

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **211948**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **383162**

(51) Int.Cl.
C07F 9/09 (2006.01)
C07H 11/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **17.08.2007**

(54)

N-alkilowe pochodne 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

02.03.2009 BUP 05/09

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.07.2012 WUP 07/12

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANNA MELCER, Wejherowo, PL

BEATA LIBEREK, Sopot, PL

ANDRZEJ WIŚNIEWSKI, Gdańsk, PL

ROLAND WAKIEĆ, Gdańsk, PL

SŁAWOMIR MILEWSKI, Gdańsk, PL

PL 211948 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są *N*-alkilowe pochodne 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu o właściwościach przeciwgrzybowych.

Wynalazek dotyczy modyfikacji 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu (ADGP), polegających na alkilowaniu grupy aminowej, albowiem tego rodzaju modyfikacje w znacznym stopniu zwiększają właściwości przeciwgrzybowe związków w stosunku do wyjściowego ADGP.

Komórki grzybów, z uwagi na podobieństwo w budowie do komórek zwierzęcych, są trudną do zwalczania przyczyną infekcji, potocznie zwanych grzybicami. W ciągu ostatnich dwudziestu lat częstotliwość infekcji wywoływanych przez grzyby wzrosła dramatycznie. Ponadto coraz więcej drobnoustrojów powodujących infekcje staje się opornych na dotychczas skuteczne preparaty, takie jak np. Flukonazol czy Ketokonazol. Oczywistą potrzebą współczesnej medycyny jest poszukiwanie nowych związków, potencjalnych chemoterapeutyków przeciwgrzybowych.

Syntaza glukozamino-6-fosforanu (syntaza GlcN-6P) jest enzymem katalizującym jeden z istotnych etapów biosyntezy chityny w komórkach grzybów, przez co stanowić może cel molekularny dla związków przeciwgrzybowych. Z kolei, 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforan, zwany w skrócie ADGP, jest znanym i opisanym w literaturze silnym inhibitorem syntazy glukozamino-6-fosforanu. Struktura tego związku wykazuje podobieństwo do struktury postulowanego stanu przejściowego reakcji katalizowanej przez syntazę GlcN-6P.

Pomimo, że ADGP jest silnym inhibitorem enzymu, to wykazuje on bardzo słabą aktywność przeciwgrzybową. Janiak i Wspóln. stwierdzili, że przyczyną tego faktu jest bardzo wolne wnikanie związku do komórek grzybowych. (A.M. Janiak, M. Hoffmann, M.J. Milewska, S. Milewski, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11, 1653).

Obecność w cząsteczce ADGP ujemnie naładowanej reszty fosforanowej i dodatnio naładowanej reszty aminowej jest niezbędna do skutecznego oddziaływania z centrum aktywnym enzymu. Hydrofilowość tych grup uniemożliwia jednak praktycznie transport związku na drodze biernej dyfuzji przez błonę cytoplazmatyczną do wnętrza komórki, a nie istnieją w komórkach grzybowych systemy transportu aktywnego przenoszące związki typu ADGP.

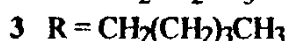
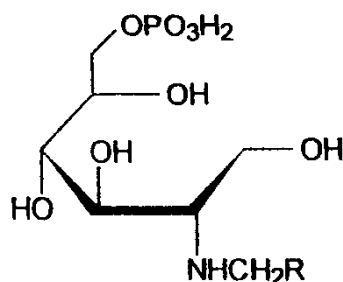
Z artykułu Floquet, Nicolas; Richez, Celine; Durand, Philippe; Maigret, Bernard; Badet, Bernard; Badet-Denisot, Marie-Ange zamieszczonego w *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*; vol. 17; nb.7; 2007 r, na str. 1966 - 1970 ujawnionego on-line dnia 25 stycznia 2007 r, znany jest związek oznaczony jako *N*-etylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforan.

Poszukując możliwości zwiększenia aktywności przeciwgrzybowej ADGP zsyntetyzowano, a następnie przebadano szereg jego pochodnych, które charakteryzowały się większą lipofilowością, w tym pochodne *N*-acylowe i estrowe (tamże A.M. Janiak, M. Hoffmann, M.J. Milewska, S. Milewski, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11, 1653). Zakładano, że zmodyfikowane pochodne mogłyby działać na zasadzie tzw. „pro-leku”, tzn. być metabolizowane przez enzymy wewnątrzkomórkowe z odtworzeniem pierwotnej postaci inhibitora, niezbędnej do jego oddziaływania z syntazą GlcN-6P. Jednakże okazało się, że wewnątrzkomórkowa deacylacja *N*-acylowych pochodnych ADGP jest bardzo wolna, co powodowało w efekcie niską aktywność przeciwgrzybową tych związków. Z kolei estrowe pochodne ADGP, wykazujące nieco lepszą aktywność przeciwgrzybową, są związkami stosunkowo nietrwałymi, co wyklucza możliwość ich praktycznego zastosowania.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie opracowania nowych pochodnych ADGP wykazujących aktywność przeciwgrzybową w wyniku połączenia zdolności do przechodzenia przez błonę cytoplazmatyczną z wysokim potencjałem inhibicyjnym wobec syntazy GlcN-6P, ale bez konieczności wewnątrzkomórkowego metabolizmu. Według wynalazku zakłada się, że cel ten osiągnięty zostanie w wyniku modyfikacji cząsteczki wyjściowej w sposób zwiększający jej lipofilowość, ale nie zmieniający stanu jonizacji grupy aminowej i fosforanowej.

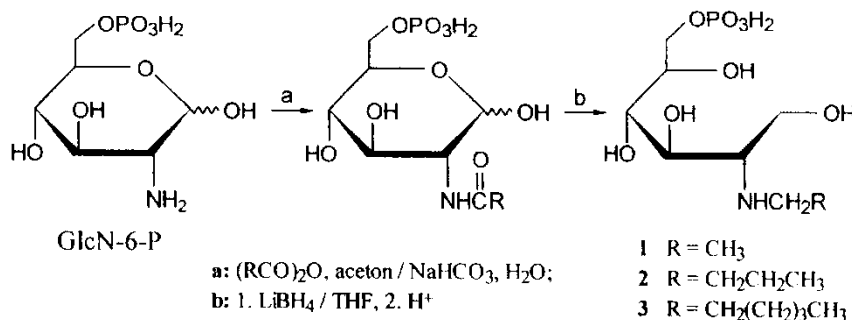
Postawione zadanie spełniają opracowane i zsyntezowane w ramach wynalazku dwa *N*-alkilowe analogi ADGP. Grupa *N*-alkilowa zwiększa lipofilowość ADGP i ułatwia jego bierną dyfuzję przez błonę cytoplazmatyczną. Jednocześnie, zostaje zachowany zasadowy charakter grupy 2-aminowej, co zapewnia utrzymanie zdolności oddziaływania z syntazą GlcN-6P.

N-Alkilowa pochodna 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu według wynalazku ma wzór



Istotnym jest, że *N*-Alkilowa pochodna 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu według wynalazku ma postać *N*-butylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu, lub też że ma postać *N*-heksylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu.

Istota wynalezionych związków i sposobów postępowania przy ich otrzymywaniu jest zilustrowana poniższym schematem.



Wynalazek jest szczegółowo opisany na przykładach postępowania przy otrzymywaniu obydwu odmian wynalezionego związku

Przykład 1

Otrzymywanie *N*-butylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu.

Użyty w ilości 200 mg (0,76 mmola) D-glukozamino-6-fosforan oraz wodorowęglan sodu w ilości 300 mg (3,6 mM), rozpuszczono w 1,5 ml wody. Do otrzymanego roztworu wdroplono następnie w ciągu 10 minut 25% roztwór bezwodnika butanowego w acetonie użyty w ilości 0,9 ml (1,5 mM). Całość intensywnie mieszano, a przebieg reakcji kontrolowano chromatograficznie za pomocą TLC, układ CHCl₃: CH₃OH = 1 : 1. Po upływie 24 godzin stwierdzono całkowite przereagowanie substratu (GlcN-6P). Wówczas do mieszaniny reakcyjnej dodano 20 ml izopropanolu i mieszano przez około 5 min. Następnie roztwór zatężył się przez odparowanie rozpuszczalników w wyparce próżniowej z łaźnią wodną, pod ciśnieniem nie większym niż 30 hPa. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej na złożu Dowex 50 Wx4 (H⁺) i otrzymano się w ten sposób *N*-butanoilo-D-glukozamino-6-fosforan w postaci białego osadu, przy średniej wydajności reakcji około 90%. Otrzymany *N*-butanoilo-D-glukozamino-6-fosforan w ilości około 200 mg (0,61 mM) rozpuszczono następnie w 5 ml bezwodnego THF i dodano 216 mg (9,9 mM) LiBH₄. Roztwór intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej kontrolując przebieg reakcji chromatograficznie (TLC, układ CHCl₃: CH₃OH = 1:1). Po upływie około dwóch godzin stwierdzono zakończenie reakcji. Wówczas do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 ml metanolu w celu usunięcia nadmiaru środka redukującego. Całość pozostawiono do stabilizacji na okres około 12 godzin. Po tym czasie zatężył roztwór przez odparowanie rozpuszczalników w wyparce próżniowej z łaźnią wodną, pod ciśnieniem nie większym niż 30 hPa. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie jonowymiennej wypełnionej złożem Dowex 50 Wx4. Otrzymano *N*-butylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforan w postaci jasnego oleju. Wydajność reakcji wynosiła 77%.

Przykład 2.

Otrzymywanie *N*-heksylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu.

Mieszaninę 200 mg (0,76 mmola) D-glukozamino-6-fosforanu oraz 300 mg (3,6 mM) wodorowęglanu sodu rozpuszczono w 1,5 ml wody. Do otrzymanego roztworu wkroplono w ciągu 10 minut 1,1 ml (1,5 mM) 25% roztworu bezwodnika heksanowego w acetonie. Całość intensywnie mieszano, a przebieg reakcji kontrolowano chromatograficznie (TLC, układ CHCl_3 : CH_3OH = 1 : 1). Po upływie około 24 h stwierdzono całkowite przereagowanie substratu (GlcN-6P). Wówczas do mieszaniny reakcyjnej dodano 20 ml izopropanolu i mieszano przez około 5 min. Następnie roztwór zatężono przez odparowanie rozpuszczalników (jak opisano w przykładzie 1). Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii jonowymiennej na złożu Dowex 50 Wx4 (H^+). Otrzymano *N*-heksanoilo-D-glukozamino-6-fosforan w postaci białego osadu. Wydajność reakcji wynosiła 80%. Tak otrzymany *N*-heksanoilo-D-glukozamino-6-fosforan w ilości 200 mg (0,56 mM) rozpuszczono w 5 ml bezwodnego THF i dodano 216 mg (9,9 mM) LiBH_4 . Roztwór intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej kontrolując przebieg reakcji chromatograficznie (TLC, układ CHCl_3 : CH_3OH = 1:1). Po upływie około dwóch godzin stwierdzono zakończenie reakcji. Wówczas do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 ml metanolu w celu usunięcia nadmiaru środka redukującego. Całość pozostawiono do stabilizacji na okres około 12 godzin. Po tym czasie zatężono roztwór przez odparowanie rozpuszczalników jak wyżej opisano. Surowy produkt oczyszczono na kolumnie jonowymiennej wypełnionej złożem Dowex 50 Wx4. Otrzymano *N*-heksylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforan w postaci jasnego oleju. Wydajność reakcji wynosiła 94%.

Przeprowadzone analizy potwierdzające czystość związków otrzymanych według przytoczonych przykładów wykonania wynalazku, wykazały następujące wyniki.

Dla *N*-butylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu:

IR: ν 3200 cm^{-1} (OH), 2934 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1462 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1181, 1011 cm^{-1} (OH, OPO_3H_2). ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.04-4.18 (m, 3H), 3.96 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.57 (m, 2H, CH_2), 3.55 (m, 1H), 1.55 (m, 4H, 2 CH_2), 0.86 (t, 3H, CH_2). MALDITOF: m/e 317.0 (M^+), 339.0 ($\text{M}^+ - 1 + \text{Na}$).

Dla *N*-heksylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu:

IR: ν 3334 cm^{-1} (OH), 2957, 2931, 2860 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1466 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1118, 1024 cm^{-1} (OH, OPO_3H_2). ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 4.08-4.20 (m, 3H), 3.90 (dt, 1H, $J = 10.4$ Hz, $J = 3.2$ Hz), 3.82 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.60 (m, 2H, CH_2), 3.55 (m, 1H), 1.57 (m, 4H, 2 CH_2), 1.28 (m, 4H, 2 CH_2), 0.86 (t, 3H, CH_3). MALDITOF: m/e 344.1 ($\text{M}^+ - 1$), 367.1 ($\text{M}^+ - 1 + \text{Na}$).

Aktywność przeciwgrzybową związków otrzymanych wynalezionym sposobem stosownie do przykładów 1,2 została ustalona następująco.

Oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej wobec modelowych szczepów drożdżaków z rodzaju *Candida* oraz drożdży *S. cerevisiae* wykonywano metodą rozcieńczeń seryjnych w mikroplatkach 96-studzienkowych, w podłożu płynnym YNB (Yeast Nitrogen Base) zawierającym 2% glukozy. W zestawie testowym drobnoustrojów znajdowały się szczepy pochodzące z kolekcji, szczepy kliniczne, oraz szczepy *S. cerevisiae* JG. Szczep *S. cerevisiae* JG CDR1, otrzymany w wyniku transformacji komórek szczepu JG 436 genem *CDK1* kodującym białko oporności wielolekowej *Cdr1p* z *Candida albicans* wykazuje oporność m.in. na znane związki przeciwgrzybowe: Flukonazol i Ketokonazol. Inkubację prowadzono w temperaturze 30°C, a wyniki odczytywano po 48 h przy użyciu czytnika mikroplatek. Wielkość inokulum drobnoustrojów – 10^5 komórek/ml. Wyznaczano wartości MIC (minimalne stężenie hamujące), jako najniższe stężenie związku, przy których wzrost drobnoustrojów (miarą było zmętnienie hodowli mierzone przy długości fali 660 nm) nie przekracza 20% wzrostu kontroli, nie zawierającej związku. Wyniki oznaczenia przedstawiono w tabeli.

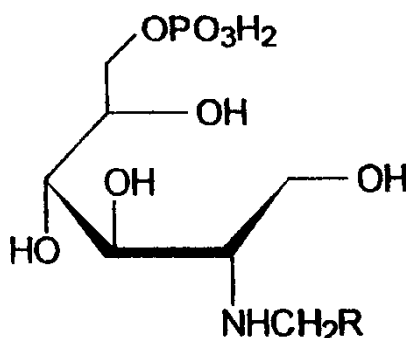
Związek	MIC (mg/ml)					
	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	<i>C.glabrata</i> kliniczny	<i>C.tropicalis</i> kliniczny	<i>S.cerevisiae</i> AT CC 9763	<i>S.cerevisiae</i> JG 436	<i>S.cerevisiae</i> JG CDR1
ADGP	5	>5	>5	5	5	5
<i>N</i> -butylo-ADGP (2)	0,625	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>N</i> -heksylo-ADGP (3)	0,625	0,625	0,312	0,312	0,312	0,312

N-Alkilowe pochodne ADGP otrzymane sposobem według wynalazku wykazują aktywność przeciwgrzybową wyższą, a w niektórych przypadkach znacznie wyższą niż ADGP. Aktywność przeciwgrzybowa pochodnych według wynalazku zależy od rodzaju podstawnika alkilowego na grupie 2-aminowej i jest najwyższa dla pochodnej sześciowęglowej. Wszystkie badane związki wykazały taką samą aktywność wobec wielolekowego szczepu *S. cerevisiae* JG CDR1 i wobec wyjściowego szczepu JG 436, co wskazuje, że oporność wielolekowa warunkowana obecnością białka Cdr1p nie obejmuje *N*-alkilowych pochodnych ADGP.

Obydwie nowe *N*-Alkilowe pochodne 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu o właściwościach przeciwgrzybowych, otrzymane sposobem według wynalazku, dają możliwość wykorzystania najaktywniejszych z nich jako substancji czynnych do otrzymywania preparatów mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu grzybic, w tym także takich, które są powodowane przez szczepy wielolekowe.

Zastrzeżenia patentowe

1. *N*-Alkilowa pochodna 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu



2. *N*-Alkilowa pochodna 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu według zastrz. 1, **znamienna tym**, że ma postać *N*-butylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu.

3. *N*-Alkilowa pochodna 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu według zastrz. 1, **znamienna tym**, że ma postać *N*-heksylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu.

