabilindu-se concentrația minimă inhibitorie (CMI) și densitatea viabilă a microorganismelor prezente. Valorile CMI se citesc direct pe banda standard în punctul în care marginea elipsei de inhibiție intersectează banda pentru fiecare tip de microorganisme.

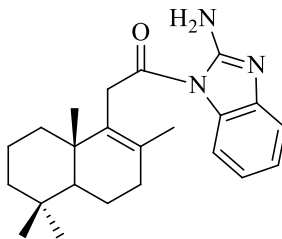
- 10 Rezultatul invenției este condiționat de sinteza unui compus hibrid nou 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohofarnesenoil)-benzimidazolul (**4**), ce posedă proprietăți antifungice și antibacteriene pronunțate.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Desnos-Ollivier M. et al. Detection of Caspofungin resistance in *Candida* spp. by Etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, vol. 46 (7), p. 2389-2392.
2. Van den Broek P.J. et al. Influence of human monocytes on the antibacterial activity of kanamycin and gentamicin for *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1986, vol. 29 (6), p. 1032-1039.
3. MD 4765 B1 2021.08.31

(57) Revendicări:

1. Compus 2-amino-1-($\Delta^{8,9}$ -biciclohofarnesenoil)-benzimidazol cu formula:



2. Compus, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că manifestă proprietăți antifungice și antibacteriene.