



MD 4893 C1 2024.12.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4893** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C07D 311/78* (2006.01)  
*C07C 279/22* (2006.01)  
*A61K 31/35* (2006.01)  
*A61K 31/155* (2006.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)  
*A61P 31/10* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2022 0050 (22) Data depozit: 2022.11.18	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2024.05.31, BOPI nr. 5/2024
(71) Solicitant: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: KULCIȚKI Veaceslav, MD; UNGUR Nicon, MD; GRINCO Marina, MD; BUOMMINO Elisabetta, IT; LEMBO Francesca, IT (73) Titular: INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD	

(54) Utilizarea *ent-gomeroilguanidinei* și *ent-13-epigomeroilguanidinei* în calitate de compuși cu proprietăți antimicrobiene și efect sinergic în terapia combinată

## (57) Rezumat:

Invenția se referă la chimia compușilor naturali și chimia medicinală, în particular la compuși cu fragment guanidinic prenilat, care posedă un spectru larg de proprietăți antibacteriene și antifungice.

Conform invenției se revendică utilizarea *ent-gomeroilguanidinei* și *ent-13-epigomeroilguanidinei* în calitate de agenți antibacterieni și antimicotici. Compușii au demonstrat activitate biologică înaltă împotriva bacteriilor gram-pozitive, gram-negative, precum și împotriva tulpinilor de fungi *Candida albicans*. Se revendică și utilizarea compușilor menționați în calitate de agenți sinergici în terapia antimicrobiană combinată.

Revendicări: 2

Figuri: 6

MD 4893 C1 2024.12.31

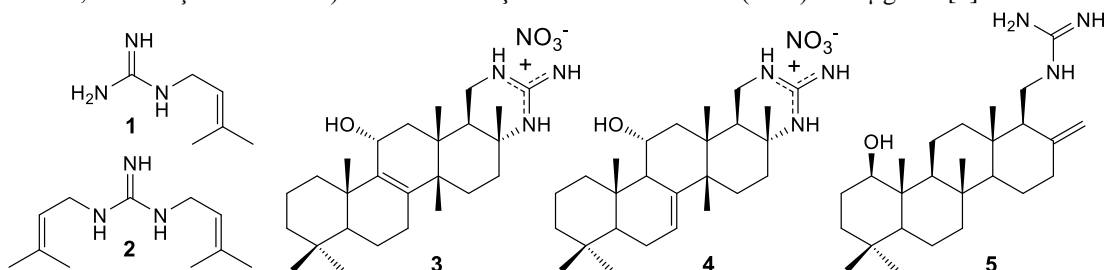
**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Invenția se referă la chimia compușilor naturali și la chimia medicinală, în special la utilizarea  
5 compușilor cu fragment guanidinic prenilat, și anume derivați de guanidină ai acizilor *ent*-gomerici care  
posedă proprietăți antibacteriene și antifungice cu un spectru larg de acțiune.

Agenții patogeni virali, bacterieni și fungici reprezintă o preocupare serioasă în contextul global al  
sănătății umane. Apariția rezistenței crescute la antibiotice a redus disponibilitatea medicamentelor  
eficiente pentru combaterea bolilor infecțioase. Dintre bolile infecțioase, cele cauzate de diferite  
10 combinații de bacterii sau ciuperci sunt foarte dificil de tratat și adesea sunt asociate cu o severitate  
crescută a infecției și un rezultat mai slab al tratamentului pacienților (Kean R. et al. *Candida albicans*  
*mycofilms support Staphylococcus aureus* colonization and enhances miconazole resistance in dual-  
species interactions. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8, 258; Koo H. et al. Targeting microbial biofilms:  
current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(12), 740-755).  
15 Infecțiile poli-microbiene inter-regnum sunt cauzate de diferite microorganisme care colonizează aceeași  
nișă. Co-infecțiile drojdii-bacterii sunt mai dificil de tratat din cauza absenței oricărei ținte terapeutice  
comune pentru eliminarea lor. Remediile antibiotice actuale cu greu acoperă întregul spectru de bacterii și  
ciuperci patogene. De asemenea, se știe că majoritatea antibioticelor cu spectru larg au efecte adverse  
semnificative, inclusiv un impact negativ asupra microbiotei nepatogene a corpului uman. În acest sens,  
20 descoperirea unor noi compuși antibacterieni și antifungici cu spectru larg, care sunt capabili să lupte  
împotriva speciilor invadatoare din diferite familii cu efecte adverse reduse, împreună cu terapia  
combinată de medicamente, reprezintă o soluție promițătoare pentru abordarea bolilor infecțioase  
moderne.

Compușii chimici care conțin grupa funcțională guanidină au fost abordați recent ca antimicrobieni  
25 promițători, fiind cunoscute mai multe exemple de guanidine funcționalizate care sunt active împotriva  
diferitelor bacterii și drojdii [1]. În șirul lor, derivații prenilați sunt mai puțin reprezentați, deși se  
evidențiază prin proprietăți relevante.

Din acest grup, guanidinele prenilate galegina (1) și pteroginidina (2) au prezentat proprietăți  
antimicrobiene împotriva unei varietăți de tulpini de *Staphylococcus aureus* rezistente la meticilină (SA-  
30 1199B, XU212 și EMRSA-16) cu o concentrație minimă inhibitorie (MIC) de 4 μg/mL [2].



Cele mai recente exemple de guanidine prenilate cu proprietăți antibiotice sunt cibastacinele A (3) și B  
(4), izolate din cianobacteriile *Nostoc sp.* colectate în zona insulelor Canare. Compușul (4) a prezentat o  
activitate puternică împotriva izolatelor clinice de *Nocardia spp.*, *M. abscessus*, *Enterococcus spp.* și  
35 *Staphylococcus spp.*, cu valori ale MIC ≤4 μg/mL și MIC de ≤2 μg/mL împotriva *T. pulmonis*. În plus,  
două tulpini testate de *Staphylococcus aureus* coagulazo-negativ au arătat o valoare MIC mai mică pentru  
(4) în comparație cu activitatea vancomicinei [3]. Dezavantajul acestor derivați antimicrobieni cunoscuți  
este legat în primul rând de cantitatea lor extrem de mică în sursele naturale native și absența schemelor  
eficiente de sinteză.

Cea mai apropiată soluție se referă la scitoscalarol (5), o sesterterpenă antimicrobiană care poartă o  
grupare guanidinică. Compușul (5) a fost izolat din cianobacteriile de cultură *Scytonema sp.* (UTEX  
1163) și a demonstrat activitate antimicrobiană împotriva *Bacillus anthracis* (MIC 6 μM), *Staphylococcus*  
*aureus* (MIC 2 μM), *Escherichia coli* (MIC 30 μM), *Candida albicans* (MIC 4 μM) și *Mycobacterium*  
*tuberculosis* (MIC 110 μM) [4]. Compușul (5) este un metabolit secundar natural și cu toate că prezintă  
45 valori scăzute ale MIC împotriva unor tulpini patogene, potențialul său de aplicare este încă iluziv,  
deoarece nu a fost demonstrată o cale sintetică pentru a asigura producția la scară largă. În același timp,  
conținutul său scăzut în organismul producător (cca. 0,5 % din masa uscată) descurajează puternic  
izolarea preventivă.

Acilguanidinele prenilate sunt și mai rare, fiind derivate exclusiv din organisme marine. Activitatea antimicrobiană a acestora nu este cunoscută. Odată cu aceasta, acilarea guanidelor este realizată sintetic cu mult mai ușor decât alchilarea, iar acilguanidinele se mai evidențiază și prin o biodisponibilitate mai înaltă, fapt ce le plasează în rândul liderilor favorizați pentru studii farmacologice (Hsu P.-H. et al. Acylguanidine derivatives of zanamivir and oseltamivir: potential orally available pro-

drugs against influenza viruses. Eur. J. Med. Chem., 2018, 154, p. 314–323).

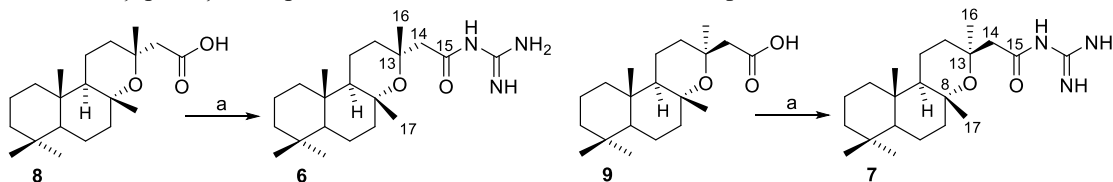
Problema abordată de prezenta invenție este legată de identificarea acilguanidelor prenilate care posedă un spectru larg de activitate antimicrobiană.

Soluția pentru această problemă este oferită de investigarea proprietăților antimicrobiene a guanidinei acilate cu unități terpenice ale acizilor *ent*-gomerici (**8**) și (**9**).

Rezultatul invenției include descoperirea profilului relevant antibacterian și antifungic al acilguanidelor (**6**) și (**7**) care prezintă bioactivitate relevantă atât împotriva bacteriilor patogene gram-negative cât și gram-pozitive, precum și împotriva tulpinilor de fungi *Candida albicans*. Acești agenți patogeni sunt responsabili pentru cea mai mare parte a infecțiilor dobândite în cadrul spitalicesc.

Avantajele utilizării revendicate ale *ent*-gomerilguanidinei (**6**) și *ent*-13-epigomerilguanidinei (**7**) sunt demonstrate printr-o procedură de sinteză foarte simplă într-o singură etapă pornind de la acizii *ent*-gomerici cunoscuți (Audier H., Bory S. and Fetison M. Bull. Soc. Chim. Fr., 1964, 1381), o disponibilitate largă a materiei prime din resursele vegetale regenerabile care reprezintă culturi industriale în spațiul european. Cel mai relevant avantaj este spectrul larg revendicat al profilului antimicrobian împotriva unui set de agenți patogeni relevanți ESKAPE (De Oliveira D. M., Forde B. M., Kidd T. J., Harris P. N., Schembri M. A., Beatson S. A., Paterson D. L. & Walker M. J. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Clinical microbiology reviews, 2020, 33(3), e00181-19) și acțiunea sinergică cu alte antimicrobiene cunoscute.

Sinteza chimică a compușilor (**6**) și (**7**) reprezintă o procedură într-o singură etapă (Mailyan A. K.; Joanna K. Y.; Chen J. L.; Reid B. T., Zakarian A. Stereoselective Synthesis of Cyclic Guanidines by Directed Diamination of Unactivated Alkenes. Org. Lett., 2016, 18, 5532-5535), incluzând activarea grupării carboxilice a acizilor *ent*-gomerici (**8**) și (**9**) cu carbonildiimidazol (CDI), urmată de interacțiunea cu guanidina bază (Schema). Compușii vizați (**6**) și (**7**) sunt obținuți cu randamente preparative bune (45 - 48%) și pot fi purificați cu ușurință prin cromatografie pe coloană utilizând amestecuri metanol-diclorometan ca eluent și silicagel în calitate de adsorbent ieftin și disponibil (N. Ungur. Raport Științific Final pentru anii 2018-2019 la proiectul „Sinteza terpenoidelor guanidinice cu activitate biologică relevantă și potențial terapeutic”. Institutul de Chimie, MD, 2019, p. 10-11).



**Schema.** Reagenți și condiții: a) CDI, DMF, apoi guanidină-HCl, MeONa, DMF, 3 ore.

Structura compușilor (**6**) și (**7**) a fost demonstrată fără ambiguitate prin analiză spectrală. În special, spectrele infraroșu prezintă o absorbantă puternică la 3347-3348  $\text{cm}^{-1}$  (vibrație de întindere N-H), 1695-1696  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1584  $\text{cm}^{-1}$  (vibrație de deformare  $-\text{NH}_2^+$ ), confirmând prezența fragmentului de acilguanidină. Spectrele RMN demonstrează în mod convingător prezența sistemului triciclic terpenic cu un heterociclu oxigenat. De fapt, guanidinele (**6**) și (**7**) sunt epimerice și diferă foarte puțin atât în spectrele  $^1\text{H}$  cât și  $^{13}\text{C}$ . În special, deplasările chimice ale grupărilor metil angulare C(16) și C(17) prezintă singlete la 1,34 și, respectiv, 1,26 ppm pentru (**6**) și la 1,31 și, respectiv, 1,28 pentru (**7**). Deplasările chimice ale grupărilor C(14) metilen diferă, de asemenea, în ambele guanidine, prezentând dublete la 2,46 și, respectiv, 2,51 ppm pentru (**6**) și la 2,69 și respectiv 2,74 ppm pentru (**7**). Spectrele  $^{13}\text{C}$  prezintă valori diferite pentru carbonii cuaternari C(8) și C(13) la 76,1 și, respectiv, 72,8 ppm pentru (**6**) și la 76,0 și, respectiv, 72,3 ppm pentru (**7**). Poziția carbonilului C(15) este la 173,6 ppm atât pentru (**6**) cât și pentru (**7**). Analiza elementară confirmă formula moleculară pentru ambele acilguanidine.

Guanidinele (**6**), (**7**) și acizii lor corespunzători (**8**) și (**9**) au fost testate pentru a stabili activitatea lor antimicrobiană față de *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* BAA1705, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PAO1, *Candida albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10231 (tabel, VAN–vancomicina; OXA–oxaciclina; GEN–gentamicina; IPM–imipenem; TOB–tobramicina; AMB–amfotericina B; VRC- voriconazol).

Tabel

Activitatea antimicrobiană și antifungică a guanidinelor 6, 7 și a acizilor ent-gomerici 8, 9.

Tulpina microbiană	Valorile MIC a compușilor studiați, $\mu\text{g/mL}$										
	6	7	8	9	VAN	OXA	GEN	IPM	TOB	AMB	VRC
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8	8	64 (MIC <sub>70</sub> )	>128	2	2	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	8	4	64 (MIC <sub>70</sub> )	128	2	$\geq 2$	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	8	8	64 (MIC <sub>70</sub> )	128	2	2	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	8	8	64 (MIC <sub>70</sub> )	128	2	2	ND	ND	ND	ND	ND
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	16	16	>128	>128	ND	ND	4	4	ND	ND	ND
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705	32	32	>128	>128	ND	ND	4	$\geq 4$	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	128 (MIC <sub>70</sub> )	128 (MIC <sub>50</sub> )	>128	>128	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	128 (MIC <sub>75</sub> )	128 (MIC <sub>65</sub> )	>128	>128	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	16	16	>128	>128	ND	ND	ND	ND	ND	4	0,5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16	16	>128	>128	ND	ND	ND	ND	ND	4	$\geq 0,5$

5 Din rezultatele raportate în tabel este evidentă activitatea antimicrobiană puternică a compușilor  
 (6) și (7) împotriva tuturor tulpinilor de stafilococi utilizate, cu o valoare a MIC de 8  $\mu\text{g/mL}$ . Această  
 concentrație a rezultat bactericidă, deoarece la subcultivarea a 10  $\mu\text{L}$  de probă tratată anterior cu ambii  
 compuși la valoarea MIC pe plăci TSA, nu s-a observat creșterea bacteriilor după 24 de ore. Activitatea  
 lor a fost cea mai puternică în comparație cu acizii inițiali respectivi (8) și (9). Notabil, compusul (6) a  
 prezentat cea mai bună activitate împotriva *S. aureus* MRSA la o valoare a MIC de 4  $\mu\text{g/mL}$ . Oxacilina  
 10 nu a fost capabilă să contrasteze creșterea *S. aureus* MRSA la fel de eficient ca compușii (6) și (7).

În ceea ce privește tulpinile gram-negative, activitatea antimicrobiană nu a fost atât de puternică ca  
 față de cele gram-pozitive. Oricum, compușii (6) și (7) au fost activi împotriva ambelor tulpini de *K.*  
*pneumoniae*, tulpină rezistentă la carbapenem utilizată ca probă de control, la o valoare a MIC de 16,  
 respectiv 32  $\mu\text{g/mL}$ . Acizii inițiali (8) și (9) nu au fost activi la aceste concentrații. De asemenea,  
 15 compușii (6) și (7) au arătat o activitate distinctă la 128  $\mu\text{g/mL}$  împotriva ambelor tulpini de *P.*  
*aeruginosa*. Compusul (6) a redus cu 70% creșterea *P. aeruginosa* 27853 și cu 75% pe cea a *P.*  
*aeruginosa* PAO1, în timp ce compusul (7) a redus cu 50% creșterea *P. aeruginosa* 27853 și cu 65% pe  
 cea a *P. aeruginosa* PAO1. Imipenemul nu a reușit să contrasteze creșterea tulpinii *K. pneumoniae*  
 BAA1705 rezistentă la carbapenem la fel de eficient ca și compușii (6) și (7).

În mod deosebit, compușii (6) și (7) au prezentat o activitate excelentă împotriva drojdiei *C.*  
*albicans* la o valoare a MIC de 16  $\mu\text{g/mL}$ . Aceeași activitate a fost obținută pe tulpina ATCC 10231 de *C.*  
*albicans* rezistentă la azoli. Acizii (8) și (9) nu au fost activi la aceste concentrații. Voriconazolul nu a  
 reușit să contrasteze creșterea tulpinii *C. albicans* 10231 rezistentă la azoli la fel de eficient ca și compușii  
 (6) și (7). Valoarea MIC a demonstrat efectul fungicid.

25 Potențialul compușilor revendicați pentru terapia combinată a fost estimat pe baza măsurării  
 sinergiei prin analiza checkerboard. Metoda este utilizată pentru a determina impactul combinației de  
 antibiotice asupra potenței lor în comparație cu activitățile lor individuale. Această comparație este apoi  
 reprezentată ca valoarea indicelui Concentrației Inhibitoare Fraționale (FIC). Valoarea indicelui FIC ia  
 în considerare combinația de antibiotice care produce cea mai mare modificare față de MIC al  
 30 antibioticului individual.

Luând în considerare activitatea manifestată de compușii revendicați asupra tulpinilor rezistente la  
 medicamente (*S. aureus* ATCC 43300, *K. pneumoniae* BAA1705, *C. albicans* ATCC 10231),  
 investigarea ulterioară a activității antimicrobiene a (6) și (7) a implicat interacțiuni sinergice cu  
 oxacilină, imipenem și voriconazol determinate prin tehnica checkerboard. Au fost efectuate diferite teste  
 35 pentru a testa antibioticele separat.

Oxacilina a fost testată în asociere cu (6) și (7) împotriva *S. aureus* ATCC 43300. După 24 de ore de incubare au fost analizate rezultatele pentru a identifica cea mai bună combinație de (6) și (7) cu oxacilina. Absența totală a creșterii a fost observată pentru valorile combinației de 4 μg/mL pentru (6) în combinație cu 0,125 μg/mL oxacilină (MIC pentru oxacilină este de 10 μg/mL pe *S. aureus* ATCC 43300). Valoarea FIC de 0,525 a indicat un efect aditiv pentru (6). În ceea ce privește (7), s-a observat absența totală a creșterii pentru valorile combinației de 2 μg/mL pentru (7) în combinație cu 0,5 μg/mL oxacilină. Valoarea FIC de 0,530 a sugerat la fel o interacțiune aditivă. Astfel, combinația dintre (6) și (7) cu oxacilină a crescut ușor activitatea inhibitoare a compușilor, susținută de prezența unei doze scăzute de oxacilină.

Pentru *C. albicans* ATCC 10231 s-au obținut rezultate mai bune. Inhibarea creșterii a fost observată pentru valorile combinației de 4 μg/mL (6) în combinație cu 0,125 μg/mL voriconazol ATCC 10231 (CMI a voriconazolului este de 30 μg/mL pe *C. albicans*). Valoarea FIC de 0,254 a indicat o interacțiune sinergică pentru (6). Rezultatul pentru (7) a fost mai impresionant, deoarece absența totală a creșterii a fost observată pentru valorile combinației de 2 μg/mL (7) în combinație cu 0,125 μg/mL voriconazol. Valoarea FIC de 0,167 a sugerat o interacțiune sinergică puternică. În consecință, (6) și (7) în combinație cu voriconazol au putut reduce considerabil concentrația de voriconazol necesară pentru a inhiba creșterea tulpinii rezistente la azol de *C. albicans*.

Terapia combinată are ca scop potențierea activității antibioticelor (Laws M., Shaaban A., & Rahman K. M. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(5), p. 490-516). Administrarea concomitentă a unui agent de distrugere a rezistenței la antibiotice (ARB) cu antibiotice convenționale ar trebui să sporească efectele acestora din urmă în combaterea mecanismelor de rezistență microbială, permițând utilizarea unor doze mai mici de medicamente (efect sinergic sau aditiv). ARB-urile mai de succes realizează reduceri mai mari ale CMI ale antibioticelor comparativ cu monoterapia cu antibiotice. Acest lucru reprezintă un aspect important în căutarea de noi compuși antimicrobieni deoarece solicitarea redusă la selecția antibioticelor ar putea încetini apariția rezistenței și reduce efectele secundare ale monoterapiei cu antibiotice. Sunt disponibile puține date care să demonstreze capacitatea compușilor antibacterieni care poartă grupa funcțională guanidină prenilată de a acționa ca ARB în tratamentul infecțiilor microbiene [1]. E binecunoscut că prezența grupării guanidinei conferă o sarcină pozitivă moleculelor (6) și (7). Ipotetic, acest lucru poate favoriza legarea derivaților de guanidină la țintele microbiene prin intermediul legăturilor ionice sau ion-dipol, precum și poate conduce la distrugerea membranelor celulare și a peretelui celular prin interacțiunea electrostatică cu membranele celulelor bacteriene încărcate negativ. Un mecanism similar ar putea funcționa cu componenta peretelui celular al drojdiei *Candida*.

Compușii (6) și (7) sunt compuși stabili la aer și umiditate, solubili în DMSO și alți solvenți organici sau soluții apoase la pH acid.

### Lista figurilor

Figurile prezentate mai jos sunt date pentru a dovedi structura atribuită compușilor (6) și (7).

Figura 1. Spectrul IR al guanidinei (6);

Figura 2. Spectrul <sup>1</sup>H NMR al guanidinei (6);

Figura 3. Spectrul <sup>13</sup>C NMR al guanidinei (6);

Figura 4. Spectrul IR al guanidinei (7);

Figura 5. Spectrul <sup>1</sup>H NMR al guanidinei (7);

Figura 6. Spectrul <sup>13</sup>C NMR al guanidinei (7).

### Exemplu de realizare a invenției

Sinteza guanidinei (6)

La soluția de acid (8) (213 mg, 0,661 mmol) în DMF uscat (2,0 mL) în atmosferă de N<sub>2</sub> s-a adăugat carbonildiimidazol (CDI) (94 mg, 0,992 mmol) și s-a agitat timp de 5 ore la temperatura camerei la monitorizare prin cromatografie în strat subțire (CSS). După consumarea substratului, amestecul rezultat a fost adăugat prin picurare la o soluție de guanidină liberă (0,992 mmol) în 2,2 mL de DMF (vezi etapa 2) și agitat la temperatura camerei timp de 3 ore (monitorizat prin CSS). Amestecul a fost diluat cu 10 mL de apă și extras cu acetat de etil. Faza organică combinată a fost spălată succesiv cu soluție salină (NaCl), soluție apoasă saturată de NH<sub>4</sub>Cl și soluție salină, uscată pe sulfat de sodiu anhidru și evaporată în vid. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană (CC) (silicagel (9,0 g), gradient ascendent de MeOH în diclorometan) pentru a se obține guanidina 6 (107 mg, 45%). Pulbere albă, p.t.: 128-130 °C; α<sub>D</sub><sup>20</sup> -13,35 (c 0,24, CHCl<sub>3</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 735, 1097, 1114, 1245, 1377, 1444, 1584, 1696, 2924, 3347.

<sup>1</sup>H RMN (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 0,74 (s, 3H, H-20), 0,77 (s, 3H, H-19), 0,84 (s, 3H, H-18), 0,86 (m, 1H, H-1<sub>ax</sub>), 0,92 (dd, J = 12,2, 2,1 Hz, 1H, H-5), 1,11 (m, 1H, H-9), 1,14 (m, 1H, H-3<sub>ax</sub>), 1,24 (m, 1H, H-6<sub>ax</sub>), 1,26 (s, 3H, H-17), 1,30 (m, 1H, H-7<sub>ax</sub>), 1,34 (s, 3H, H-16), 1,36 (m, 1H, H-3<sub>eq</sub>), 1,42 (m, 1H, H-2<sub>eq</sub>), 1,49 (m, 1H, H-11<sub>ax</sub>), 1,56 (m, 1H, H-11<sub>eq</sub>), 1,57 (m, 1H, H-2<sub>ax</sub>), 1,58 (m, 1H, H-1<sub>eq</sub>), 1,61 (m, 1H, H-6<sub>eq</sub>), 1,71 (m, 2H, H-12), 1,75 (m, 1H, H-7<sub>eq</sub>), 2,46 (d, J = 13,3 Hz, 1H, H-14a) 2,51 (d, J = 13,3 Hz, 1H, H-14b), 7,16 (s, 1H, -NH), 8,05 (br. s, 3H, =NH and -NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN (100,61 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 15,1 (t, C-11), 15,7 (q, C-20), 18,5 (t, C-2), 19,7 (t, C-6), 21,3 (q, C-19), 24,6 (q, C-17), 27,8 (q, C-16), 33,30 (q, C-4 and C-18), 36,6 (t, C-12), 36,7 (s, C-10), 38,9 (t, C-1), 42,0 (t, C-3), 42,8 (t, C-7), 52,8 (t, C-14), 56,2 (d, C-5), 57,6 (d, C-9), 72,8 (s, C-13), 76,1 (s, C-8), 156,0 (s, C-1'), 173,6 (s, C-15).

10 Sinteza guanidinei (7)

La soluția de acid (9) (100 mg, 0,31 mmol) în DMF uscat (0,94 mL) în atmosferă de N<sub>2</sub> s-a adăugat carbonildiimidazol (CDI) (73 mg, 0,452 mmol) și s-a agitat timp de 48 ore la temperatura camerei (monitorizat prin CSS). După consumarea substratului amestecul rezultat a fost adăugat prin picurare la o soluție de guanidină liberă (0,452 mmol) în 1 mL de DMF (vezi etapa 2) și agitat la temperatura camerei timp de 3 ore (monitorizat prin CSS). Amestecul a fost diluat cu 5 mL de apă și extras cu acetat de etil. Faza organică combinată a fost spălată succesiv cu soluție salină (NaCl), soluție apoasă saturată de NH<sub>4</sub>Cl și soluție salină, uscată pe sulfat de sodiu anhidru și evaporată în vid. Reziduu a fost purificat prin cromatografie pe coloană (CC) (silicagel (6,0 g), gradient ascendent de MeOH în diclormetan) pentru a se obține guanidina 7 (54 mg, 48%). Pulbere albă, p.t.: 212-214 °C; α<sub>D</sub><sup>20</sup> 36,95 (c 0,21, CHCl<sub>3</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 735, 1096, 1122, 1215, 1377, 1457, 1575, 1695, 2925, 3348. <sup>1</sup>H RMN (400,13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 0,77 (s, 3H, H-20), 0,77 (s, 3H, H-19), 0,85 (s, 3H, H-18), 0,86 (m, 1H, H-1<sub>ax</sub>), 0,93 (dd, J = 12,1, 2,1 Hz, 1H, H-5), 1,13 (td, J = 13,0, 3,8 Hz, 1H, H-3<sub>ax</sub>), 1,25 (m, 1H, H-6<sub>ax</sub>), 1,28 (s, 3H, H-17), 1,29 (m, 1H, H-9), 1,31 (s, 3H, H-16), 1,37 (m, 2H, H-3<sub>eq</sub> and H-7<sub>ax</sub>), 1,42 (m, 1H, H-2<sub>eq</sub>), 1,50 (m, 2H, H-11<sub>ax</sub> and H-12<sub>ax</sub>), 1,59 (m, 3H, H-1<sub>eq</sub>, H-2<sub>ax</sub> and H-11<sub>eq</sub>), 1,64 (m, 1H, H-6<sub>eq</sub>), 1,80 (dt, J = 12,0, 2,8 Hz, 1H, H-7<sub>eq</sub>), 2,01 (m, 1H, H-12<sub>eq</sub>), 2,69 (d, J=13,9 Hz, 1H, H-14a), 2,74 (d, J=13,9 Hz, 1H, H-14b), 8,45 (bs, 3H, -NH and -NH<sub>2</sub>), 11,39 (bs, 1H, =NH). <sup>13</sup>C RMN (100,61 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 15,1 (t, C-11), 15,5 (q, C-20), 18,5 (t, C-2), 19,9 (t, C-6), 21,3 (q, C-19), 24,8 (q, C-17), 30,4 (q, C-16), 33,2 (s, C-4), 33,3 (q, C-18), 35,9 (t, C-12), 37,0 (s, C-10), 39,1 (t, C-1), 42,1 (t, C-3), 43,2 (t, C-7), 49,3 (t, C-14), 56,2 (d, C-9), 56,5 (d, C-5), 72,3 (s, C-13), 76,0 (s, C-8), 156,2 (s, C-1'), 173,6 (s, C-15).

30

### Testarea activității antimicrobiene și antifungice

#### Tulpini

*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 (tulpină rezistentă la meticilină, MRSA caracterizată prin prezența operonului *mec*), *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* ATCC 35984 (producător de biofilm), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* BAA1705 (tulpina rezistentă la carbapenem), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC BAA-47-B1), *Candida albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10231 (tulpina rezistentă la azoli) au fost obținute de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Antibioticele au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

40

#### Testarea sensibilității antimicrobiene a bacteriilor

Valorile MIC pentru toți compușii au fost determinate în mediu Mueller-Hinton (MH) prin testul de microdiluție în bulion, urmând procedura deja descrisă (Buommino E., De Marino S., Sciarretta M., Piccolo M., Festa, C., & D'Auria, M. V. Synergism of a Novel 1, 2, 4-oxadiazole-containing Derivative with Oxacillin against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Antibiotics*, 2021, 10(10), 1258). Compușii au fost adăugați în suspensie bacteriană în fiecare godeu, obținând o concentrație finală de celule de 1 × 10<sup>6</sup> CFU/mL și o concentrație finală de compus cuprinsă între 0,5 și 128 μg/mL. Godeurile de control negativ au fost setate să conțină bacterii în bulionul Mueller-Hinton plus cantitatea de solvent (DMSO) utilizată pentru a dilua fiecare compus. Martorii pozitivi au inclus vancomicina (2 μg/mL, 4 μg/mL pentru *Staphylococcus epidermidis* coagulazo-negativ), oxacilină (2 μg/mL), tobramicină (2 μg/mL), gentamicina (4 μg/mL) și imipenem (4 μg/mL). Toate concentrațiile de antibiotice raportate sunt în conformitate cu valorile punctului de referință raportate în EUCAST v.12.0 (tabelele Comitetul European pentru Testarea Pragului Sensibilității Antimicrobiene pentru interpretarea valorilor MIC și a diametrelor zonei, Versiunea 12.0, valabilă din 2022-01-01). MIC a fost definită ca cea mai mică concentrație de medicament care a provocat o inhibare totală a creșterii microbiene după 24 de ore de incubare la 37 °C. Turbiditatea mediului a fost măsurată cu un cititor de plăci de microtitrare (Thermo Scientific Multiskan GO, Waltham, MA USA) la 595 nm. Concentrația bactericidă minimă (MBC) a fost

55

definită ca concentrația care a determinat o reducere  $\geq 3\log_{10}$  a numărului de colonii din inoculul inițial placat pe TSA, incubat timp de 24 de ore la 37°C. Toate testele au fost efectuate de cel puțin trei ori folosind suspensii celulare independente.

5 Activitatea antifungică la *Candida albicans*

Activitatea antifungică a compușilor a fost determinată folosind o metodă standardizată de microdiluire a bulionului (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A2) (P. Wayne, National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing, 2002, 12, 1-53). Sumar, suspensia celulară a fost ajustată la  $3 \times 10^3$  CFU/mL în mediu RPMI 1640 (Sigma) suplimentat cu glucoză 0,2% (g/v). Alicote de o sută de microlitri din aceste suspensii celulare au fost distribuite în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri. Compușii au fost diluați în serie folosind mediu RPMI 1640 și adăugați în godeuri la o concentrație finală cuprinsă între 0,5 și 128  $\mu\text{g/mL}$ , iar placa a fost incubată timp de 48 de ore la 37°C. Amfotericina B (2  $\mu\text{g/mL}$ ) și voriconazolul (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) au fost alese drept martori pozitivi. Toate testele au fost efectuate de cel puțin trei ori folosind suspensii celulare independente.

15 Metoda checkerboard

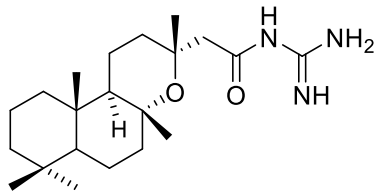
Interacțiunea dintre compușii (6) sau (7) și oxacilină împotriva MRSA a fost evaluată prin metoda checkerboard în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri, care conțineau bulion Mueller-Hinton. Sumar, compușii (6) sau (7) și oxacilina au fost diluați în serie de-a lungul axelor  $y$  și respectiv  $x$ . Concentrația finală a variat de la 0,03 la 10  $\mu\text{g/mL}$  pentru oxacilină și de la 0,5 la 8  $\mu\text{g/mL}$  (0,5, 1, 1, 2, 4, 8) pentru (6) sau (7). Plăcile cu godeuri au fost inoculate cu bacterii la o concentrație aproximativă de  $10^5 \times \text{CFU/mL}$  și incubate la 37°C timp de 24 de ore, după care creșterea bacteriană a fost evaluată vizual și turbiditatea măsurată cu cititorul de microplăci la 595 nm. Indicele FIC pentru fiecare combinație a fost calculat după cum urmează: indicele FIC = FIC al (6) + FIC al oxacilinei, unde FIC al (6) (sau antibiotic) a fost definit ca raportul dintre MIC al (6) (sau antibiotic) în combinație și MIC al (6) (sau antibiotic) singur. Același lucru a fost calculat pentru (7). Valorile indicelui FIC au fost interpretate astfel:  $\leq 0,5$ , sinergic;  $> 0,5$  până la  $\leq 1,0$ , aditiv;  $> 1,0$  până la  $\leq 2,0$ , indiferent; și  $> 2,0$ , efecte antagoniste (Pillai S.K.; Moellering R.C.; Eliopoulos G.M. Antimicrobial combinations. In Antibiotics in laboratory medicine, 5th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2005; pp. 365–440). În mod similar, testul a fost efectuat pentru *C. albicans*, urmând aceeași procedură, dar folosind bulionul, antibioticul adecvat și diluarea drojdiei.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

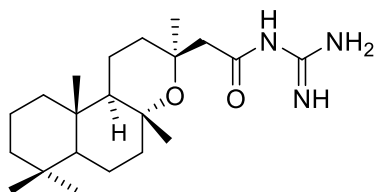
1. Seong-Heun Kim et al. Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A review. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 216:113293.
2. Aline Coqueiro et al. In vitro antibacterial activity of prenylated guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens* and synthetic analogues. Journal of Natural products, 2014, vol. 77(8), p. 1972-1975.
3. Alfredo H Cabanillas et al. Cybastacines A and B: Antibiotic sesterterpenes from a *Nostoc* sp. cyanobacterium. Journal of Natural products, 2018, vol. 81(2), p. 410-413.
4. Shunyan Mo et al. An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp. Journal of Natural products, 2009, vol. 72(11), p. 2043-2045.

**(57) Revendicări:**

1. Utilizarea *ent*-gomerailguanidinei cu formula de structură:

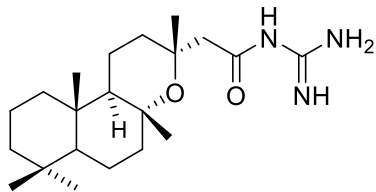


sau *ent*-13-epigomerailguanidinei cu formula de structură:

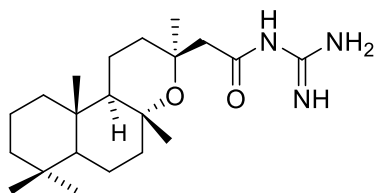


în calitate de agenți antibacterieni și antimicotici.

2. Utilizarea *ent*-gomerailguanidinei cu formula de structură:



sau *ent*-13-epigomerailguanidinei cu formula de structură:



în calitate de agenți sinergici în terapia antimicrobiană combinată.



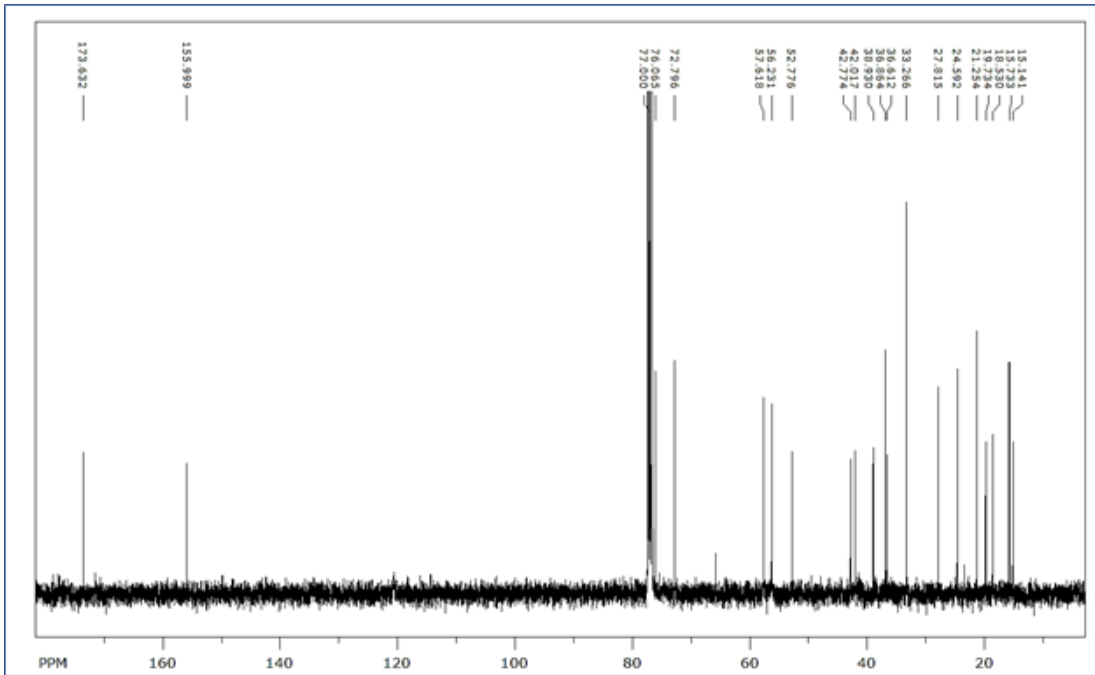


Fig. 3

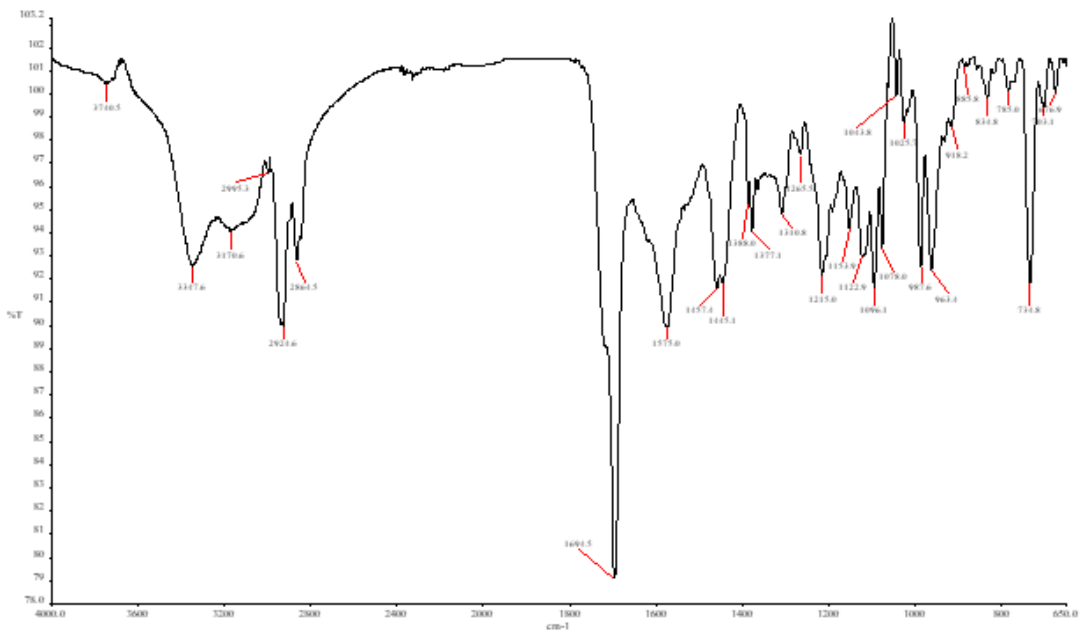


Fig. 4

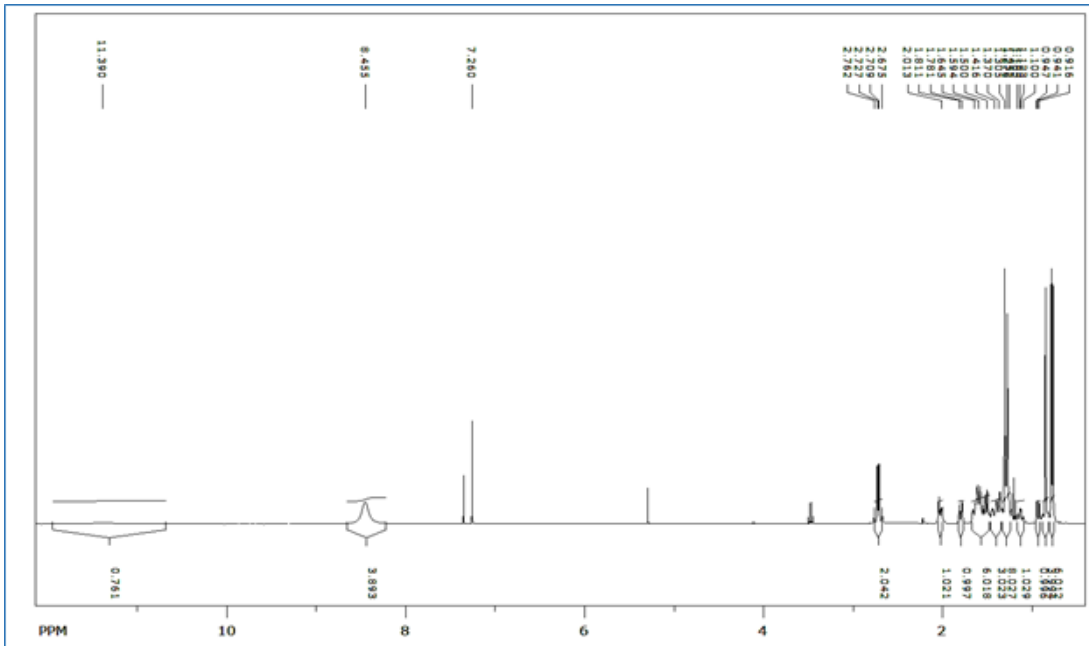


Fig. 5

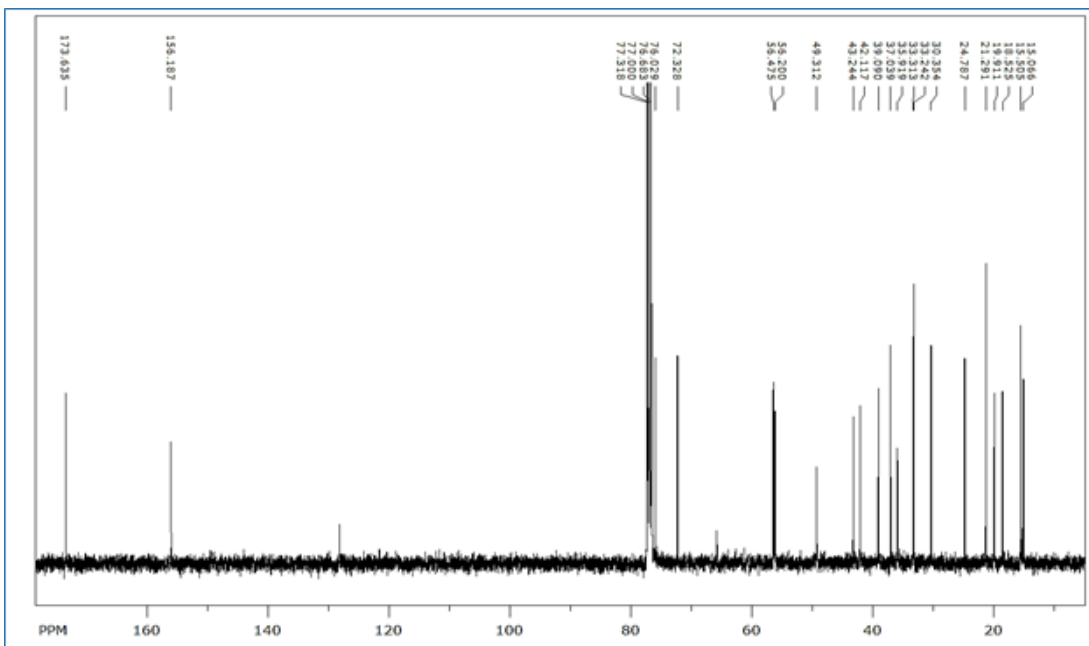


Fig. 6