

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **211949**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **383161**

(22) Data zgłoszenia: **17.08.2007**

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

(54)

N,N-dialkilowe 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 211949 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są *N,N*-dialkylowe 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, w znacznym stopniu zwiększającego właściwości przeciwgrzybowe związków w stosunku do wyjściowego ADGP.

Komórki grzybów, z uwagi na podobieństwo w budowie do komórek zwierzęcych, są trudną do zwalczenia 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 wsp. 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.

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. „proleku”, 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, 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 zsyntezowane w ramach wynalazku trzy *N,N*-dialkylowe analogi ADGP. Grupa *N,N*-dialkylowa zwiększa lipofilowość ADGP i ułatwia jego bierną dyfuzję przez błonę cytoplazmatyczną, a jednocześnie zostaje zachowany zasadowy charakter grupy 2-aminowej, co zapewnia utrzymanie zdolności oddziaływania z syntazą GlcN-6P.

N,N-Dialkylowa pochodna 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu

Uzyskano *N,N*-dipropyl-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforan w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 78%.

Przykład 3

Otrzymywanie *N,N*-dibutylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu (**3**).

ADGP (200 mg; 0.76 mM) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 3 : 1$ (14 ml). Do tak sporządzonego roztworu, intensywnie mieszając, wkroplono aldehyd butanowy (0.2 ml; 2.28 mM). Całość mieszano przez 0.5 godziny. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano NaCNBH , (132 mg; 2.1 mM) i kontynuowano mieszanie. Przebieg reakcji kontrolowano chromatograficznie (TLC, $\text{CH}_3\text{OH} : \text{NH}_3 : \text{H}_2\text{O} = 6:2:1$). Po zakończeniu reakcji (1h) mieszaninę reakcyjną zateżono przez odparowanie rozpuszczalników. Surowy produkt reakcji oczyszczono na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelazem krzemionkowym w układzie $\text{CH}_3\text{OH} : \text{NH}_3 : \text{H}_2\text{O} = 6:2:1$. Uzyskano *N,N*-dibutylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforan w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 90%.

Przeprowadzone analizy potwierdzające czystość związków otrzymanych według przytoczonych przykładów wykonania wynalazku, wykazały następujące wyniki. Dla *N,N*-dietylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu (1).

IR: ν 3140 cm^{-1} (OH), 3040, 2806 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1404 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1121, 1066 cm^{-1} (OH, OPO_3H_2). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ 4.33 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz), 4.04 (m, 4 H), 3.80-3.85 (m, 3 H), 3.59 (m, 2 H, CH_2), 3.43 (m, 2 H, CH_2), 1.41 (t, 6 H, $J = 7.2$ Hz, 2 CH_3). MALDITOF: m/e 317.1 (M^+), 339.0 ($\text{M}^+ - 1 + \text{Na}$), 361.0 ($\text{M}^+ - 2 + 2 \text{Na}$).

Dla *N,N*-dipropyl-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu (**2**).

IR: ν 3235 cm^{-1} (OH), 3043, 2945, 2816 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1426 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1126 cm^{-1} (OH, OPO_3H_2). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ 4.21 (d, 1 H), 3.96-4.02 (m, 3 H), 3.78-3.86 (m, 2 H), 3.64 (dd, 1 H, $J = 10.8, 6.4$ Hz), 3.51 (dd, 1 H, $J = 10.8, 7.2$ Hz), 1.78 (m, 4 H, 2 CH_2), 1.01 (t, 6 H, $J = 7.3$ Hz, 2 CH_3). MALDITOF: m/e 345.2 (M^+), 346.2 ($\text{M}^+ + 1$).

Dla *N,N*-dibutylo-2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu (**3**).

IR: ν 3234 cm^{-1} (OH), 2877, 2936, 2964 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1452 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1077 cm^{-1} (OH, OPO_3H_2). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ 4.14 (d, 1 H, $J = 8.79$ Hz), 3.80-3.89 (m, 4 H), 3.64-3.68 (m, 3 H), 3.30 (m, 2 H, CH_2), 3.13 (m, 2 H, CH_2), 1.66 (m, 2 H, CH_2), 1.57 (m, 2 H, CH_2), 1.25 (m, 4 H, $J = 7.32$ Hz, 2 CH_2), 0.80 (t, 6 H, $J = 7.32$ Hz, 2 CH_3). MALDITOF: m/e 371.5 ($\text{M}^+ - 2$), 394.5 ($\text{M}^+ - 2 + \text{Na}$).

Aktywność przeciwgrzybową wynalezionych związków stosownie do przykładów 1, 2 i 3 została ustalona następująco.

Oznaczenie aktywności przeciwgrzybowej wobec modelowych szczepów drożdżaków z rodzaju *Candida* oraz drożdży *S. cerevisiae* wykonywano metodą rozcieńczeń seryjnych w mikropłytkach 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 mikropłyt. 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> ATCC 9763	<i>S. cerevisiae</i> JG 436	<i>S. cerevisiae</i> JG CDR1
ADGP	5	>5	>5	5	5	5
<i>N,N</i> -dietylo-ADGP (1)	0,312	0,625	0,625	0,312	0,312	0,312
<i>N,N</i> -dipropyl-ADGP (2)	0,156	0,625	0,625	0,312	0,312	0,312
<i>N,N</i> -dibutylo-ADGP (3)	0,312	1,25	2,5	2,5	1,25	1,25

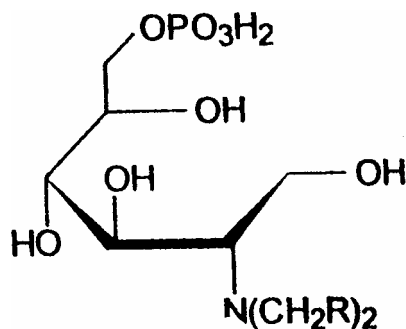
N,N-Dialkylowe pochodne ADGP według wynalazku wykazują aktywność przeciwgrzybową wyższą, a w niektórych przypadkach znacznie wyższą niż ADGP. Wszystkie badane związki wykazują

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,N*-dialkylowych pochodnych ADGP.

N,N-Dialkylowe pochodne 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu o właściwościach przeciwgrzybowych 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,N*-Dialkylowa pochodna 2-amino-2-deoksy-D-glukitolo-6-fosforanu



- 1 R = CH₃
- 2 R = CH₂CH₃
- 3 R = CH₂CH₂CH₃

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

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

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

