



MD 4712 B1 2020.09.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4712** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *A61K 31/60* (2006.01)
A61K 31/30 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
C07C 65/10 (2006.01)
C07F 1/08 (2006.01)
C07F 3/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In 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 2019 0081 (22) Data depozit: 2019.11.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.09.30, BOPI nr. 9/2020
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MECC, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: GORINCIOI Viorina, MD; LOZAN Vasile, MD; BURDUNIUC Olga, MD; BALAN Greta, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GULEA Aurelian, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MECC, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	
(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

(54) Utilizarea tetrasalicilatului de bariu-cupru în calitate de inhibitor al proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea unui compus coordinativ biologic activ din clasa carboxilaților heterometalici, care selectiv inhibă proliferarea fungilor *Cryptococcus neoformans* și poate găsi aplicare în medicină și veterinarie la profilaxia și tratarea micozelor.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans* a compusului

2
heterobinuclear aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimetilacetamid-1κO)-tetrakis(μ-salicilato-1κO:2κO?)-bariu(II)cupru(II).

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la compusul sus-indicat a activității fungistatice și fungicide față de fungii *Cryptococcus neoformans* în limitele concentrațiilor de 0,10...0,20 μg/mL.

Revendicări: 1

MD 4712 B1 2020.09.30

(54) Use of barium-copper tetrasalicylate as *Cryptococcus neoformans* fungi proliferation inhibitor

(57) Abstract:

1
The invention relates to chemistry and medicine, namely to the use of a biologically active coordination compound of the class of heterometallic carboxylates, which selectively inhibits the reproduction of *Cryptococcus neoformans* fungi, and can find application in medicine and veterinary medicine for the prevention and treatment of mycoses.

Summary of the invention consists in the use as *Cryptococcus neoformans* fungi proliferation inhibitor of the heterobinuclear

2
compound aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimethylacetamide-1κO)-tetrakis(μ-salicylato-1κO:2κO?)-barium(II)copper(II).

The technical result of the invention consists in detecting in the above-mentioned compound of the fungistatic and fungicidal activity against *Cryptococcus neoformans* fungi within the concentration range of 0.10...0.20 μg/mL.

Claims: 1

(54) Применение тетра­салицилата бария-меди в качестве ингибитора размножения грибов *Cryptococcus neoformans*

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к химии и медицине, а именно к применению биологически активного координационного соединения класса гетерометаллических карбоксилатов, которое селективно ингибирует размножение грибов *Cryptococcus neoformans*, и может найти применение в медицине и ветеринарии для профилактики и лечения микозов.

Сущность изобретения заключается в применении в качестве ингибитора размножения грибов *Cryptococcus*

2
neoformans гетеробиядерного соединения аква-2κO-тетра­кис(N,N-диметилацетамид-1κO)-тетра­кис(μ-салицилато-1κO:2κO?)-барий(II)медь(II).

Технический результат изобретения заключается в выявлении у вышеуказанного соединения фунгистатической и фунгицидной активности в отношении грибов *Cryptococcus neoformans*, в пределах концентраций 0,10...0,20 мкг/мл.

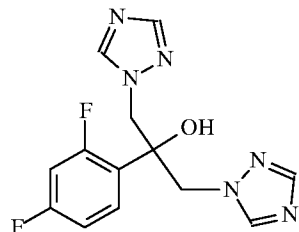
П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la utilizarea unui compus
 10 coordonativ biologic activ din clasa carboxilaților heterometalici, care selectiv inhibă
 proliferarea fungilor *Cryptococcus neoformans* și poate găsi aplicare în medicină și
 veterinarie la profilaxia și tratarea micozelor.

Genul *Cryptococcus* cuprinde peste 50 de specii, doar speciile *Cryptococcus*
 10 *neoformans* și *Cryptococcus gattii* fiind agenți patogeni importanți la om. În corpul gazdei
 și pe majoritatea mediilor de cultură celula levurică este înconjurată de o capsulă groasă
 polizaharidică, care determină rezistența la fagocitoză. Riscul de infectare cu criptococ
 15 apare la dereglarea imunității T-celulare: infecția HIV/SIDA, limfoamele, leucemiile
 limfocitare cronice, sarcoidoza, transplantul de organe, tratamentele îndelungate cu
 glucocorticosteroizi și cu imunosupresoare, chimioterapia antitumorală. Alți factori
 predispozanți sunt diabetul zaharat, patologia renală și hepatică, fumatul. Rata de letalitate
 de la *Cryptococcus neoformans* este mare: letalitatea în meningoencefalită fără tratament
 este de 100%. La supraviețuitori sunt frecvente sechelele neurologice, inclusiv pierderea
 vederii, scăderea funcției mentale, hidrocefalia și paraliziiile nervilor cranieni. La
 imunocompromiși criptococoza necesită terapie antifungică sistemică îndelungată.

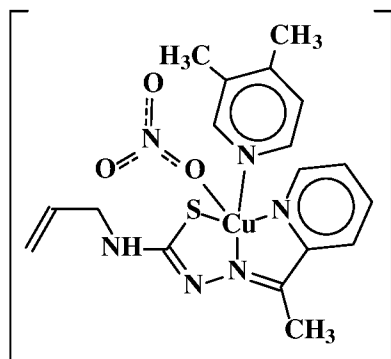
20 Pentru terapia infecțiilor sistematice în medicină sunt utilizați azolii, cu
 reprezentantul de seamă fluconazolul:



Toți azolii sunt fungistatici, dar în funcție de doză, pot fi și fungicizi, totodată
 25 eficienți împotriva speciilor de *Candida* și *Cryptococcus*. Cu toate aceste progrese, terapia
 antifungică, ca și cea antibacteriană, semnaleză apariția fenomenului de rezistență la
 preparatele actuale.

Fluconazolul inhibă creșterea și multiplicarea majorității micetelor levuriforme la
 concentrația de 16 μg/mL, însă nu poate fi utilizat în cazurile, când este necesară o
 30 activitate antimicotică mai înaltă a preparatului față de fungii susnumiți [1].

Din toți compușii chimici, care inhibă creșterea și multiplicarea fungilor
 35 *Cryptococcus neoformans*, cel mai înalt efect antifungic a fost obținut în cazul nitrato- $\{N$ -
 (prop-2-en-1-il)- N' -[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamohidrazontioato}- $\{3,4$ -
 dimetilpiridin)cupru [2] cu formula:

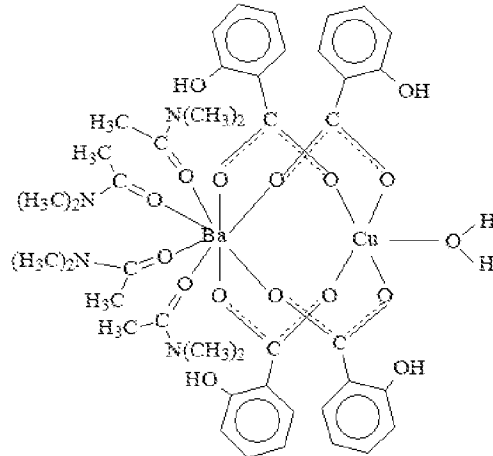


35 După activitatea antimicotică față de fungii *Cryptococcus neoformans* acest compus
 depășește de 133 ori caracteristicile respective ale fluconazolului, utilizat actualmente în
 medicină pentru tratarea și profilaxia micozelor. Dezavantajul nitrato- $\{N$ -
 (prop-2-en-1-il)- N' -[1-(piridin-2-il)etiliden]carbamohidrazontioato}- $\{3,4$ -
 dimetilpiridin)cupru constă în faptul, că el nu posedă o activitate antimicotică suficient de înaltă și din această cauză

compusul dat nu a găsit o aplicare în medicină sau veterinarie. Totodată ligandul utilizat este destul de scump.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de inhibitori ai proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans* pe bază de compuși coordinațivi cu liganzi simpli și ieftini și cu activitate antimicotică înaltă.

Esența invenției constă în utilizarea în calitate de inhibitor al proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans* a tetrasalicilatului de bariu-cupru cu formula:



Structura, proprietățile fizico-chimice și procedeul de obținere a acestui tetrasalicilat de bariu-cupru sunt descrise în literatura științifică (Горинчой В. В., Симонов Ю. А., Шова С. Г., Шофрански В. Н., Туртэ К. И. Кристаллические и молекулярные структуры двухядерных {Cu-M, M=Cu, Sr, Ba} комплексов на основе салициловой кислоты. Ж. структ. химии, 2009, v. 50, № 6, p. 1196-1202). Totodată informația despre structura lui cristalină a fost înregistrată în baza de date Cambridge sub numărul 695770.

Tetrasalicilatul de bariu-cupru posedă o structură de tip „felinar”, în care ionii de bariu(II) și cupru(II) sunt legați prin punți de salicilat cu utilizarea grupărilor carboxilice. Totodată moleculele de dimetilacetamid se coordonează la ionul de bariu(II), iar molecula de apă – la ionul de cupru(II). Reieșind din structura de mai sus, conform nomenclurii IUPAC, compusul poate fi numit aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimetilacetamid-1κO)-tetrakis(μ-salicilato-1κO:2κO?-bariu(II)cupru(II).

Rezultatul tehnic al invenției constă în stabilirea la aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimetilacetamid-1κO)-tetrakis(μ-salicilato-1κO:2κO?)bariu(II)cupru(II) a activității fungistatice și fungicide față de fungii *Cryptococcus neoformans*, ce depășește de 160 ori activitatea fluconazolului utilizat în medicină și de 1,2 ori depășește activitatea analogului proxim.

Rezultatul tehnic al invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de inhibitor al proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans* se propune un compus coordinațiv din clasa carboxilaților heterometalici.

Un avantaj al invenției revendicate, pe lângă activitatea mai înaltă și selectivitate față de specia *Cryptococcus neoformans*, constă în aceea că compușii inițiali pentru obținerea acestui tetrasalicilat de bariu-cupru sunt ușor accesibili și ieftini.

Exemple de realizare a invenției

Sinteza aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimetilacetamid-1κO)-tetrakis(μ-salicilato-1κO:2κO?)bariu(II)cupru(II)

Sinteza compusului utilizat în revendicare s-a realizat în fond conform procedeului dezvoltat anterior (Горинчой В. В., Симонов Ю. А., Шова С. Г., Шофрански В. Н., Туртэ К. И. Кристаллические и молекулярные структуры двухядерных {Cu-M, M=Cu, Sr, Ba} комплексов на основе салициловой кислоты. Журнал структурной химии, 2009, v. 50, № 6, p. 1196-1202), după cum urmează.

La o soluție de 7,11 g (16,55 mmol) de salicilat de bariu monohidrat (Ba(SalH)₂·H₂O) în 25 mL metanol s-a adăugat la temperatura camerei și agitare constantă 1 g (4,13 mmol) de Cu(NO₃)₂·H₂O. După 30 de min soluția se filtrează și se evaporă complet pe o baie de apă. Masa uscată obținută se tratează cu un amestec de solvenți format

din 18 mL tetrahidrofuran și 7 mL N,N-dimetilacetamid și se amestecă 20 de min la temperatura camerei. Soluția obținută de culoare verde-închis se filtrează și se lasă să se evapore la temperatura camerei pentru 7 zile, timp în care se depun cristale albastre-închise sub formă de prizme. După separare și uscare se obțin 4,23 g (91%) de compusul sus-

5

indicat.

Rezultatele analizei elementale:

Găsit, %: C 47,22; H 5,23; N 4,76.

Calculat pentru $C_{44}H_{58}BaCuN_4O_{17}$, %: C 47,36; H 5,23; N 5,02.

10 Exemplu de utilizare a aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimetilacetamid-1κO)-tetrakis(μ-salicilato-1κO:2κO?)bariu(II)cupru(II) în calitate de inhibitor al proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans*

Proprietățile antimicotice ale tetrasalicilatului de bariu-cupru sus-indicat au fost cercetate *in vitro* pe tulpina de laborator de micete levuriforme *Cryptococcus neoformans*. Activitatea antimicotică s-a determinat, utilizând mediul RPMI 1640 suplimentat cu glucoză. Inoculul se pregătea din subcultura de 48 ore cultivată pe Agar Sabouraud, în apă distilată sterilă, până la o densitate de 0,5 McFarland (cca. $(2...5) \cdot 10^6$ UFC/mL), după care se efectua o a doua diluție cu apă distilată sterilă de 1:10, obținându-se inoculul final. Rezultatul final se interpreta prin folosirea unui spectofotometru, înregistrându-se absorbanta fiecărui godeu la 405 nm. CMI-ul se calcula ca fiind cea mai mică concentrație care inhibă creșterea (comparativ cu martorul pozitiv).

20

Rezultatele studiului activității antiproliferative a compusului revendicat sunt prezentate în Tabel, din care se vede, că el posedă activitate fungistatică și fungicidă față de micete levuriforme *Cryptococcus neoformans* în limitele concentrațiilor 0,10...0,20 μg/mL. Trebuie de menționat, că paralel cu proprietățile antifungice au fost cercetate și proprietățile lui bacteriostatice și bactericide față de tulpinile standard de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, micete levuriforme *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* și *Candida albicans*. În toate aceste cazuri concentrația minimă de inhibare (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CMB) aveau valori mai mari de 10,0 mg/mL. Același tablou se observă și pentru dimerul cuprului respectiv dezvăluit în sursa sus-indicată.

25

Aceste date experimentale vorbesc despre selectivitatea activității antifungice a aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimetilacetamid-1κO)-tetrakis(μ-salicilato-1κO:2κO?)bariu(II)cupru(II) față de micete levuriforme *Cryptococcus neoformans*. Acest fapt este neobișnuit, având în vedere că tetrasalicilatul include cupru, care este un element cu un spectru larg de activitate fungicidă. După cum reiese din tabelul de mai jos, complexul studiat manifestă o activitate antimicotică, ce depășește de 160 ori activitatea fluconazolului, utilizat în medicină, și respectiv de 1,2 ori activitatea analogului proxim.

30

35

40

Proprietățile depistate ale compusului nominalizat prezintă interes din punct de vedere al extinderii arsenalului de remedii antimicotice și permite utilizarea lui în cazul rezistenței fungilor față de medicamentele tradiționale.

Tabel

Concentrația minimă de inhibare (CMI) și concentrația minimă fungicidă (CMF) (μg/mL) a compusului utilizat în comparație cu fluconazolul și analogul proxim

45

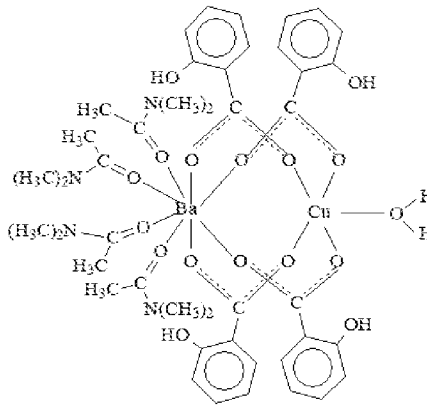
Tulpina	Compusul utilizat		Fluconazol		Analogul proxim	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Cryptococcus neoformans</i> CECT 1043	0,10	0,20	16,0	-	0,12	0,24

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. Bastos T.D.O., Maria Soares B., Silva Cisalpino P., Castro Mendes I., dos Santos R.G., Beraldo H. Coordination to gallium(III) strongly enhances the potency of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones against *Cryptococcus* opportunistic fungi. *Microbiological Research*, 2010, v. 165, 7, p. 573-577
2. MD 4621 B1 2019.02.28

(57) Revendicări:

Utilizare a compusului aqua-2κO-tetrakis(N,N-dimetilacetamid-1κO)-tetrakis(μ-salicilato-1κO:2κO)-bariu(II)cupru(II) cu formula:



în calitate de inhibitor al proliferării fungilor *Cryptococcus neoformans*.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2019 0081

(22) Data depozit: 2019.11.13

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE CHIMIE AL MECC, MD; UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD**

(54) **Titlul: Utilizarea tetrasalicilatului de bariu-cupru în calitate de inhibitor al proliferării fungilor din specia *Cryptococcus neoformans***

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *A61K 31/60* (2006.01) *C07C 65/10* (2006.01)

A61K 31/30 (2006.01) *C07F 1/08* (2006.01)

A61K 31/16 (2006.01) *C07F 3/00* (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

A61K 31/60, A61K 31/30, A61K 31/16, A61P 31/10

Cryptococcus, dimetilacetamid, tetrasalicilat, tetrakis, Cu, Ba, antifungic

"Worldwide" (Espacenet), Patsearch:

A61K 31/60, A61K 31/30, A61K 31/16, A61P 31/10

Cryptococcus, dimethylacetamide, salicylate, tetrakis, Cu, Ba, antifungal

EA, CIS (Eapatis):

A61K 31/60, A61K 31/30, A61K 31/16, A61P 31/10

Cryptococcus, диметилацетат, салицилат, тетракис, Cu, Ba, противогрибковый

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

www.google.com

Google Scholar

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	Bastos T.D.O., Maria Soares B., Silva Cisalpino P., Castro Mendes I., dos Santos R.G., Beraldo H. Coordination to	1

	gallium(III) strongly enhances the potency of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones against <i>Cryptococcus</i> opportunistic fungi. <i>Microbiological Research</i> , 2010, v. 165, 7, p. 573-577	
A, D, C	MD 4621 B1 2019.02.28	1
A	MD 4667 B1 2019.12.31	1
A	MD 4675 B1 2020.02.29	1
A	MD 4696 B1 2020.05.31	1
A	US 6156779 A 2000.12.05	1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția	
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet	
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție	
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete	
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri	
Data finalizării documentării	09.07.2020	
Examinator	GUȘAN Ala	