

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234565**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422150**

(22) Data zgłoszenia: **07.07.2017**

(51) Int.Cl.

C07D 499/46 (2006.01)

C07D 207/452 (2006.01)

C07F 5/02 (2006.01)

A61K 31/43 (2006.01)

A61K 31/69 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(54) **Pochodne kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA), związki pośrednie,
oraz zastosowanie medyczne pochodnych kwasu 6-aminopenicylanowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

14.01.2019 BUP 02/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT BIOLOGII MEDYCZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Łódź, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**AGNIESZKA BOGUSŁAWA OLEJNICZAK,
Łódź, PL**

**ZBIGNIEW JAN LEŚNIKOWSKI, Łódź, PL
DARIA RÓŻYCKA, Działdowo, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Strzelecka

PL 234565 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pochodne kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) zawierające klaster boru przyłączony wiązaniem amidowym z 6-APA oraz zastosowanie medyczne wybranych pochodnych. Przedmiotem wynalazku są także związki pośrednie do syntezy pochodnych kwasu 6-aminopenicylanowego.

W ramach poszukiwania związków chemicznych o potencjalnej aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej znane są metody syntezy kwasu 6-aminopenicylanowego modyfikowanego innymi grupami niż klaster boru. Przykładem może być tutaj przyłączenie, za pomocą wiązania amidowego do grupy aminowej 6-APA, grupy ferrocenylowej [J. Skiba, A. Rajnisz, K. N. de Oliviera, I. Ott, J. Solecka, K. Kowalski, Ferrocenyl bioconjugates of ampicillin and 6-aminopenicillinic acid – synthesis, electrochemistry and biological activity, Eur. J. Med. Chem., 2012, 234–239]. Ze względu na obecność jonu żelaza obecnego we wprowadzonej modyfikacji scharakteryzowano je elektrochemicznie. Tak modyfikowane pochodne 6-APA badano pod kątem ich aktywności wobec *Staphylococcus aureus* (MSSA), *S. aureus* (MRSA), *S. aureus* (VRSA) i *Staphylococcus epidermidis*. Ich aktywność wobec wymienionych bakterii została wyrażona wartością minimalnego stężenia hamującego (the Minimal Inhibitory Concentrations, MIC) wzrost bakterii. Otrzymane koniugaty ferrocen-6-APA wykazały najwyższą aktywność wobec *S. aureus* (MSSA) (MIC 10 µg/mL–40 µg/mL). Niższą aktywność wykazał niemodyfikowany 6-APA. Zsyntezowane połączenia hamowały aktywność enzymu karboksypeptydazy 64–575; badane był również pod kątem hamowania wzrostu komórek raka okrężnicy HT-29 oraz komórek raka gruczołu mlekowego MCF-7 [J. Skiba, A. Rajnisz, K. N. de Oliviera, I. Ott, J. Solecka, K. Kowalski, Ferrocenyl bioconjugates of ampicillin and 6-aminopenicillinic acid – synthesis, electrochemistry and biological activity, Eur. J. Med. Chem., 2012, 234–239].

Znana jest także metoda syntezy 6-APA modyfikowanego grupą rutenicylową. Koniugat otrzymano w analogiczny sposób jak ferrocenylowe pochodne 6-APA. Posłużył on do badań rentgenostrukturalnych – rozwiązana została struktura krystalograficzna utworzonego kompleksu 6-APA modyfikowanego grupą rutenicylową a białkiem CTX-M-14E166A β-laktamazą ujawniając tym samym rodzaj oddziaływań między modyfikowanym β-laktamem a białkiem. Jest to pierwszy przykład kompleksu utworzonego między syntetycznym związkiem organometalicznym a wybranym białkiem. Zbadano aktywność biologiczną (hamowanie wzrostu) takiego modyfikowanego 6-APA wobec bakterii Gram-dodatnich: *S. aureus* (MSSA), *S. aureus* (MRSA), *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* oraz dwunastu izolowanych klinicznie szczepów *Staphylococcus*. Przeprowadzony screening ujawnił, że modyfikowany grupą rutenicylową 6-APA jest aktywny wobec wszystkich wykorzystanych do badań szczepów bakteryjnych. Najwyższą aktywność zaobserwowano wobec szczepów *S. aureus* ATCC™ (MSSA) (MIC 2 mg/mL) oraz *S. epidermidis* ATCC® 12228t (MIC 4 mg/mL). Nie zaobserwowano aktywności wybranych związków wobec *S. aureus* ATCC® 43300 (MRSA) [E. M. Lewandowski, J. Skiba, N. J. Torelli, A. Rajnisz, J. Solecka, K. Kowalski, Y. Chen, Antibacterial properties and atomic resolution X-ray complex crystal structure of a ruthenocene conjugated β-lactam antibiotic, Chem. Comm., 2015, 51, 6186–6189].

Znane są także metody syntezy pochodnych antybiotyku β-laktamowego na drodze kondensacji 6-APA z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (ibuprofen, ketoprofen, diklofenak, dexibuprofen, naproxen, flurbiprofen, indometacyna, mefenam). Nowe koniugaty otrzymano w wyniku kondensacji odpowiedniego chlorku kwasowego leku przeciwzapalnego z grupą aminową 6-APA, z utworzeniem wiązania amidowego między nimi. Zbadano aktywność biologiczną takich modyfikowanych koniugatów wobec *Escherichia coli*, *Salmonella typhae*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, poprzedzoną badaniami *in silico*. Wybrane połączenia chemiczne wykazywały aktywność wobec *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, w zgodzie z wynikami obliczeniowymi. Ponadto jeden z otrzymanych związków wykazał aktywność hamującą wzrost szczepu *E. coli* MurC (IC₅₀ = 12,5 µM) [Z. Ashraf, A. Bais, Md. M. Manir, U. Niazi, Novel penicillin analogues as potential antimicrobial agents; design, synthesis and docking studies, PLoS One, 2015, 8 :e0135293. doi: 10.1371 /journal.pone.0135293. eCollection].

Opublikowano metodę syntezy modyfikowanych β-laktamów na drodze kondensacji 6-APA z aromatycznymi chlorkami kwasowymi jako potencjalne inhibitory fosfatazy fosfatydowej. W grupie otrzymanych związków zidentyfikowano jeden wykazujący działanie hamujące wobec wymienionego enzymu (K_{ic} = 12 µM), porównywalne do znanych inhibitorów tego enzymu [Faridoon, W. M. Hussein,

N. Ul Islam, L. W. Guddat, G. Schenk, R. P. McGeary, Penicillin inhibitors of purple acid phosphatase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22, 2555–2569].

W ramach poszukiwania związków o właściwościach przeciwbakteryjnych opracowano metodę syntezy pochodnej 6-APA modyfikowanych strukturalnym fragmentem antybiotyku przeciwnowotworowego sarkomycyny. Wykazano, że wśród otrzymanych cząsteczek obecne są te charakteryzujące się aktywnością przeciwnowotworową i przeciwbakteryjną [A. O. Martirosyan, S. P. Gasparyan, V. E. Oganessian, V. V. Martirosyan, A. A. Chachoyan, E. V. Kazaryan, B. T. Garibdzhanyan, Synthesis, antibacterial and antitumor activity of semisynthetic penicillins and cephalosporins based on new sarcomycin analogs, *Pharm. Chem. J.*, 2005, 39, 67–69].

Karborany (karbaborany wg IUPAC) to klastery boru z jednym lub większą liczbą atomów boru zastąpionych przez atom węgla. Są to struktury wielościenne w których podstawową jednostką architektoniczną jest trójkąt. Najbardziej popularne w chemii organicznej, bioorganicznej i medycznej są dikarborany (dikarba-*c*loso-dodekaborany) zaliczane do dużych karboranów.

Karborany ze względu na swoje wyjątkowe właściwości fizyczne i chemiczne znajdują liczne zastosowania praktyczne. Pochodne karboranów stosowane są w syntezie chemicznej jako grupa ochronna aldehydów i ketonów usuwana w warunkach zasadowych [H. Nakamura, L. Aoyagi, Y. Yamamoto, *o*-Carborane as a novel protective group for aldehydes and ketones, *J. Org. Chem.*, 1997, 62, 780], niekoordynujące aniony [R. N. Grimes, Boron clusters come of age, 2004, 81, 657–672], wykorzystywane są także do konstrukcji jonoselektywnych elektrod [R. N. Grimes, Boron clusters come of age, 2004, 81, 657–672]. Karborany stosuje się jako fazę stałą w chromatografii gazowej, ze względu na możliwość wykonywania pomiarów w wysokich temperaturach [R. N. Grimes, Boron clusters come of age, 2004, 81, 657–672]. Związki te są materiałami stosowanymi w optyce nieliniowej [R. N. Grimes, Boron clusters come of age, 2004, 81, 657–672].

Ze względu na dużą zawartość boru a także duży przekrój czynny izotopu boru ^{10}B na wychwytywanie neutronów, pochodne klastery boru wykorzystywane są do projektowania nośników boru w terapii nowotworów metodą wychwytywania neutronów przez bor (BNCT) [R. F. Barth, J. A. Coderre, M. G. Vicente, T. E. Blue, Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects, *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 3987–4002].

Karborany to związki charakteryzujące się wysoką lipofilowością wynikającą z częściowego ładunku ujemnego na atomach wodoru przyłączonych do atomów boru. Dzięki temu oddziałują z biocząsteczkami poprzez wiązanie protonowo-wodorkowe między atomami wodoru (posiadającymi częściowy ładunek dodatni) grup będących donorami protonów, a akceptorami. Ich charakter umożliwia tworzenie klasycznych wiązań wodorkowych. Zastosowanie karboranów jako lipofilowych farmakoforów zostało opisane w pionierskiej pracy Endo i współ. [K. Yamamoto, Y. Endo, Utility of boron clusters for drug design. Hansch-Fujita hydrophobic parameters π of dicarba-*c*loso-dodecaboranyl groups, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 2389–2392].

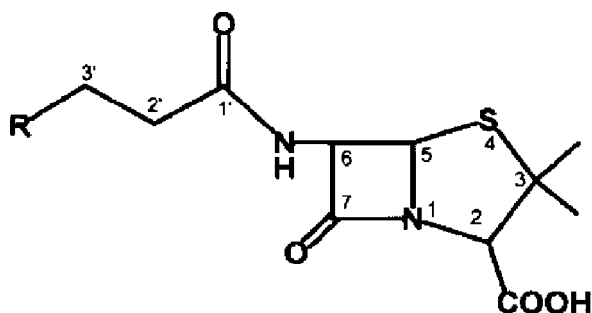
Opisano wiele związków w których karborany stanowią podstawniki bądź też stosowane są zamiennie z grupami fenyłowymi będącymi w strukturze związku macierzystego [F. Issa, M. Kassiou, L. M. Rendina, Boron in drug discovery: carboranes as unique pharmacophores, *Chem. Rev.*, 2011, 111, 5701–5722].

Klaster karboranylowy wykorzystano do modyfikacji znanych leków przeciwvirusowych takich jak: gancyklowir (GCV), acyklowir (ACV), cidofovir (CDV) oraz valgancyklowir (VCDV). Zbadano ich cytotoksyczność oraz wykazano aktywność wobec ludzkiego wirusa cytomegalii (HCMV) oraz wirusa opryszczki typu 1 (HSV-1) [A. B. Olejniczak, A. M. Adamska, E. Paradowska, M. Studzińska, P. Suski, Z. J. Leśnikowski, Modification of selected anti-HCMV drugs with lipophilic boron cluster modulator, *Acta Pol. Pharm – Drug. Res.*, 2013, 70, 489–504].

Klaster 1,12-dikarba-*c*loso-dodekaboranylowy wykorzystano do modyfikacji selektywnego inhibitora neuraminidazy – oseltamiwiru. Karboranylowy analog oseltamiwiru był mniej aktywny przeciwvirusowo w porównaniu do jego prekursora [A. Adamska, A. B. Olejniczak, K. Zwoliński, W. J. Szczeppek, E. Król, B. Szewczyk, G. Gryniewicz, Z. J. Leśnikowski, Oseltamivir analog with boron cluster modulator, *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.*, 2012, 69, 1218–1223].

Istota wynalazku

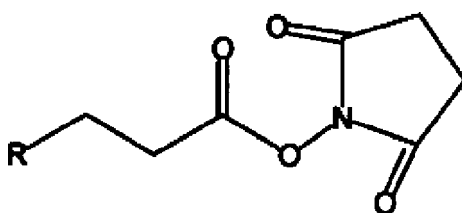
Przedmiotem wynalazku są pochodne kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) składające się z klastera boru przyłączonego wiązaniem amidowym z 6-APA o wzorze ogólnym 1,



wzór 1

w którym R oznacza klaster boru, wybrany z grupy obejmującej 1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano (*orto*-karboranyl), 1,7-dikarba-*closo*-dodekaborano (*meta*-karboranyl) lub 1,12-dikarba-*closo*-dodekaborano (*para*-karboranyl).

Przedmiotem wynalazku są także związki pośrednie o wzorze ogólnym 3



wzór 3

w którym R ma wyżej podane znaczenie tj. podstawnik wybrany z grupy obejmującej 1,2-dikarba-*closo*-dodekaborano (*orto*-karboranyl), 1,7-dikarba-*closo*-dodekaborano (*meta*-karboranyl) lub 1,12-dikarba-*closo*-dodekaborano (*para*-karboranyl).

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie medyczne związku o wzorze **1b** jako związku bakteriobójczego wobec bakterii Gram-dodatnich takich jak *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Aktywność biologiczną związków **1a**, **1b**, **1c** oceniano badając ich zdolność do hamowania wzrostu wybranych szczepów bakterii oraz grzybów.

Wśród bakterii wykorzystanych do badania aktywności biologicznej związków **1a**, **1b**, **1c** były: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumonia* (MDR), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*. Patogeny te są przyczyną zakażeń szpitalnych na całym świecie. Właściwości przeciwgrzybicze związków **1a**, **1b**, **1c** zostały zbadane wobec *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*.

Przygotowane do badań związki **1a**, **1b**, **1c** rozpuszczono w DMSO i wodzie uzyskując ich końcowe stężenie 32 $\mu\text{g/mL}$. Badania przeprowadzono na płytkach 384-dołkowych, tak dla szczepów bakterii jak i grzybów. Test powtórzono dwukrotnie utrzymując końcowe stężenie DMSO nie większym niż 1%.

Zahamowanie wzrostu bakterii określono stosując pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm. Procentowe zahamowanie wzrostu zostało obliczone dla każdego dołka, stosując kontrolę ujemną (tylko media) oraz kontrolę dodatnią (bakterie bez czynnika hamującego ich wzrost). Znaczenie wartości hamowania wzrostu bakterii zostało określone za pomocą czynnika Z-score. Przyjęto, że związki aktywne to takie, które charakteryzują się 80% lub wyższym zahamowaniem namnażania bakterii. Związki częściowo aktywne hamują wzrost bakterii w 50,9–79,9%. Związki hamujące wzrost bakterii poniżej 50% są związkami nieaktywnymi.

Zahamowanie wzrostu *C. albicans* określono stosując pomiar absorbancji przy długości fali 530 nm, podczas gdy zahamowanie wzrostu *C. neoformans* zostało określone odczytem absorbancji między 600 a 750 nm, po dodaniu resazuryny (0,001% stężenie końcowe) i dodatkowej inkubacji w temperaturze 35°C w czasie dwóch godzin. Procentowe zahamowanie wzrostu zostało obliczone dla każdego dołka, stosując kontrolę ujemną (media) oraz kontrolę dodatnią (grzyby bez czynnika hamującego ich wzrost). Znaczenie wartości hamowania wzrostu grzybów zostało określone za pomocą czynnika Z-score. Stwierdzono, że związki aktywne to takie, które charakteryzują się 80% lub

wyższym zahamowaniem wzrostu grzybów. Związki częściowo aktywne hamują wzrost grzybów w 50,9–79,9%. Związki hamujące wzrost grzybów poniżej 50% są związkami nieaktywnymi.

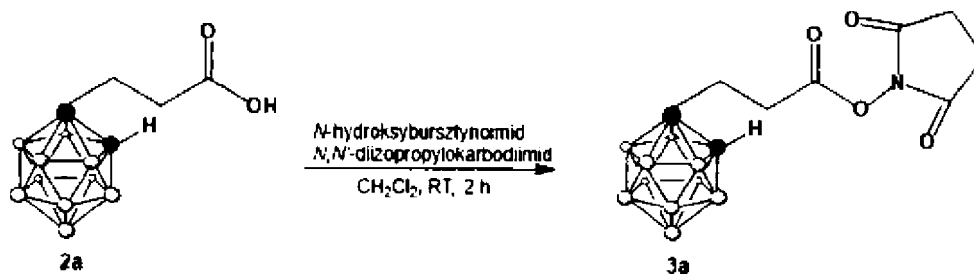
Antybiotyki bakteriobójcze takie jak kolistyna i wankomycyna zostały włączone jako związki kontrolne hamujące wzrost wymienionych powyżej bakterii, a w przypadkach grzybów zastosowano flukonazol. Wymienione związki podane zostały w czterech stężeniach – w dwóch powyżej i w dwóch poniżej ich wartości MIC.

Przeprowadzone testy wykazały, że koniugat **1b** charakteryzuje się znaczną aktywnością wobec bakterii Gram-dodatnich – *S. aureus* opornych na metycylinę (półsyntetyczny antybiotyk β -laktamowy). Związek **1b** hamuje wzrost *S. aureus* w 99,84%, w stężeniu 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Związki **1a** i **1c** nie są aktywne wobec tej bakterii, co może świadczyć o wpływie izomerii klastru boru na aktywność biologiczną całego koniugatu **1b**. Ponadto związki: 6-APA oraz penicylina G (sól potasowa), zastosowane jako kontrola, nie wykazały aktywności wobec *S. aureus* w stężeniu 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, jak również pozostałych bakterii. Koniugaty **1a**, **1b**, **1c** oraz związki kontrolne 6-APA oraz penicylina G nie hamowały wzrostu grzybów *C. albicans* oraz *C. neoformans*.

Poniżej przedstawiono przykłady wykonania wynalazku.

Przykład I

Wytwarzanie związku o wzorze **3a**.



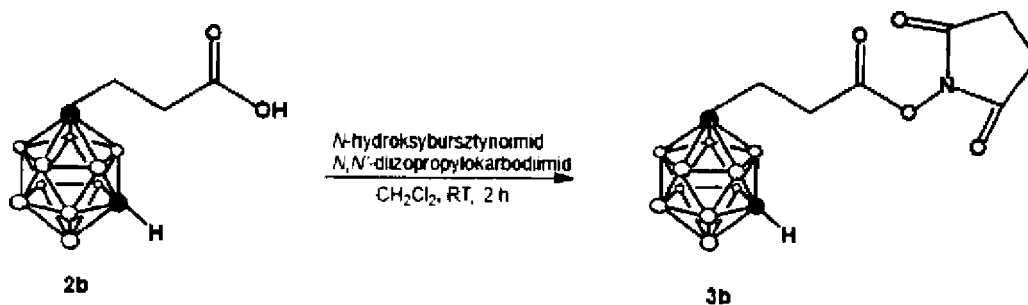
Związek wyjściowy o wzorze **2a** do syntezy związku otrzymano według przepisów znanych z literatury: J. Malmquist, S. Sjöberg, Asymmetric synthesis of *p*-carboranylalanine (*p*-Car) and 2-methyl-*o*-carboranylalanine (Me-*o*-Car), Tetrahedron, 1996, 52, 9207–9218.

Kwas 3-(1,2-dikarba-*closo*-dodekaboran-1-yl)propionowy (**2a**) (127 mg, 0,59 mmol), rozpuszczono w bezwodnym dichlorometanie (40,7 mL). Następnie dodano *N*-hydroksybursztynoimid (1 eq.) i *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (1 eq.). Roztwór był mieszany w temperaturze pokojowej. Po 2 godzinach odparowano rozpuszczalnik z mieszaniny reakcyjnej. Surowy produkt **3a** oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230–400 mesh) stosując jako eluent chloroform.

Ester *N*-hydroksybursztynoimidu **3a**: białe ciało stałe, wydajność 78%, $R_f = 0,58$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). ^1H NMR (600,26 MHz, CDCl_3): $\delta = 3,73$ (br s, 1H, CH-karboran), 2,91–2,87 (m, 6H, CH_2 -łącznik, $2 \times \text{CH}_2$ imid kwasu bursztynowego), 2,70 (t, 2H, CH_2 -łącznik), 2,75–1,70 (br m, 10H, $\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) ppm. FT-IR (cm^{-1}) 2572 (BH), 1817 (C=O imid kwasu bursztynowego), 1779 (C=O imid kwasu bursztynowego), 1736 (C=O ester), 721 (BB). ESI-MS m/z : 345 [$\text{M}-\text{H}+\text{MeOH}$] $^-$, obliczone dla: $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{B}_{10}\text{NO}_4 = 314,23$.

Przykład II

Wytwarzanie związku o wzorze **3b**.



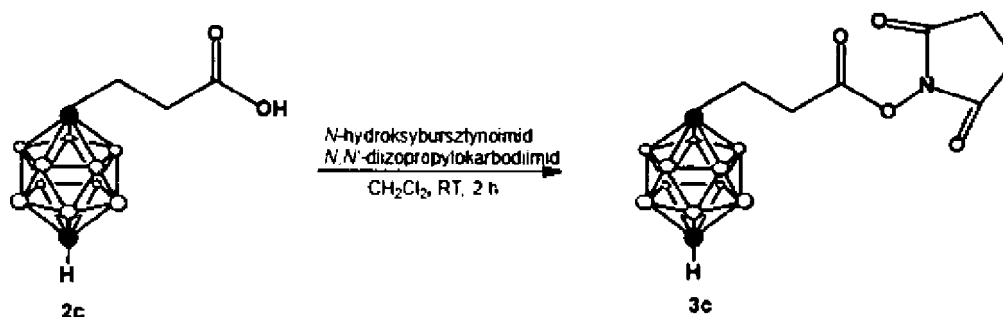
Związek wyjściowy o wzorze **2b** do syntezy związku otrzymano według przepisów znanych z literatury C. Naeslund, S. Ghirmai, S. Sjöberg, Enantioselective synthesis of *m*-carboranylalanine, a boron-rich analogue of phenylalanine. *Tetrahedron*, 2005, 61, 1181–1186.

Kwas 3-(1,7-dikarba-*closo*-dodekaboran-1-yl)propionowy (**2b**) (20 mg, 0,09 mmol), rozpuszczono w bezwodnym dichlorometanie (6,5 mL). Następnie dodano *N*-hydroksybursztynoimid (2 eq.) i *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (2 eq.). Roztwór był mieszany w temperaturze pokojowej. Po 2 godzinach odparowano rozpuszczalnik z mieszaniny reakcyjnej. Surowy produkt **3b** oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230–400 mesh) stosując jako eluent chloroform.

Ester *N*-hydroksybursztynoimidu **3b**: białe ciało stałe, wydajność 78%, $R_f = 0,80$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10), $R_f = 0,2$ (Et_2O). $^1\text{H NMR}$ (600,26 MHz, CDCl_3): $\delta = 2,99$ (br s, 1H, CH-karboran), 2,86 (br s, 4H, $2 \times \text{CH}_2$ imid kwasu bursztynowego), 2,74–2,72 (m, 2H, CH_2 -łącznik), 2,43 (t, 2H, CH_2 -łącznik), 2,75–1,75 (br m, 10H, $\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) ppm. FT-IR (cm^{-1}) 2605 (BH), 1817 (C=O imid kwasu bursztynowego), 1780 (C=O imid kwasu bursztynowego), 1737 (C=O ester), 725 (BB). ESI-MS m/z : 216 [$\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{11}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$], obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{B}_{10}\text{NO}_4 = 314,23$.

Przykład III

Wytwarzanie związku o wzorze **3c**.



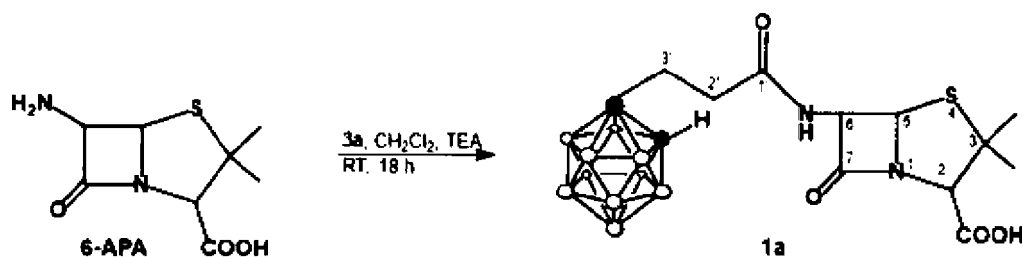
Związek wyjściowy o wzorze **2c** do syntezy związku otrzymano według przepisów znanych z literatury J. Malmquist, S. Sjöberg, Asymmetric synthesis of *p*-carboranylalanine (*p*-Car) and 2-methyl-*o*-carboranylalanine (Me-*o*-Car), *Tetrahedron*, 1996, 52, 9207–9218.

Kwas 3-(1,12-dikarba-*closo*-dodekaboran-1-yl)propionowy (**2c**) (102,5 mg, 0,47 mmol), rozpuszczono w bezwodnym dichlorometanie (32,8 mL). Następnie dodano *N*-hydroksybursztynoimid (1 eq.) i *N,N'*-diisopropylkarbodiimid (1 eq.). Roztwór był mieszany w temperaturze pokojowej. Po 2 godzinach odparowano rozpuszczalnik z mieszaniny reakcyjnej. Surowy produkt **3c** oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230–400 mesh) stosując jako eluent chloroform.

Ester *N*-hydroksybursztynoimidu **3c**: białe ciało stałe, wydajność 86%, $R_f = 0,42$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10). $^1\text{H NMR}$ (600,26 MHz, CDCl_3): $\delta = 2,84$ (br s, 4H, $2 \times \text{CH}_2$ imid kwasu bursztynowego), 2,71 (br s, 1H, CH-karboran), 2,55–2,52 (m, 2H, CH_2 -łącznik), 2,10 (t, 2H, CH_2 -łącznik), 2,75–1,75 (br m, 10H, $\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) ppm. FT-IR (cm^{-1}) 2611 (BH), 1818 (C=O imid kwasu bursztynowego), 1781 (C=O imid kwasu bursztynowego), 1738 (C=O ester), 727 (BB). ESI-MS m/z : 345 [$\text{M}+\text{H}+\text{MeOH}$] $^+$ obliczone dla: $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{B}_{10}\text{NO}_4 = 314,23$.

Przykład IV

Wytwarzanie koniugatu o wzorze **1a** z **3a**.

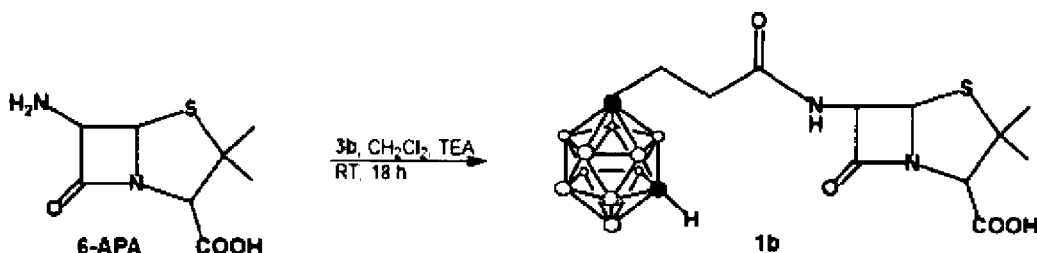


6-APA (18,36 mg, 0,085 mmol) i trietyloaminę (66 μL) zadano dichlorometanem (0,45 mL) do całkowitego rozpuszczenia 6-APA. Następnie roztwór schłodzono w łaźni lód-woda do temperatury 0°C , i dodano ester **3a** (1,2 eq.). Roztwór ogrzano do temperatury pokojowej i dalej reakcję prowadzono przez całą noc. Po czasie reakcję zakończono przez odparowanie rozpuszczalników. Surowy koniugat **1a** oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230–400 mesh) stosując jako eluent metanol (0–10%) w dichlorometanie. Oczyszczony związek **1a** rozpuszczono w dichlorometanie (5 mL) i przemyto jeden raz 3% kwasem solnym (5 mL). Oddzielono warstwę wodną od organicznej a organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Następnie siarczan magnezu usunięto przemywając go dodatkowo dichlorometanem. Odparowano dichlorometan. Oleistą pozostałość ponownie rozpuszczono w dichlorometanie (0,2 mL) i wkroplono do intensywnie mieszanego eteru naftowego (20 mL). Wytrącony osad związku **1a** odwirowano. Po dwukrotnym wytrąceniu osadu zadano go następnie n-heksanem (20 mL). Osad odwirowano i suszono na linii próżniowej pompy olejowej.

Koniugat **1a**: białe ciało stałe, wydajność 51%, $R_f = 0,15$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10). ^1H NMR (699,73 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 13,16$ (br s, 1H, COOH), 8,51 (d, 1H, NH), 5,14 (br s, 1H, CH-karboran), 4,94 (d, 1H, H-6), 4,46 (t, 1H, H-5), 3,62 (s, 1H, H-2 nałożony z sygnałem wody z DMSO), 2,52-2,50 (m, 2H, CH_2 -łącznik sygnał nałożony z sygnałem DMSO), 2,41-2,40 (m, 2H, CH_2 -łącznik), 1,52 (s, 3H, CH_3), 1,20 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (175,95 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 170,29$ (C7), 169,83 (COOH), 75,77 (C3), 72,16 (C5), 56,96 (C2), 51,91 (C6), 34,19 (CH-łącznik), 32,28 (CH-łącznik), 27,27 (CH_3), 26,75 (CH_3); $^{11}\text{B}\{\text{H BB}\}$ NMR (224,50 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -3,18$ (s, 2B), $-6,23$ (s, 2B), $-9,83$ (s, 4B), $-11,58$ to $-12,71$ (m, 2B) ppm. FT-IR (cm^{-1}) 2579 (BH), 1732 (C=O β -laktam), 1667 (C=O amid), 722 (BB). ESI-MS m/z : 415 $[\text{M}]^+$ obliczone dla: $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{B}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} = 415,26$.

Przykład V

Wytwarzanie koniugatu o wzorze **1b** z **3b**.

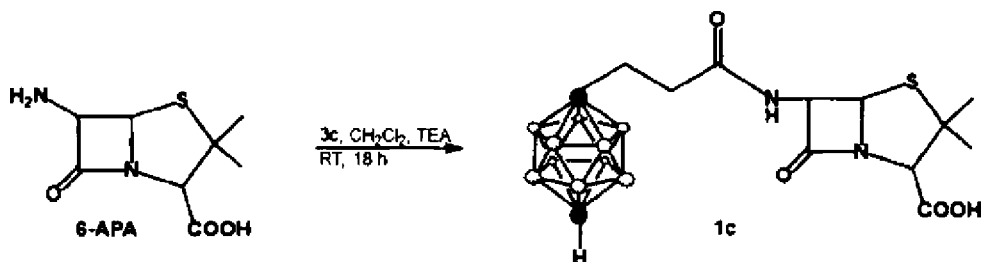


6-APA (11,5 mg, 0,053 mmol) i trietyloaminę (42 μL) zadano dichlorometanem (0,28 mL) do całkowitego rozpuszczenia 6-APA. Następnie roztwór schłodzono w łaźni lód-woda do temperatury 0°C , i dodano ester **3b** (1,2 eq.). Roztwór ogrzano do temperatury pokojowej i dalej reakcję prowadzono całą noc. Po czasie reakcję zakończono przez odparowanie rozpuszczalników. Surowy koniugat **1b** oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230–400 mesh) stosując jako eluent metanol (0–10%) w dichlorometanie. Oczyszczony związek **1b** rozpuszczono w dichlorometanie (3 mL) i przemyto jeden raz 3% kwasem solnym (3 mL). Oddzielono warstwę wodną od organicznej a organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Następnie siarczan magnezu usunięto przemywając go dodatkowo dichlorometanem. Odparowano dichlorometan. Oleistą pozostałość ponownie rozpuszczono w dichlorometanie (0,2 mL) i wkroplono do intensywnie mieszanego eteru naftowego (20 mL). Czynność powtórzono dwukrotnie. Wytrącony osad związku **1b** odwirowano. Po dwukrotnym wytrąceniu osadu zadano go następnie n-heksanem (20 mL). Czynność powtórzono dwa razy. Osad odwirowano i suszono na linii próżniowej pompy olejowej.

Koniugat **1b**: białe ciało, wydajność 42%, $R_f = 0,16$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10). ^1H NMR (699,73 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 13,20$ (br s, 1H, COOH), 8,45 (d, 1H, NH), 4,93 (d, 1H, H-6), 4,45 (q, 1H, H-5), 4,03 (br s, 1H, CH-karboran), 3,62 (s, 1H, H-2 nałożony z sygnałem wody z DMSO), 2,28-2,26 (m, 2H, CH_2 -łącznik), 2,21-2,18 (m, 2H, CH_2 -łącznik), 1,51, (s, 3H, CH_3), 1,20 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (175,95 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 170,32$ (C7), 170,05 (COOH), 72,13 (C5), 56,91 (C2), 56,29 (CH-karboran), 51,88 (C6), 34,87 (CH-łącznik), 31,72 (CH-łącznik), 27,26 (CH_3), 26,75 (CH_3); $^{11}\text{B}\{\text{H BB}\}$ NMR (224,50 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -4,49$ (s, 2B), $-11,11$ (s, 4B), $-13,59$ (s, 2B), $-14,93$ (s, 2B) ppm. FT-IR (cm^{-1}) 2594 (BH), 1732 (C=O β -laktam), 1660 (C=O amid), 728 (BB). ESI-MS m/z : 415 $[\text{M}]^+$, 447 $[\text{M}+\text{MeOH}]^+$, 469 $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$, obliczone dla: $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{B}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} = 415,26$.

Przykład VI

Wytwarzanie koniugatu o wzorze **1c** z **3c**.



6-APA (21,6 mg, 0,1 mmol) i trietyloaminę (56 μ L) zadano dichlorometanem (0,40 mL) do całkowitego rozpuszczenia 6-APA. Następnie roztwór schłodzono w łaźni lód-woda do temperatury 0°C, i dodano ester **3c** (1,2 eq.). Roztwór ogrzano do temperatury pokojowej i dalej reakcją prowadzono przez całą noc. Po czasie reakcję zakończono przez odparowanie rozpuszczalników. Surowy koniugat **1c** oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (230–400 mesh) stosując jako eluent metanol (0–10%) w dichlorometanie. Oczyszczony związek **1c** rozpuszczono w dichlorometanie (5 mL) i przemyto jeden raz 3% kwasem solnym (5 mL). Oddzielono warstwę wodną od organicznej a organiczną suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Następnie siarczan magnezu usunięto przemywając go dodatkowo dichlorometanem. Odparowano dichlorometan. Oleistą pozostałość ponownie rozpuszczono w dichlorometanie (0,25 mL) i wkroplono do intensywnie mieszanego eteru naftowego (25 mL). Czynność powtórzono dwukrotnie. Wytrącony osad związku **1c** odwirowano. Po dwukrotnym wytrąceniu osadu zadano go następnie n-heksanem (25 mL). Czynność powtórzono dwa razy. Osad odwirowano i suszono na linii próżniowej pompy olejowej.

Koniugat **1c**: białe ciało stałe, wydajność 55%, $R_f = 0,23$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10). ^1H NMR (699,73 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 12,88$ (br s, 1H, COOH), 8,33 (d, 1H, NH), 4,87 (d, 1H, H-6), 4,35 (q, 1H, H-5), 3,66 ($2 \times$ s, 2H, H-2, CH-karboran nałożone z sygnałem wody z DMSO), 2,06-2,03 (m, 2H, CH_2 -łącznik), 1,87-1,85 (m, 2H, CH_2 -łącznik), 1,49 (s, 3H, CH_3), 1,17 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (175,95 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 170,34$ (C7), 170,05 (COOH), 72,17 (C5), 59,91 (C2), 56,92 (CH-karboran), 51,85 (C6), 34,42 (CH-łącznik), 33,74 (CH-łącznik), 27,52 (CH_3), 26,74 (CH_3); $^{11}\text{B}\{\text{H BB}\}$ NMR (224,50 MHz, DMSO-d_6): $\delta = -12,62$ (s, 5B), $-15,04$ (s, 5B) ppm. FT-IR (cm^{-1}) 2604 (BH), 1737 (C=O β -laktam), 1658 (C=O amid), 730 (BB). ESI-MS m/z : 415 $[\text{M}]^+$, 447 $[\text{M}+\text{MeOH}]^+$, 470 $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{Na}]^+$, obliczone dla: $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{B}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} = 415,26$.

Przykład VII

Przygotowane do badań związki **1a**, **1b**, **1c** rozpuszczono w DMSO i wodzie do uzyskania ich końcowego stężenia 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Badania przeprowadzono na płytkach 384-dołkowych, tak dla szczepów bakterii jak i grzybów. Test powtórzono dwukrotnie utrzymując końcowe stężenie DMSO nie większym niż 1%.

Zahamowanie wzrostu *C. albicans* określono stosując pomiar absorbancji przy długości fali 530 nm, podczas gdy zahamowanie wzrostu *C. neoformans* zostało określone odczytem absorbancji między 600 a 750 nm, po dodaniu resazuryny (0,001% stężenie końcowe) i dodatkowej inkubacji w temperaturze 35°C w czasie dwóch godzin. Procentowe zahamowanie wzrostu zostało obliczone dla każdego dołka, stosując kontrolę ujemną (media) oraz kontrolę dodatnią (grzyby bez czynnika hamującego ich wzrost). Znaczenie wartości hamowania wzrostu grzybów zostało określone za pomocą czynnika Z-score. Stwierdzono, że związki aktywne to takie, które charakteryzują się 80% lub wyższym zahamowaniem wzrostu grzybów. Związki częściowo aktywne hamują wzrost grzybów w 50,9–79,9%. Związki hamujące wzrost grzybów poniżej 50% są związkami nieaktywnymi.

Antybiotyki bakteriobójcze takie jak kolistyna i wankomycyna zostały włączone jako związki kontrolne hamujące wzrost wymienionych powyżej bakterii, a w przypadkach grzybów zastosowano flukonazol. Wymienione związki podane zostały w czterech stężeniach – w dwóch powyżej i w dwóch poniżej ich wartości MIC.

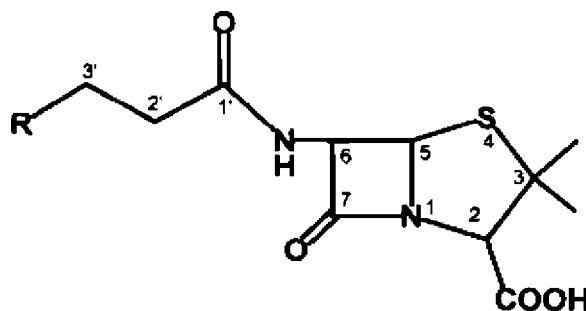
Przeprowadzone testy wykazały, że koniugat **1b** charakteryzuje się znaczną aktywnością wobec bakterii Gram-dodatnich – *S. aureus* opornych na metycylinę (półsyntetyczny antybiotyk β -laktamowy). Związek **1b** hamuje wzrost *S. aureus* w 99,84%, w stężeniu 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Związki **1a** i **1c** nie są aktywne wobec tej bakterii co może świadczyć o wpływie izomerii klastru boru na aktywność biologiczną całego koniugatu **1b**. Ponadto związki: 6-APA oraz penicylina G (sól potasowa), zastosowane jako kontro-

la, nie wykazały aktywności wobec *S. aureus* w stężeniu 32 µg/mL, jak również pozostałych bakterii. Koniugaty **1a**, **1b**, **1c** oraz związki kontrolne 6-APA oraz penicylina G nie hamowały wzrostu grzybów *C. albicans* oraz *C. neoformans*.

Badania aktywności związków **1a**, **1b**, **1c** przeprowadzono w ramach międzynarodowego programu The Community for Antimicrobial Drug Discovery, founded by the Wellcome Trust (UK) and The University of Queensland (Australia).

Zastrzeżenia patentowe

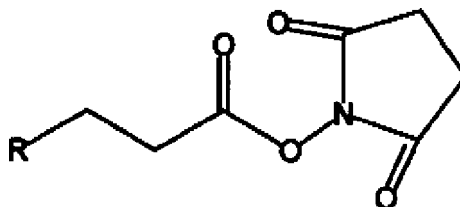
1. Pochodne kwasu 6-aminopenicylanowego (6-APA) składające się z klastra boru przyłączonego wiązaniem amidowym z 6-APA o wzorze 1,



wzór 1

w którym R oznacza klaster boru, podstawnik wybrany z grupy obejmującej 1,2-dikarba-*-closo*-dodekaborano (*orto*-karboranyl), 1,7-dikarba-*-closo*-dodekaborano (*meta*-karboranyl) lub 1,12-dikarba-*-closo*-dodekaborano (*para*-karboranyl).

2. Związki pośrednie o wzorze 3



wzór 3

w którym R oznacza klaster boru, podstawnik wybrany z grupy obejmującej 1,2-dikarba-*-closo*-dodekaborano (*orto*-karboranyl), 1,7-dikarba-*-closo*-dodekaborano (*meta*-karboranyl) lub 1,12-dikarba-*-closo*-dodekaborano (*para*-karboranyl).

3. Zastosowanie medyczne związków o wzorze **1b**, jako związków bakteriobójczych wobec bakterii Gram-dodatnich – *Staphylococcus aureus* (MRSA).