

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 242410 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **428782**

(22) Data zgłoszenia: **2019.01.31**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.08.10 BUP 17/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.20 WUP 08/2023**

(51) MKP:

**C07K 1/06** (2006.01)

**C07K 9/00** (2006.01)

**A61K 47/64** (2017.01)

**A61K 38/14** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
Gdańsk, PL**

**UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**IZABELA RUSIECKA, Gdynia, PL**

**IVAN KOCIĆ, Gdynia, PL**

**JAROSŁAW RUCZYŃSKI, Gdynia, PL**

**PIOTR REKOWSKI, Lublewo Gdańskie, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Iwona Płodzich-Hennig, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

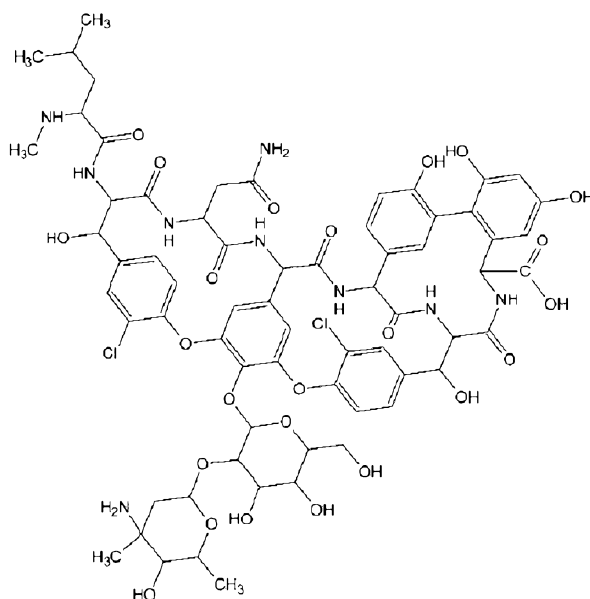
**Sposób otrzymywania koniugatów wankomycyny i TP10, koniugaty otrzymane tym sposobem oraz ich zastosowanie w leczeniu przeciwbakteryjnym**

**PL 242410 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania koniugatów wankomycyny (Van) i transportami 10 (TP10) oraz koniugaty otrzymane tym sposobem do zastosowania jako nowe związki przeciwbakteryjne przeciwko MRSA, w szczególności przeciwko *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* i *Neisseria spp.*

Wankomycyna, antybiotyk glikopeptydowy, który posiada aktywność przeciwbakteryjną przeciwko Gram(+) tlenowcom i beztlenowcom. Wankomycyna jest często stosowana w infekcjach zagrażających życiu wywołanych przez bakterie takie jak *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* i *Clostridium difficile*. Obecnie zakażenia tymi mikroorganizmami często występują w społeczeństwie co jest przyczyną dużej ilości powikłań i śmiertelności wśród pacjentów. Wśród nich, szczególnie niebezpieczne są zakażenia metycilino-opornym *Staphylococcus aureus* (MRSA) zlokalizowane w tkance mózgowej jak np. bakteryjne zapalenie opon mózgowych, a ich leczenie to główne wyzwanie dla współczesnej medycyny.



Rys. 1. Struktura wankomycyny

Wankomycyna oraz sposób jej otrzymywania jest znana z opisu patentowego US 3067099 B.

Skuteczność wankomycyny jest niewystarczająca z uwagi na coraz większą ilość wielolekoopornych (MDR) szczepów szpitalnych. Wankomycyna ma wiele ograniczeń także w leczeniu pacjentów zakażonych MRSA, oprócz wspomnianej wcześniej szybko rozwijająca się oporność na ten antybiotyk również osłabia jej penetrację przez barierę krew-mózg (BBB), co ogranicza jej zastosowanie w zakażeniach mózgu np. bakteryjnym zapaleniu opon mózgowych. Niestety brak jest alternatywnych leków do wankomycyny.

Dlatego też, klinicznym wyzwaniem stało się stworzenie zmodyfikowanej wankomycyny, która ma lepszą skuteczność antybakteryjną oraz dobrze penetruje do tkanki mózgowej.

Takie polepszone własności udało się osiągnąć przez skoniugowanie wankomycyny z transportanem 10 (TP10), który jest przedstawicielem peptydów penetrujących komórkę (CPP). TP10, przedstawiciel kationowych CPP, jest krótkim amfipatycznym peptydem (oznacza X-AGYLLGK(X)INLKALA-ALAKKIL-X-NH<sub>2</sub>).

TP10 jest znany z właściwości transportujących przez błony komórkowe, niestety mechanizm transportu jest niewyjaśniony. TP10 ma również zdolność transportowania różnych cząsteczek w tym leków do wnętrza komórki. Dodatkowo TP10 również posiada własności przeciwbakteryjne.

Stworzenie koniugatów Van-TP10 poprawiło własności farmakokinetyczne i farmakodynamiczne w porównaniu do samej wankomycyny, przy zachowaniu niskiej toksyczności komórkowej. Koniugaty Van-TP10 wykazują lepsze efekty przeciwbakteryjne w stosunku do klinicznych szczepów

MRSA a stężenie jednego z koniugatów w mózgu jest 200-krotnie wyższe niż samej wankomycyny, przy jednoczesnym niskim poziomie ich toksyczności.

Koniugaty mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu zagrażających życiu infekcji MRSA, szczególnie tych znajdujących w mózgu.

Nowo otrzymane związki (Van-TP10) mogą znaleźć zastosowanie jako leki w przemyśle farmaceutycznym i stanowić alternatywną terapię w stosunku do tradycyjnej wankomycyny.

Celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie sposobu otrzymywania związków w postaci koniugatów, które mogą być zastosowane do leczenia zagrażających życiu infekcji MRSA, również tych znajdujących w mózgu (nowy antybiotyk z grupy glikopeptydów). Nieoczekiwanie problem ten został rozwiązany w istotnym stopniu w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania koniugatów wankomycyny (Van) i transportami 10 (TP10) o wzorach ogólnych Van-PEG<sub>3</sub>-TP10 [koniugat I] lub Van-PEG<sub>4</sub>-TP10 [koniugat II] lub TP10-Ala(PEG<sub>4</sub>-Van) [koniugat IV] oraz [Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 [koniugat IVa] charakteryzujący się tym, że w pierwszym etapie prowadzi się syntezę łańcucha TP10 i jego analogów oraz modyfikację struktury wankomycyny, a następnie prowadzi się kowalencyjną koniugację obu związków metodą cykloaddycji Huisgena.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku etap otrzymywania łańcucha TP10 i jego analogów obejmuje syntezę peptydów w fazie stałej z wykorzystaniem automatycznego syntetyzatora oraz żywicy TentaGel S RAM mającej osadzenie grup aminowych 0,25 mmol/g, przy czym

a) Fmoc chronione aminokwasy przyłącza się jako aktywne pochodne z wykorzystaniem 3-krotnego molowego nadmiaru TBTU z dodatkiem HOBt i NMP w proporcji molowej 1:1:2 w DMF przez 2 x 30 min; następnie usuwa się grupy Fmoc z użyciem 20% roztworu piperydyny w DMF w 2 cyklach (2 x 3,5 min), gdzie dodatkowo

w przypadku syntezy koniugatu I i II N-końcową grupę Fmoc usuwa się za pomocą 20% roztworu piperydyny w DMF (2 x 5 min), a następnie do N-końcowej grupy aminowej przyłącza się grupę propiolową (Prop) stosując 10-krotny molowy nadmiar bezwodnika kwasu propiolowego w DMF przez 1,5 godziny; mieszaninę przechowuje się w temperaturze 0°C przez 10 min; osad odsącza się, a po odparowaniu DCM otrzymany bezwodnik rozpuszcza się w 5 mL DMF i dodaje się do naczynka reakcyjnego z peptydylo-żywicą, lub

w przypadku syntezy koniugatu III do żywicy przyłącza się pochodną Fmoc-L-propargilglicynę (Fmoc-Prg-OH), a następnie kolejne reszty aminokwasowe w sekwencji TP10

w przypadku syntezy koniugatu IV i IVa do osłony grupy ε-aminowej reszty Lys<sup>7</sup> stosuje się labilną w środowisku hydrazyny grupę *iv*Dde, którą usuwa się za pomocą 10% roztworu monohydratu hydrazyny w DMF (3 x 20 min), a następnie przyłącza się grupę alkinową do grupy ε-aminowej reszty Lys<sup>7</sup> stosując 10-krotny molowy nadmiar bezwodnika kwasu propiolowego lub

w przypadku syntezy koniugatu IV N-końcową resztę Ala przyłącza się jako Boc-chroniony aminokwas, lub

w przypadku koniugatu IVa do N-końcowej grupy aminowej przyłącza się 6-karboksyfluoresceinę (FI) stosując 3-krotny molowy nadmiar estru N-hydroksysukcynimidowego 6-karboksyfluoresceiny (FI-NHS) z dodatkiem DIPEA w proporcji molowej 1:1 w DMF przez 1,5 godziny

b) odszczepianie peptydów od żywicy prowadzi się z jednoczesnym usunięciem osłon grup funkcyjnych w łańcuchach bocznych za pomocą mieszaniny kwas trifluorooctowy (TFA), fenol, triizopropyllosilan i woda (w proporcji molowej 88:5:2:5) przez 2 godziny, następnie

c) peptydy wytrąca się z mieszaniny reakcyjnej za pomocą zimnego eteru dietylowego; następnie osad odsącza się, rozpuszcza w wodzie i liofilizuje się; surowe peptydy analizuje się i oczyszcza za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych; tożsamość otrzymanych produktów potwierdzano się za pomocą spektrometrii mas.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku modyfikację struktury wankomycyny w celu otrzymania jej pochodnych modyfikowanych grupą azydkową prowadzi się w roztworze, gdzie:

a) dla pochodnej Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>, ester N-hydroksysukcynimidowy kwasu 15-azydo-4,7,10,13-теаksypentadekanowego (N<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-NHS) przyłącza się do chlorowodoru wankomycyny poprzez pierwszorzędową grupę aminową we fragmencie cukrowym przeprowadzając reakcję w roztworze wodnym zawierającym DIPEA, przy proporcjach molowych reagentów 1:1.5:2.5, przy czym roztwór mieszało w temperaturze 4°C przez 30 min;

b) dla pochodnej Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>, 1-amino-11-azydo-3,6,9-trioksyundekano (N<sub>3</sub>-PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>) przyłącza się do chlorowodoru wankomycyny poprzez grupę karboksylową w fragmencie aglikonowym przeprowadzając reakcję w roztworze DMF z wykorzystaniem HATU (heksafluorofosforan 2-(1*H*-9-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylourowniowy) z dodatkiem DIPEA, przy proporcjach molowych reagentów 1:0,8:1:2, przy czym roztwór miesza się w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, po upływie tego czasu, produkty reakcji natychmiast rozdziela się za pomocą preparatywnej RP-HPLC; eluaty frakcjonuje się i analizuje za pomocą analitycznej RP-HPLC;

c) następnie frakcje Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> lub Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> o czystości powyżej 98% łączy się i liofilizuje się, a tożsamość otrzymanych produktów potwierdza się za pomocą spektrometrii mas.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku kowalencyjną koniugację obu związków metodą cykloaddycji Huisgena do uzyskania koniugatów prowadzi się poprzez reakcje 0,8 μM zmodyfikowanych grupą alkinową analogów TP10 otrzymanych sposobem według zastrz. 2 z 0,4 μM zmodyfikowanych grupą azydkową pochodną Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> lub Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> w obecności 1,5 ml mieszaniny woda/*tert*-butanol w stosunku objętościowym 1:1 i 8 μL 0,1 M roztworu CuSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O oraz 4 μL świeżo przygotowanego 0,5 M roztworu askorbinianu sodu w proporcji molowej 2:1:2:5, przy czym mieszaninę reakcyjną miesza się w temperaturze pokojowej przez około 24 godziny do utworzenia 1,2,3-triazolu, następnie rozpuszczalnik odparowuje się i produkty syntezy liofilizuje się; po czym otrzymane surowe koniugaty oczyszcza się za pomocą preparatywnej lub semi-preparatywnej RP-HPLC; uzyskując koniugaty o czystości powyżej 98%.

Kolejnym przedmiotem wynalazku są koniugaty otrzymane sposobem według wynalazku do zastosowania jako lek przeciwbakteryjny wobec *Staphylococcus aureus* lub *Enterococcus spp* lub *Neisseria spp*.

Korzystnie, koniugaty do zastosowania jako lek przeciwbakteryjny wobec szczepu MRSA N315 i MRSA hetero-YISA 6347.

Korzystnie, koniugaty do leczenia infekcji MRSA zlokalizowanych w mózgu.

#### **Opis rysunków i tabel:**

**Fig. 1** – przedstawia chemiczną strukturę zsyntetyzowanych koniugatów.

Koniugat: a) Van-PEG<sub>3</sub>-TP10 (koniugat I);  
b) Van-PEG<sub>4</sub>-TP10 (koniugat II);  
c) TP10-Ala(PEG<sub>4</sub>-Van) (koniugat III);  
d) [Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 (koniugat IV);  
e) FI[Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 (koniugat IVa)

**Fig. 2** – przedstawia przeciwbakteryjne aktywności [Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 przeciwko wewnątrzkomórkowo zlokalizowanym szczepom MRSA 12673

\* istotność statystyczna ( $p < 0.05$ ) w porównaniu do kontroli (bez leczenia) i Van

**Fig. 3** – przedstawia przeciwbakteryjne aktywności [Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 przeciwko wewnątrzkomórkowo zlokalizowanym szczepom MRSA h-VISA 6347.

\* istotność statystyczna ( $p < 0.05$ ) w porównaniu do kontroli (bez leczenia) i Van

**Fig. 4** – przedstawia obecność FI-[Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 w mózgach mysich uzyskany za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.

**Fig. 5** – przedstawia hemolityczną aktywność Van, Van-PEG<sub>3</sub>-TP10 i Van-PEG<sub>4</sub>-TP10 w zakresie stężeń od 100–0.049 μM mierzony spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm.

^Van – 0% hemolizy w całym zakresie stężeń

\* istotność statystyczna ( $p < 0.05$ ) w porównaniu do Van

**Tabela 1** – przedstawia strukturę pierwszorzędową otrzymanych koniugatów Van-TP10

**Tabela 2** – przedstawia uzyskane koniugaty, ich masy molekularne oraz wydajność reakcji koniugacji.

**Tabela 3** – przedstawia antybakteryjną aktywność koniugatów Van-TP10

**Tabela 4** – przedstawia stężenie [Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10, Van i TP10 w homogenatach mysich mózgow.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, nie stanowiące jego ograniczenia.

#### **Przykład 1**

#### **Z syntetyzowane koniugaty**

Otrzymano 4 koniugaty Van z TP10, o strukturach przedstawionych w tabeli 1 oraz na Fig. 1.

Tabela 1. Struktura pierwszorzędowa otrzymanych koniugatów TP10 z Van

	Nazwa związku	Sekwencja
<b>I</b>	Van-PEG <sub>3</sub> -TP10	Van-NH-PEG <sub>3</sub> -Tra(1,4)-C(O)- AGYLLGKINLKALAALAKKIL- <i>amid</i>
<b>II</b>	Van-PEG <sub>4</sub> -TP10	Van-C(O)-PEG <sub>4</sub> -Tra(1,4)-C(O)- AGYLLGKINLKALAALAKKIL- <i>amid</i>
<b>III</b>	TP10-Ala(PEG <sub>4</sub> - Van)	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-Ala(Tra(1,4)- PEG <sub>4</sub> -C(O)-Van)- <i>amid</i>
<b>IV</b>	[Lys <sup>7</sup> (PEG <sub>4</sub> - Van)]TP10	AGYLLGK <sup>7</sup> (C(O)-Tra(1,4)-PEG <sub>4</sub> -C(O)- Van)INLKALAALAKKIL- <i>amid</i>
<b>IVa</b>	<i>Fl</i> -[Lys <sup>7</sup> (PEG <sub>4</sub> - Van)]TP10	<i>Fl</i> -AGYLLGK <sup>7</sup> (C(O)-Tra(1,4)-PEG <sub>4</sub> -C(O)- Van)INLKALAALAKKIL- <i>amid</i>

*Fl* – fluoresceina, PEG<sub>4</sub> – linker 4,7,10,13-tetraoksyntadekanowy, PEG<sub>3</sub> – linker 3,6,9-trioksyundekany, Tra – pierścień 1,2,3-triazolowy

#### Synteza łańcucha TP10

TP10 i jego analogi zsyntezowano stosując standardową procedurę syntezy peptydów w fazie stałej (SPPS) z wykorzystaniem automatycznego syntezyzatora peptydów (Quartet, Protein Technologies Inc) oraz żywicy TentaGel S RAM (o osadzeniu grup aminowych 0,25 mmol/g). Fmoc-chronione aminokwasy przyłączano jako aktywne pochodne z wykorzystaniem 3-krotnego molowego nadmiaru TBTU (tetrafluoroboran 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylo-uronowy) z dodatkiem HOBt (1-hydroksybenzotriazol) i NMP (*N*-metylomorfolina) (w proporcji molowej 1:1:2) w DMF (*N,N*-dimetyloformamid) przez 2 x 30 min. Usuwanie grup Fmoc (fluorenylo-9-metoksykarbonyl) przeprowadzono z użyciem 20% roztworu piperydiny w DMF w 2 cyklach (2 x 3,5 min). Dodatkowo, zastosowano labilną w środowisku hydrazyny grupę *ivDde* (1-(4,4-dimetylo-2,6-dioksy cycloheksadeno)-3-metylobutyl) do osłony grupy ε-aminowej reszty Lys<sup>7</sup>, zamiast standardowej labilnej w środowisku kwaśnym grupy Boc (*tert*-butyloksycarbonyl) (synteza koniugatu **IV** i **IVa**). Ze względu na fakt, że hydrazyna usuwa grupę Fmoc, *N*-końcowa reszta Ala (synteza koniugatu **IV**) przyłączono jako Boc-chroniony aminokwas. W syntezie koniugatu **IVa** do *N*-końcowej grupy aminowej przyłączono 6-karboksyfluoresceinę (*Fl*) stosując 3-krotny molowy nadmiar estru *N*-hydroksysukcynimidowego 6-karboksyfluoresceiny (*Fl*-NHS) z dodatkiem DIPEA (*N,N*-diizopropylodetylamina) (w proporcji molowej 1:1) w DMF przez 1,5 godziny.

#### Modyfikacja TP10 grupą alkinową

W przypadku syntezy koniugatu **I** i **II**, *N*-końcowa grupa Fmoc usuwana za pomocą 20% roztworu piperydiny w DMF (2 x 5 min), a następnie do *N*-końcowej grupy aminowej przyłączano grupę propiolową (Prop) stosując 10-krotny molowy nadmiar bezwodnika kwasu propiolowego w DMF przez 1,5 godziny. Bezwodnik kwasu propiolowego otrzymano przez zmieszanie *N,N'*-diizopropylodkarbodiimidu (DIC) z kwasem propiolowym (w proporcji molowej 1:2) w dichlorometanie (DCM). Mieszaninę przechowywano w temperaturze 0°C przez 10 min. Osad odsączono, a po odparowaniu DCM otrzymany bezwodnik rozpuszczono w 5 mL DMF i dodano do naczynka reakcyjnego z peptydylo-żywicą. Natomiast, modyfikowany grupą alkinową koniugat **III** otrzymano przez przyłączenie do żywicy pochodnej Fmoc-L-propargiloglicyny (Fmoc-Prg-OH), a następnie przez przyłączanie kolejnych reszt aminokwasowych w sekwencji TP10. W przypadku syntezy koniugatu **IV** i **IVa**, grupę *ivDde* usuwano za pomocą 10% roztworu monohydratu hydrazyny w DMF (3 x 20 min), a następnie przyłączano grupę alkinową do grupy ε-aminowej reszty Lys<sup>7</sup> stosując 10-krotny molowy nadmiar bezwodnika kwasu propiolowego (otrzymanego w sposób wyżej opisany).

### Odszczepianie peptydów od żywicy

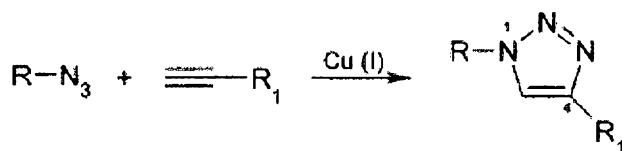
Peptydy odszczepiano z żywicy z jednoczesnym usunięciem osłon grup funkcyjnych w łańcuchach bocznych za pomocą mieszaniny kwas trifluorooctowy (TFA), fenol, triizopropylsilan i woda (w proporcji molowej 88:5:2:5) przez 2 godziny. Peptydy wytrącano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą zimnego eteru dietylowego. Następnie osad odsączano, rozpuszczano w wodzie i liofilizowano. Surowe peptydy analizowano i oczyszczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC). Tożsamość otrzymanych produktów potwierdzano za pomocą spektrometrii mas, techniką MALDI-TOF (Bruker Daltonics, model HCT Ultra) lub techniką ESI (ABSciex, TripleTOF 5600+).

### Modyfikacja struktury Van

Pochodne Van modyfikowane grupą azydkową zsyntezowano w roztworze. W przypadku pochodnej Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>, ester *N*-hydroksysukcynimidowy kwasu 15-azydo-4,7,10,13-tetraoksyntetradekanowego (N<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-NHS) przyłączono do chlorowodoru wankomycyny poprzez pierwszorzędową grupę aminową we fragmencie cukrowym. Reakcję przeprowadzono w roztworze wodnym zawierającym DIPEA (proporcje molowe reagentów 1:1.5:2.5). Roztwór mieszało w temperaturze 4°C przez 30 min. Natomiast pochodną Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> otrzymano przez przyłączenie 1-amino-11-azydo-3,6,9-trioksyundekanu (N<sub>3</sub>-PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>) do chlorowodoru wankomycyny poprzez grupę karboksylową we fragmencie aglikonowym. Reakcję przeprowadzono w roztworze DMF z wykorzystaniem HATU (heksafluorofosforan 2-(1*H*-9-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy) z dodatkiem DIPEA (w proporcji molowej 1:0,8:1:2). Roztwór mieszało w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Po upływie tego czasu, produkty reakcji natychmiast rozdzielano za pomocą preparatywnej RP-HPLC. Eluaty frakcjonowano i analizowano za pomocą analitycznej RP-HPLC. Frakcje Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> lub Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> o czystości powyżej 98% łączono i liofilizowano. Tożsamość otrzymanych produktów potwierdzono za pomocą spektrometrii mas, techniką MALDI-TOF lub ESI.

### Koniugacja Van z TP10

Do kowalencyjnej koniugacji TP10 z wankomycyną (Van) wykorzystano katalizowaną jonami miedzi Cu(I) specyficzną 1,3-dipolarną reakcję cykloaddycji Huisgena, znaną również jako "reakcja klik" (rys. 2). Metoda ta jest szybka, wysoce wydajna oraz regio- i chemoselektywna w łagodnych warunkach reakcji.



Rysunek 2. Ogólny schemat katalizowanej jonami miedzi(I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena („reakcja klik”); gdzie R – Van, R<sub>1</sub> – TP10 o sekwencji aminokwasowej przedstawionej na rysunku 1.

Reakcje modyfikowanych grupą alkinową analogów TP10 (za każdym razem 0,8 μM) ze modyfikowaną grupą azydkową pochodną (0,4 μM) Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (koniugat I) lub Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> (koniugaty II-IV) prowadzono w 1,5 ml mieszaniny woda/*tert*-butanol (1:1 v/v) w obecności 8 μL 0,1 M roztworu CuSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O i 4 μL świeżo przygotowanego 0,5 M roztworu askorbinianu sodu (w proporcji molowej 2:1:2:5). Roztwór mieszało w temperaturze pokojowej przez około 24 godziny. Po zakończeniu reakcji tworzenia 1,2,3-triazolu, rozpuszczalnik odparowywano i produkty syntezy liofilizowano. Otrzymane w ten sposób surowe koniugaty oczyszczano za pomocą preparatywnej lub semi-preparatywnej RP-HPLC. Czystość związków sprawdzano za pomocą analitycznej RP-HPLC (z wykorzystaniem różnych metod gradientowych acetonitryl-woda), ich czystość oszacowano na poziomie powyżej 98%. Masy cząsteczkowe otrzymanych związków potwierdzono za pomocą spektrometrii mas, techniką ESI lub MALDI-TOF. Tabela 2 przedstawia porównanie mas cząsteczkowych obliczonych i wyznaczonych doświadczalnie otrzymanych koniugatów, jak również wydajności reakcji koniugacji.

Tabela 2. Porównanie mas cząsteczkowych otrzymanych koniugatów oraz wydajności reakcji koniugacji

	Nazwa związku	Masa cząsteczkowa		Wydajność <sup>***</sup> [%]
		Obliczona	Wyznaczona doświadczalnie	
<b>I</b>	Van-PEG <sub>3</sub> -TP10	3883,27	1294,36 [M+3H] <sup>3+</sup> , 971,03 [M+4H] <sup>4+</sup> ,	47
			777,04 [M+5H] <sup>5+</sup> , 647,97 [M+6H] <sup>6+</sup>	
<b>II</b>	Van-PEG <sub>4</sub> -TP10	3956,32	1318,40 [M+3H] <sup>3+</sup> , 989,05 [M+4H] <sup>4+</sup> , 791,45 [M+5H] <sup>5+</sup> , 659,87 [M+6H] <sup>6+</sup>	85
<b>III</b>	TP10-Ala(PEG <sub>4</sub> -Van)	4001,40	3999,60* [M+H] <sup>+</sup>	76
<b>IV</b>	[Lys <sup>7</sup> (PEG <sub>4</sub> -Van)]TP10	3957,30	3956,80* [M+H] <sup>+</sup>	58
<b>IVa</b>	<i>Fl</i> -[Lys <sup>7</sup> (PEG <sub>4</sub> -Van)]TP10	4316,60	4317,10* [M+H] <sup>+</sup>	24

\* otrzymane techniką spektrometrii mas MALDI-TOF

\*\* uwzględniono tylko frakcje o czystości HPLC powyżej 98%

#### *Analiza i oczyszczanie produktów reakcji*

Oczyszczanie zsyntezowanych związków przeprowadzono na kolumnie Reprosil 100 C18 (Dr. Maisch GmbH, 40 x 250 mm, rozmiar ziaren 10 µm, przepływ fazy ruchomej 25 mL/min) lub kolumnie Reprosil 100 C18-XBD (Dr. Maisch GmbH, 20 x 250 mm, rozmiar ziaren 10 µm, przepływ fazy ruchomej 10 mL/min) z wykorzystaniem chromatografu SpotPrep (Armen) oraz różnych metod gradientowych. Faza ruchoma 10 składała się z 0,08% TFA w acetonitrylu (ACN) (roztwór A) i 0,1% TFA w wodzie (roztwór B). Kolumnę utrzymywano w temperaturze otoczenia. Eluowane roztwory monitorowano za pomocą detektora UV przy  $\lambda = 220$  i  $\lambda = 254$  nm. Eluaty frakcjonowano i analizowano za pomocą analitycznej RP-HPLC.

Analityczne rozdziały przeprowadzono na kolumnie Kinetex XB-C18 (Phenomenex, 4,6 x 150 mm, rozmiar ziaren 5 µm, przepływ fazy ruchomej 1 mL/min) z wykorzystaniem chromatografu Shimadzu Prominence oraz różnych metod gradientowych. Faza ruchoma, temperatura kolumny i parametry monitorowania eluatów były takie same jak w przypadku rozdziały preparatywnych.

#### Przykład 2

#### Sprawdzenie aktywności przeciwbakteryjnej uzyskanych koniugatów

W celu sprawdzenia działania przeciwbakteryjnego uzyskanych koniugatów wykorzystano test MIC *in vitro* na trzech szczepach bakteryjnych MRSA (N315, 12673, 6347). MRSA N315 to szczep referencyjny, wrażliwy na Van; MRSA 12673 – szczep kliniczny średnio-wrażliwy na Van; MRSA 6347 to szczep kliniczny h-VISA – średnio-oporny na Van. Wszystkie wyniki porównywano do samej Van.

Tabela 3

Szczep	MIC w $\mu\text{M}$ and ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	Van-HCl	TP10- <i>amide</i>	Van-PEG <sub>3</sub> - TP10- <i>amid</i>	Van-PEG <sub>4</sub> - TP10- <i>amid</i>	TP10- Ala(PEG <sub>4</sub> - Van)- <i>amid</i>	[Lys <sup>7</sup> (PEG <sub>4</sub> - Van)]TP10- <i>amid</i>
			I	II	III	IV
<i>S. aureus</i> MRSA N315 <sup>1</sup>	2.00±0.52 (2.97±0.66)	6.25±1.28 (13.64±2.78)	1.56±0.81 (6.06±2.47)	1.60±0.83 (6.33±2.58)	12.50*±3.23 (50.01±12.91)	6.25*±1.61 (24.72±6.38)
<i>S. aureus</i> MRSA 12673 <sup>2</sup>	4.07±1.05 (6.05±1.56)	6.25±1.61 (13.64±3.52)	1.56*±0.85 (6.06±3.13)	1.60*±0.65 (6.33±2.58)	0.78*±0.40 (3.12±1.61)	0.78*±0.32 (3.09±1.26)
<i>S. aureus</i> MRSA hetero- VISA 6347 <sup>2</sup>	4.07±1.05 (6.05±1.56)	12.50±3.23 (27.27±7.04)	1.56*±0.32 (6.06±1.24)	3.10±0.84 (12.26±3.56)	1.60*±0.42 (6.40±1.65)	3.10±0.79 (12.26±3.08)

<sup>1</sup> szczep referencyjny

<sup>2</sup> szczep kliniczny

\* istotność statystyczna ( $p < 0.05$ ) w porównaniu do Van

W przypadku szczepów klinicznych uzyskano statystycznie istotną poprawę działania przeciwbakteryjnego dla wszystkich badanych koniugatów w porównaniu do tradycyjnej Van.

#### Przykład 3

##### *Ocena skuteczności wewnątrzkomórkowego działania przeciwbakteryjnego badanych koniugatów*

W związku z tym, że *S. aureus* to patogen wewnątrzkomórkowy, sprawdzono czy badane koniugaty mają możliwość penetracji do komórek eukariotycznych. W tym celu wykorzystano ludzką linię komórkową HEK293, którą zakażono szczepem MRSA 12673 a następnie sprawdzano wewnątrzkomórkową skuteczność przeciwbakteryjną jednego z badanych koniugatów Fig. 2.

W tym badaniu otrzymano 70% poprawę inaktywacji bakterii wewnątrzkomórkowych MRSA 12673 w porównaniu do samej Van przy stężeniu 32xMIC. Na drugi szczep kliniczny MRSA h-VISA 6347 również uzyskano znaczącą poprawę przeciwbakteryjną przy 8xMIC (Fig.3).

#### Przykład 4

Jakościowa ocena zdolności przechodzenia koniugatu FI-[Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 przez barierę krew-mózg (BBB)

W związku z tym, że zagrażające życiu infekcje MRSA są zlokalizowane w mózgu a sama Van słabo penetruje przez BBB, ważne było aby stworzone koniugaty penetrowały do tkanki mózgowej. W tym celu wybrano koniugat [Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 i połączono go z barwnikiem fluorescencyjnym – fluoresceiną (FI). Badany koniugat wstrzykiwano myszom do żyły ogonowej a po dwóch godzinach izolowano mózgi zwierząt w których badano obecność koniugatu za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Obecność koniugatu uwidoczniła się w postaci zielonego koloru w preparatach tkanki mózgowej Fig. 4.

#### Przykład 5

Ilościowa ocena zdolności przechodzenia koniugatu [Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 przez barierę krew-mózg (BBB)

Aby ilościowo oszacować ilość koniugatu w tkance mózgowej w porównaniu do samej Van zastosowano model myszy. Badany koniugat lub Van podano do żyły ogonowej a po 2 h mózgi zwierząt izolowano, homogenizowano a następnie analizowano za pomocą LC-MS. Wyniki przedstawiono w Tab. 4.

Tabela 4

Związek (iv)	Stężenie w mózgu [nM] jako (Średnia±SD)		
	Van	TP10	[Lys <sup>7</sup> (PEG <sub>4</sub> -Van)]TP10
NaCl	ND		ND
Van	11±2		ND
TP10		ND	
[Lys <sup>7</sup> (PEG <sub>4</sub> -Van)]TP10	ND		2611*±120
Van+TP10	ND	ND	

ND – nie wykryto

\* istotność statystyczna ( $p < 0.05$ ) w porównaniu do Van

#### Przykład 6

##### Badanie toksyczności wybranych koniugatów

W celu sprawdzenia bezpieczeństwa stosowania badanych koniugatów wykonano test lizy erytrocytów. Do badania wybrano 2 koniugaty Van-PEG<sub>3</sub>-TP10 i Van-PEG<sub>4</sub>-TP10, które wg. danych literaturowych mogły okazać się najbardziej toksyczne ze względu na ortogonalne ułożenie podstawników. Oba koniugaty okazały się nietoksyczne w stosowanym przeciwbakteryjnym zakresie stężeń, jednak koniugat z linkerem PEG<sub>4</sub> wykazuje większe bezpieczeństwo stosowania Fig. 5.

#### Wnioski

Z syntetyzowane koniugaty wykazały większą aktywność przeciwbakteryjną wobec klinicznych szczepów MRSA, zarówno tych zlokalizowanych zewnątrz- i wewnątrzkomórkowo. Dodatkowo koniugaty mają zdolność penetracji przez BBB (badano na wybranym koniugacie) osiągając 200-krotnie wyższe stężenia w mózgu niż sama Van. Ten fakt jest szczególnie istotny w przypadku infekcji MRSA zlokalizowanych w mózgu. Warty podkreślenia jest fakt, że badane koniugaty w niskich stężeniach (terapeutycznych) mają toksyczność podobną do tej wykazywanej przez Van.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania koniugatów wankomycyny (Van) i transportami 10 (TP10) o wzorach ogólnych Van-PEG<sub>3</sub>-TP10 [koniugat I] lub Van-PEG<sub>4</sub>-TP10 [koniugat II] lub TP10-Ala(PEG<sub>4</sub>-Van) [koniugat IV] oraz [Lys<sup>7</sup>(PEG<sub>4</sub>-Van)]TP10 [koniugat IVa] **znamienny tym**, że w pierwszym etapie prowadzi się syntezę łańcucha TP10 i jego analogów oraz modyfikację struktury wankomycyny, a następnie prowadzi się kowalencyjną koniugację obu związków metodą cykloaddycji Huisgena.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że etap otrzymywania łańcucha TP10 i jego analogów obejmuje syntezę peptydów w fazie stałej z wykorzystaniem automatycznego syntetyzatora oraz żywicy TentaGel S RAM mającej osadzenie grup aminowych 0,25 mmol/g, przy czym
  - a) Fmoc chronione aminokwasy przyłącza się jako aktywne pochodne z wykorzystaniem 3-krotnego molowego nadmiaru TBTU z dodatkiem HOBt i NMP w proporcji molowej 1:1:2 w DMF przez 2 x 30 min; następnie usuwa się grupy Fmoc z użyciem 20% roztworu piperidyny w DMF w 2 cyklach (2 x 3,5 min), gdzie dodatkowo

w przypadku syntezy koniugatu I i II N-końcową grupę Fmoc usuwa się za pomocą 20% roztworu piperydiny w DMF (2 x 5 min), a następnie do N-końcowej grupy aminowej przyłącza się grupę propiolową (Prop) stosując 10-krotny molowy nadmiar bezwodnika kwasu propiolowego w DMF przez 1,5 godziny; mieszaninę przechowuje się w temperaturze 0°C przez 10 min; osad odsącza się, a po odparowaniu DCM otrzymany bezwodnik rozpuszcza się w 5 mL DMF i dodaje się do naczynka reakcyjnego z peptydylo-żywicą, lub

w przypadku syntezy koniugatu III do żywicy przyłącza się pochodną Fmoc-L-propargiloglicyny (Fmoc-Prg-OH), a następnie kolejne reszty aminokwasowe w sekwencji TP10

w przypadku syntezy koniugatu IV i IVa do osłony grupy ε-aminowej reszty Lys<sup>7</sup> stosuje się labilną w środowisku hydrazyny grupę ivDde, którą usuwa się za pomocą 10% roztworu monohydratu hydrazyny w DMF (3 x 20 min), a następnie przyłącza się grupę alkinową do grupy ε-aminowej reszty Lys<sup>7</sup> stosując 10-krotny molowy nadmiar bezwodnika kwasu propiolowego; lub

w przypadku syntezy koniugatu IV N-końcową resztę Ala przyłącza się jako Boc-chroniony aminokwas, lub

w przypadku koniugatu IVa do N-końcowej grupy aminowej przyłącza się 6-karboksyfluoresceinę (FI) stosując 3-krotny molowy nadmiar estru N-hydroksysukcynimidowego 6-karboksyfluoresceiny (FI-NHS) z dodatkiem DIPEA w proporcji molowej 1:1 w DMF przez 1,5 godziny

- b) odszczepianie peptydów od żywicy prowadzi się z jednoczesnym usunięciem osłon grup funkcyjnych w łańcuchach bocznych za pomocą mieszaniny kwas trifluorooctowy (TFA), fenol, triizopropylsilan i woda (w proporcji molowej 88:5:2:5) przez 2 godziny, następnie
  - c) peptydy wytrąca się z mieszaniny reakcyjnej za pomocą zimnego eteru dietylowego; następnie osad odsącza się, rozpuszcza w wodzie i liofilizuje się; surowe peptydy analizuje się i oczyszcza za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych; tożsamość otrzymanych produktów potwierdzano się za pomocą spektrometrii mas.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że modyfikację struktury wankomycyny w celu otrzymania jej pochodnych modyfikowanych grupą azydkową prowadzi się w roztworze, gdzie:
    - a) dla pochodnej Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>, ester N-hydroksysukcynimidowy kwasu 15-azydo-4,7,10,13-tetraoksyntadecanowego (N<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-NHS) przyłącza się do chlorowodoru wankomycyny poprzez pierwszorzędową grupę aminową we fragmencie cukrowym przeprowadzając reakcję w roztworze wodnym zawierającym DIPEA, przy proporcjach molowych reagentów 1:1.5:2.5, przy czym roztwór miesza się w temperaturze 4°C przez 30 min;
    - b) dla pochodnej Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>, 1-amino-11-azydo-3,6,9-trioksyundekan (N<sub>3</sub>-PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>) przyłącza się do chlorowodoru wankomycyny poprzez grupę karboksylową we fragmencie aglikonowym przeprowadzając reakcję w roztworze DMF z wykorzystaniem HATU (heksafluorofosforan 2-(1H-9-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy) z dodatkiem DIPEA, przy proporcjach molowych reagentów 1:0,8:1:2, przy czym roztwór miesza się w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, po upływie tego czasu, produkty reakcji natychmiast rozdziela się za pomocą preparatywnej RP-HPLC; eluaty frakcjonuje się i analizuje za pomocą analitycznej RP-HPLC;
    - c) następnie frakcje Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> lub Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> o czystości powyżej 98% łączy się i liofilizuje się, a tożsamość otrzymanych produktów potwierdza się za pomocą spektrometrii mas.
  4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kowalencyjną koniugację obu związków metodą cykloaddycji Huisgena do uzyskania koniugatów prowadzi się poprzez reakcje 0,8 μM zmodyfikowanych grupą alkinową analogów TP10 otrzymanych sposobem według zastrz. 2 z 0,4 μM zmodyfikowanych grupą azydkową pochodną Van-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> lub Van-PEG<sub>4</sub>-N<sub>3</sub> w obecności 1,5 ml mieszaniny woda/*tert*-butanol w stosunku objętościowym 1:1 i 8 μL 0,1 M roztworu CuSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O oraz 4 μL świeżo przygotowanego 0,5 M roztworu askorbinianu sodu w proporcji molowej 2:1:2:5, przy czym mieszaninę reakcyjną miesza się w temperaturze pokojowej przez około 24 godziny do utworzenia 1,2,3-triazolu, następnie rozpuszczalnik odparowuje się i produkty syntezy liofilizuje się; po czy, otrzymane surowe koniugaty oczyszcza się za pomocą preparatywnej lub semi-preparatywnej RP-HPLC; uzyskując koniugaty o czystości powyżej 98%.
  5. Koniugaty otrzymane sposobem według któregokolwiek z zastrzeżeń 1–4 do zastosowania jako lek przeciwbakteryjny wobec *Staphylococcus aureus* lub *Enterococcus spp* lub *Neisseria spp*.

6. Koniugaty otrzymane sposobem według któregokolwiek z zastrzeżeń 1–4 do zastosowania jako lek przeciwbakteryjny wobec szczepu MRSA N315 i MRSA hetero-VISA 6347.
7. Koniugaty do zastosowania według zastrz. 6 do leczenia infekcji MRSA zlokalizowanych w mózgu.

## Rysunki

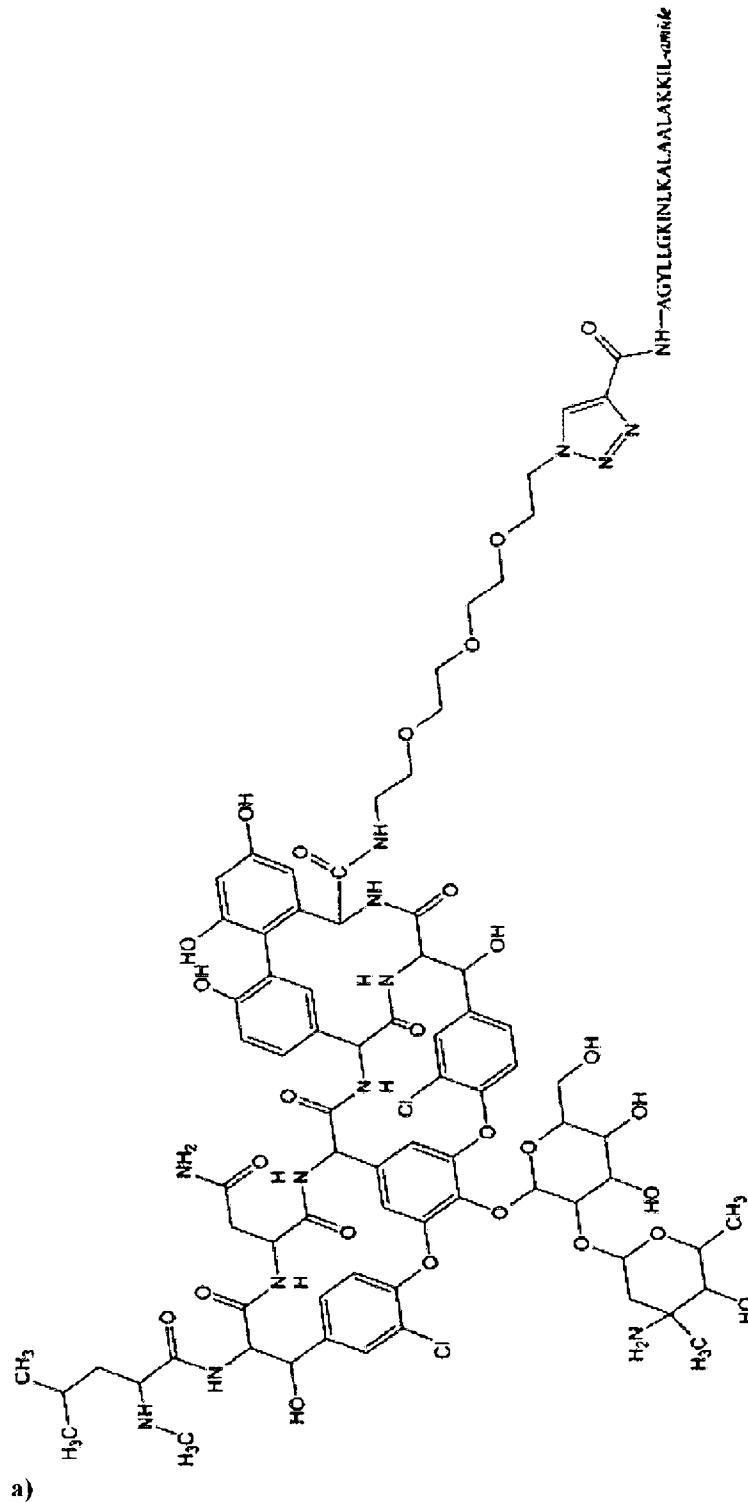


Fig. 1

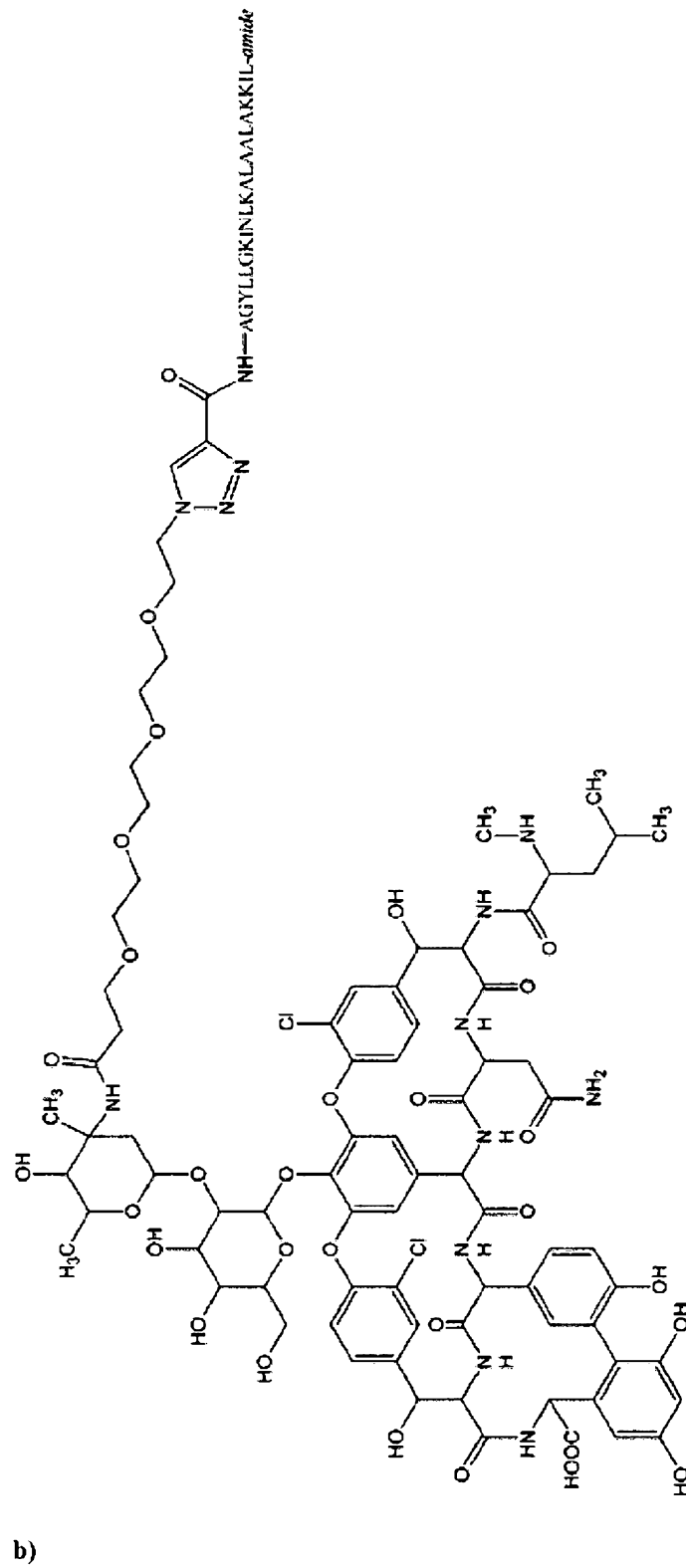


Fig.1

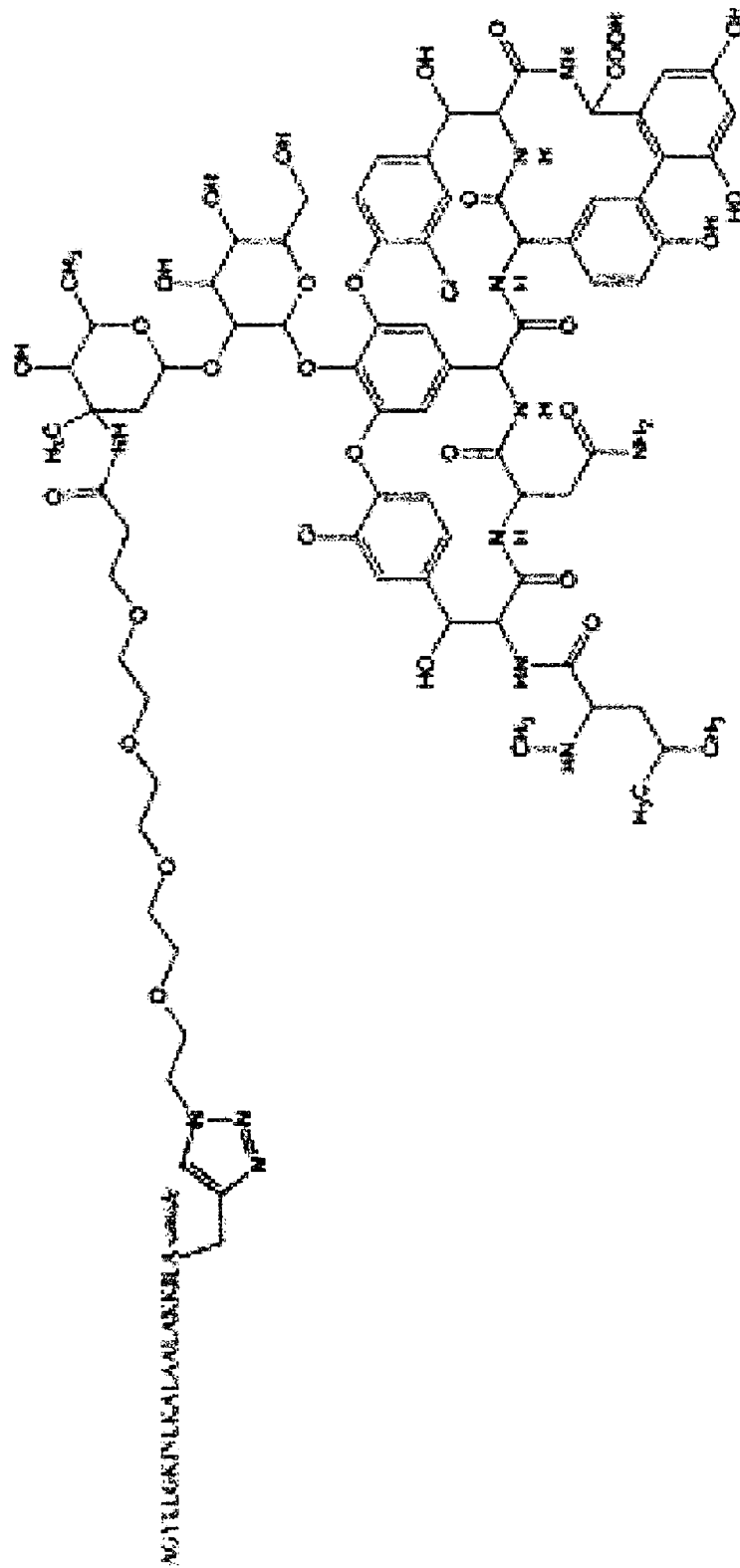


Fig.1

c)

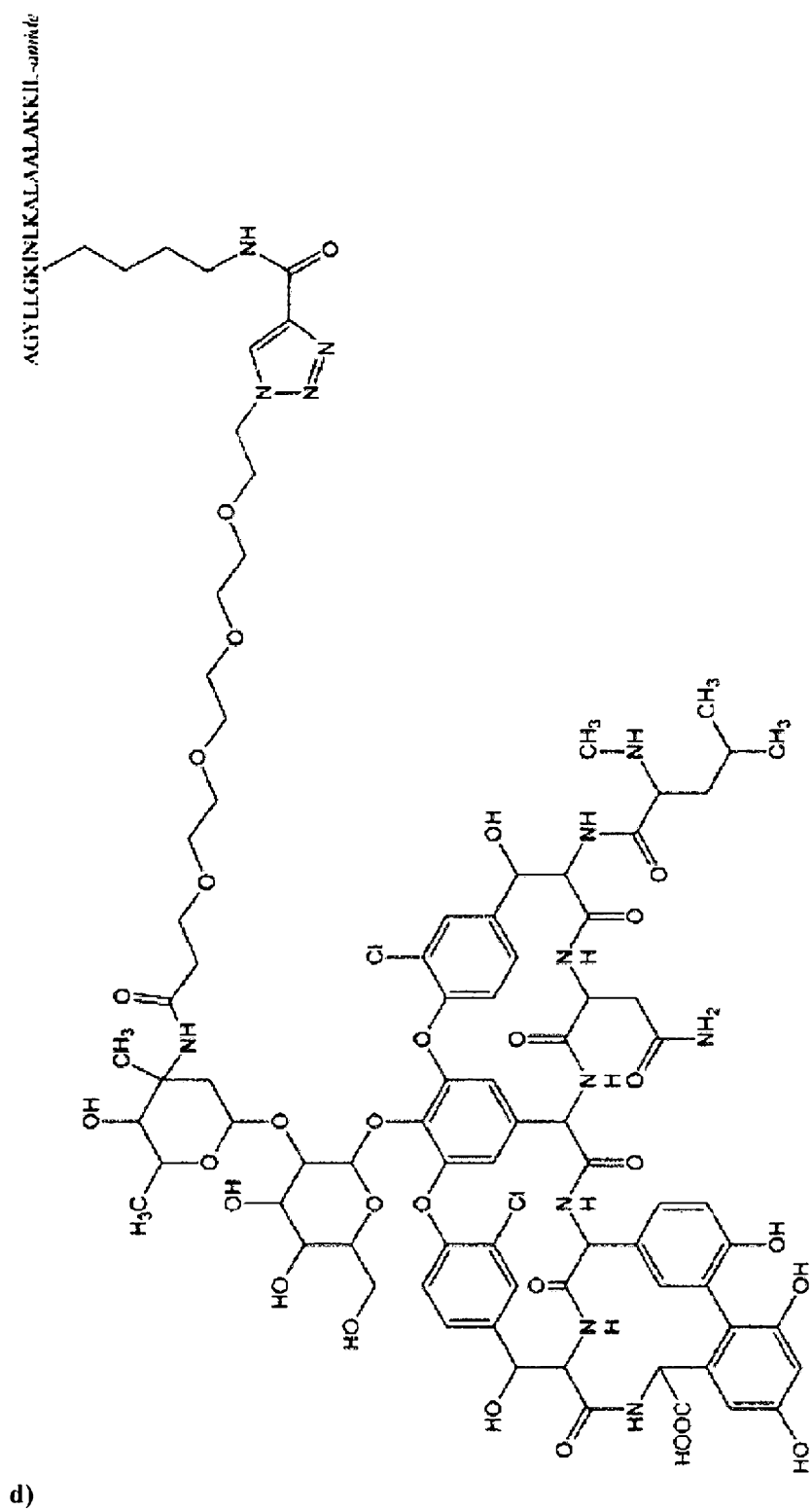
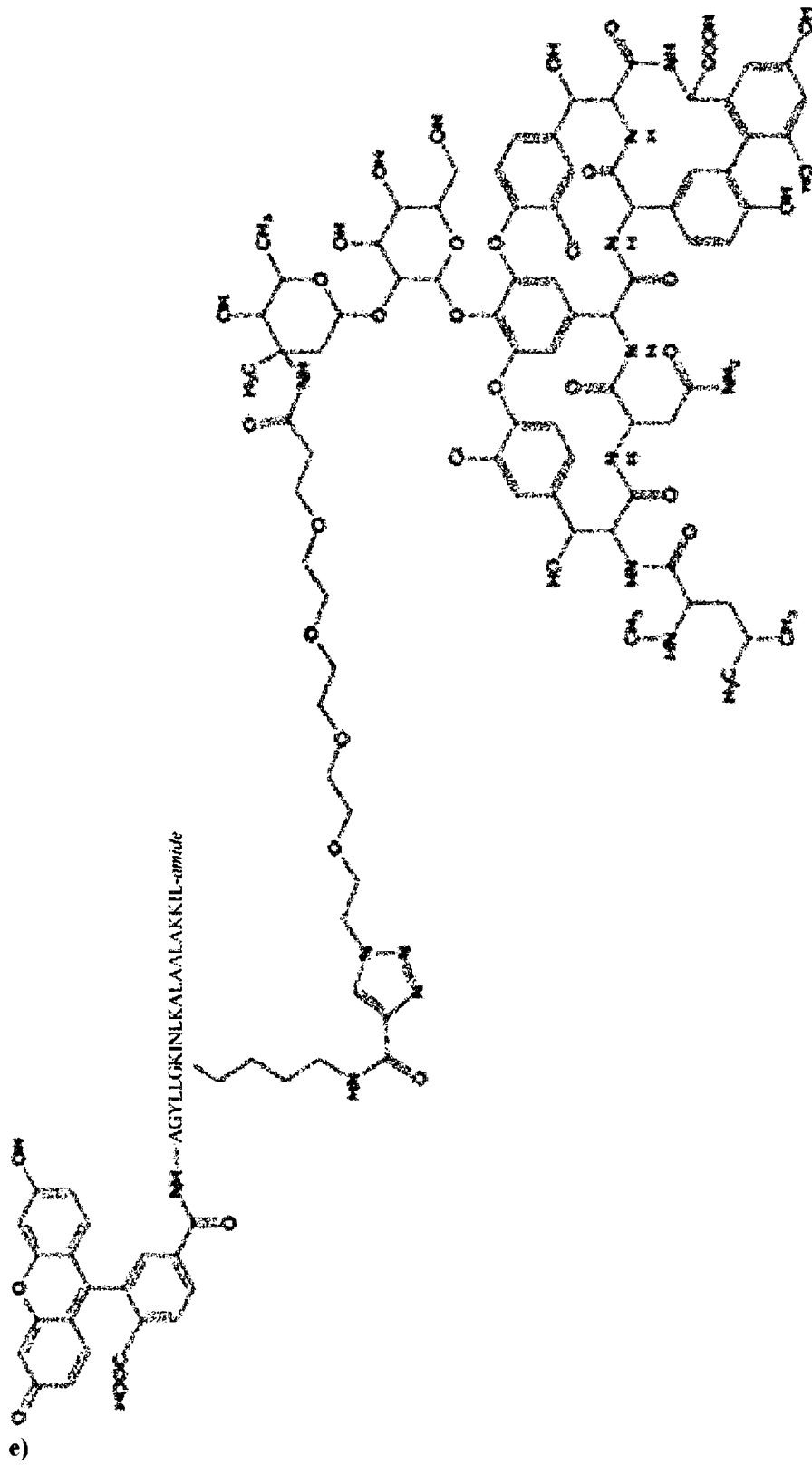


Fig.1



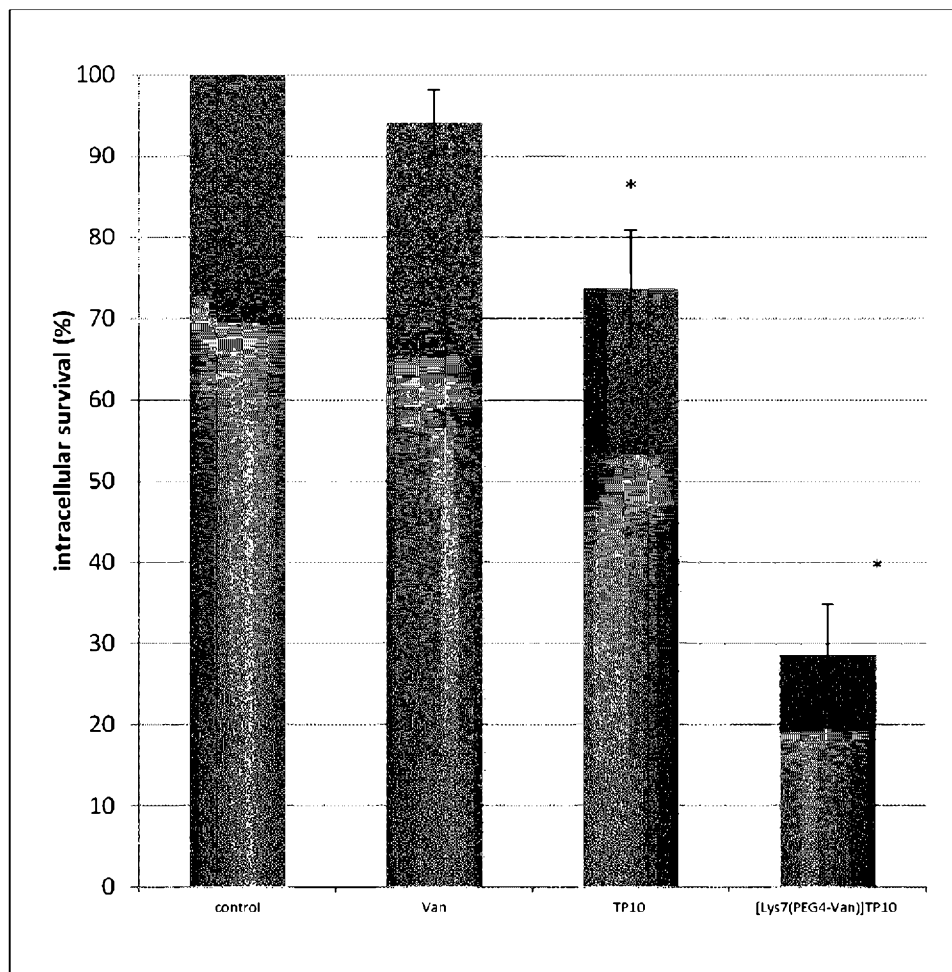


FIG.2

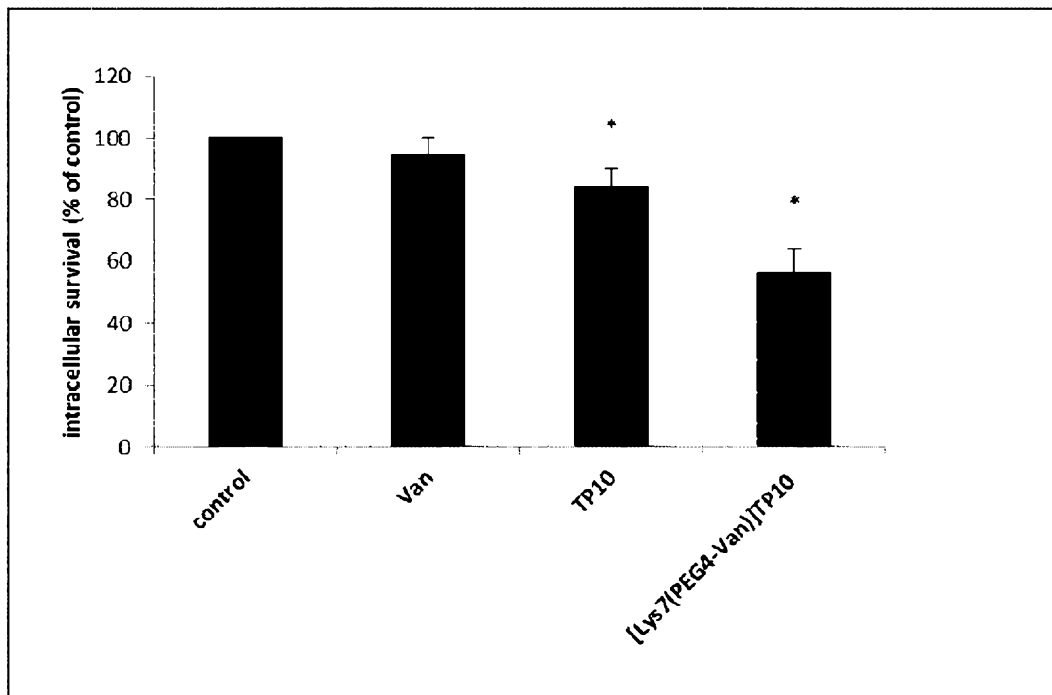


FIG.3

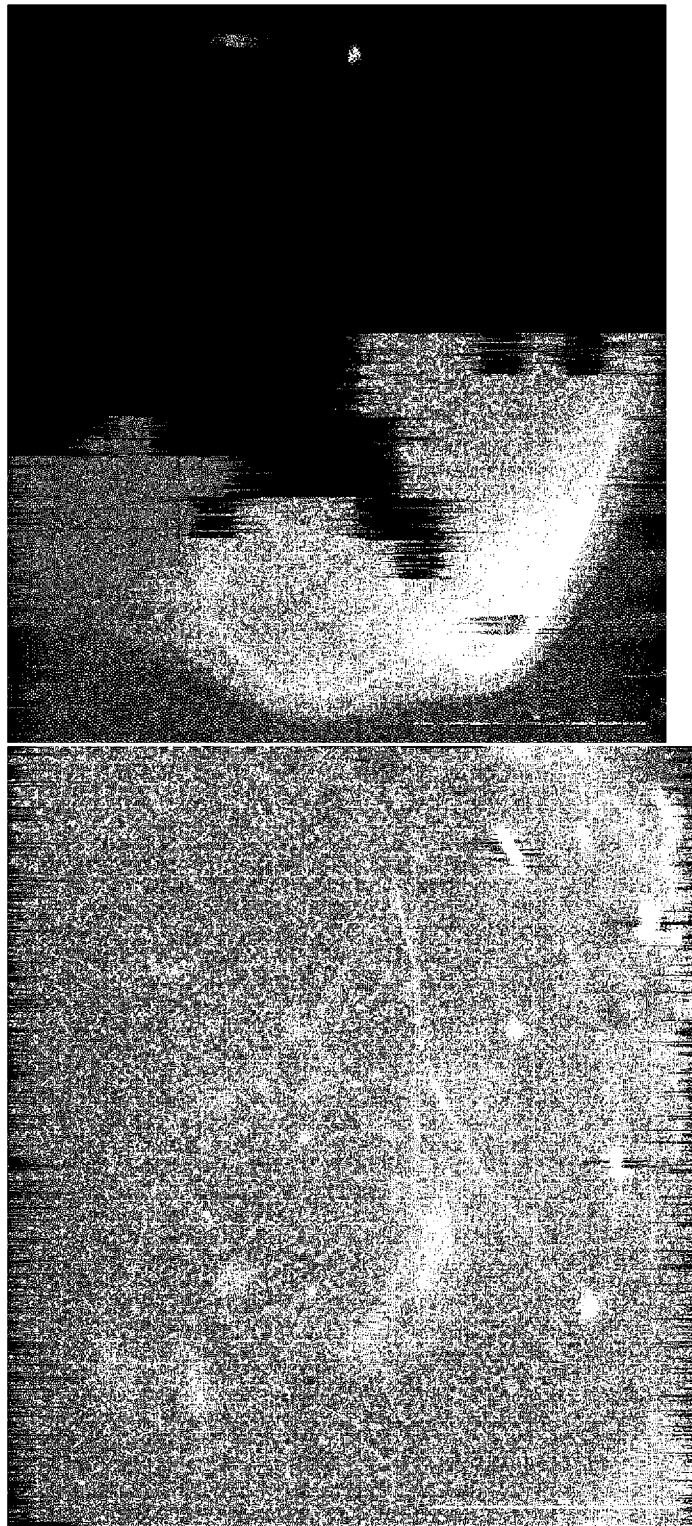


FIG.4

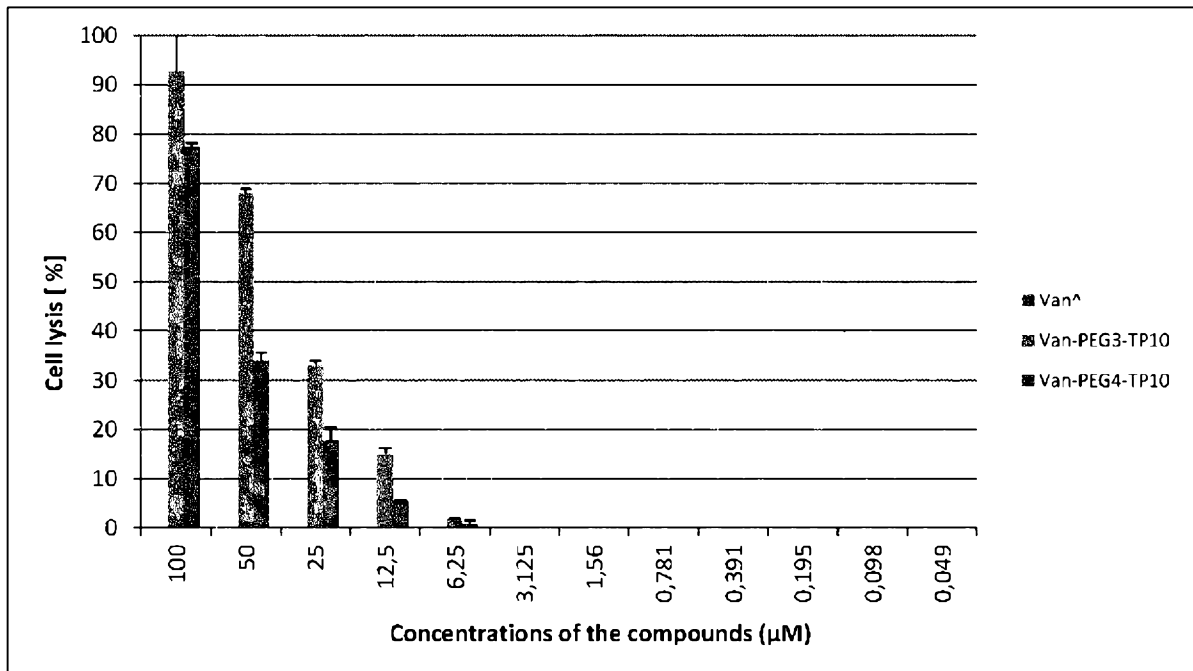


FIG.5