



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2294144 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C09D 5/16 (2006.01)
C09D 7/12 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.06.30
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.03.05
(86)	Europeisk søknadsnr	09746886.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.05.18
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.03.16
(30)	Prioritet	2008.05.16, US, 53729 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	National University of Singapore, 21 Lower Kent Ridge Road, Singapore 119077, Singapore Agency for Science, Technology And Research, 1 Fusionopolis Way 20-10 Connexis, Singapore 138632, Singapore Maritime and Port Authority of Singapore, 460 Alexandra Road, 19-00 PSA Building, Singapore 119963, Singapore
(72)	Oppfinner	TEO, Lay Ming, Serena, Tropical Marine Sciences Institute18 Kent Ridge Road, Singapore 119227, Singapore RITTSCHOFF, Daniel, 1910 Evans Street, Moorehead CityNorth Carolina 28557, USA JAMESON, Felicity, c/o Therapeutic Goods Administration136 Narrabundah Lane, Symonston ACT 2609, Australia CHAI, Christina, Institute of Chemical and Engineering Sciences1 Pesek RoadJurong Island, Singapore 627833, Singapore CHEN, Chia Lung, c/o N1-B3b-18,Residues and Resource Reclamation Centre(R3C)Nanyang Technology University, Singapore, Singapore LEE, Siew Chen, Serina, Tropical Marine Sciences Institute18 Kent Ridge Road, Singapore 119227, Singapore
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	GROHEMMENDE FORBINDELSER OG ANVENDELSE DERAU
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1- 0 835 605 EP-A1- 1 245 558 WO-A1-99/05912 US-A- 3 378 563 US-A- 6 030 971

GROHEMMENDE FORBINDELSER OG ANVENDELSE DERAU

Oppfinnelsens område

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører små molekyler som fremviser grohemmende og/eller antibakteriell aktivitet og deres anvendelse for kontroll av bakteriefilmer og organismevekst i det marine miljøet.

Bakgrunn

10 Det er et kontinuerlig og voksende behov for å finne alternativer til konvensjonelle marine antibakterielle og grohemmende midler.

15 I oktober 2001 innførte "the International Maritime Organisation" (IMO) "the International Convention of the Control of Harmful Antifouling Systems" (AFS Convention) som forbød anvendelse av organotinn-forbindelser som grohemmende midler i marine belegg (Harino, 2007). Etter dette har tinnbaserte malinger siden 2003 vært trukket tilbake av de fleste av de store malingsselskapene.

20 Etterfølgende generasjoner av marine belegg har inneholdt høye nivåer av kobber og/eller tilleggsbiocider, som ofte er meget toksiske pesticider utviklet for landbruksformål. Disse additivene har også blitt påvist å akkumulere i miljøet med skadelige bivirkninger og er nå regulert i mange deler av Europa (Bellás, 2006). Miljøstudier av mange nye grohemmende tilleggsbiocider indikerer også at disse komplekse molekylerne kan være mindre nedbrytbare enn forventet idet de kan påvises i havne vann (Voulvoulis, 2006).

30 Eksisterende kommersielle marine belegg kan deles i to klasser: grohemmende og gro-oppløsende. Grohemmende belegg anvender bredspektrede biocider som dreper grodannere ved oksidering eller, mer vanlig, eksponering for toksiske metallioner. Gro-oppløsende belegg er hovedsakelig silisiumbaserte polymerer som er enkle å rengjøre, de beste av disse inneholder vanligvis også additiver og katalysatorer som dreper organismer. Lovgivning og avtaler, basert på erkjennelsen av de miljømessige uakseptable konsekvensene av toksiske grohemmende midler slik som tributyltinn i belegg, har fremmet interesser for å utvikle nye mindre miljøskadelige belegg.

En tilnærming rapportert av Teo et al. (en oppfinner av foreliggende søknad) i US 11/265,833, er anvendelsen av farmasøytika som grohemmende midler. Det er vist at farmasøytika kan avbryte metamorfosen av begroingsorganismer. Kommersielt tilgjengelige farmasøytika, med deres kjente syntese, kjemiske egenskaper og primær virkningsmekanisme i virveldyr og i mennesker, ble undersøkt som potensielle kilder for grohemmende midler. Selv om åtte farmasøytika med lovende bioaktivitet ble rapportert, gjenstår problemet at disse farmasøytika kan akkumulere i det marine miljøet. Videre har noen av disse farmasøytika anvendelsesproblemer på grunn av dårlig oppløselighet i sjøvann.

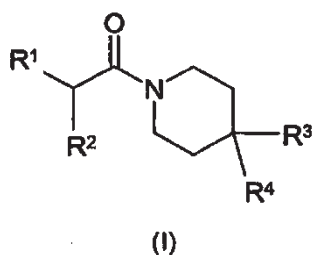
Det er således et behov for marine antibakterielle og grohemmende midler som ikke bare er tilstrekkelig bioaktive, men også kan anvendes i sjøvann og er nedbrytbare for å unngå akkumulering.

US 6,030,971 vedrører en fremgangsmåte for å inhibere bakteriell adhesjon på en nedsenkbar overflate i vandige systemer ved å anvende en effektiv mengde amider, som er under de toksiske terskelnivåer.

Oppsummering av oppfinnelsen

Forbindelser

Foreliggende oppfinnelse vedrører generelt en klasse forbindelser henvist til heri som "grohemmende amidforbindelser", disse forbindelsene har følgende generelle formel (I)



hvor

R^1 og R^2 er uavhengig valgt fra eventuelt substituert aryl, eventuelt substituert C_3 til C_{12} alkyl; og R^3 og R^4 er uavhengig valgt fra hydroksy, eventuelt substituert C_1 til C_6 alkyl, eventuelt substituert fenyl og H.

Foreliggende oppfinnelse vedrører slike grohemmende amidforbindelser, som fremviser biocide eller biostatistiske egenskaper. De grohemmende amidforbindelsene kan derfor også henvises til som "biocide forbindelser" eller "biostatistiske forbindelser".

5

I et første aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en anvendelse av en grohemmende amidforbindelse med formel (I) i en fremgangsmåte for å forhindre eller redusere groing.

10

De foreliggende oppfinnere har funnet at en amidfunksjonalitet hvori nitrogenet i amidet er del av en piperidinring kan tilveiebringe grohemmende aktivitet (inkludert én eller begge av antibakteriell og anti-avsetningsaktivitet) og foretrukket også nivåer av nedbrytning som gjør forbindelsene attraktive alternativer til kjente grohemmende forbindelser. Særlig er den observerte aktiviteten overraskende fordi det farmasøytiske loperamidet studert av de foreliggende oppfinnere ikke inkluderer amid-piperidin-funksjonaliteten henvist til over.

15

20

R^1 og R^2 er egnet uavhengig valgt fra aryl og C_3 til C_{10} alkyl; foretrukket fra aryl, C_3 til C_8 alkyl, mer foretrukket from aryl, og C_3 til C_6 alkyl. I hvert tilfelle kan aryl eller alkyl være substituert og dette gjelder den påfølgende diskusjonen av disse gruppene heri.

25

Aryl, hvis til stede, er foretrukket C_5 til C_{30} aryl, mer foretrukket C_5 til C_{20} aryl, mer foretrukket C_5 til C_{15} aryl, mer foretrukket C_5 til C_{12} aryl, mer foretrukket C_5 til C_{10} aryl, mer foretrukket C_5 til C_8 aryl, mer foretrukket C_5 til C_7 aryl og mest foretrukket C_6 aryl, og er eventuelt substituert.

30

Aryl kan være karboaryl eller heteroaryl. Karboaryl er foretrukket.

Et særlig foretrukket aryl er fenyl.

Hensiktsmessig er aryl usubstituert.

35

Foretrukket minst én av R^1 og R^2 er C_3 til C_{12} alkyl, mer foretrukket C_3 til C_{10} alkyl, mer foretrukket C_3 til C_8 alkyl og mest foretrukket C_3 til C_6 alkyl. De foreliggende oppfinnere har funnet at nærværet av en alkylkjede på alfakarbonet

- kan tilveiebringe grohemmende aktivitet. I noen foretrukne utførelsesformer er alkyl umettet alkyl. Særlig er minst én av R^1 og R^2 foretrukket umettet C_3 til C_{12} alkyl, foretrukket umettet C_3 til C_{10} alkyl, foretrukket umettet C_3 til C_8 alkyl og mest foretrukket umettet C_3 til C_6 alkyl. Således er foretrukket minst én av R^1 og R^2 C_3 til C_{12} alkenyl, mer foretrukket C_3 til C_{10} alkenyl, mer foretrukket C_3 til C_8 alkenyl og mest foretrukket C_3 til C_8 alkenyl. De foreliggende oppfinnere har faktisk funnet at tilsetning av en umettethet kan tilveiebringe aktivitet sammenlignbar med det mettede alkyl.
- I slike utførelsesformer er det foretrukket én dobbeltbinding i alkenylet, for eksempel én dobbeltbinding i C_3 til C_{10} alkenyl, eller én dobbeltbinding i C_3 til C_6 alkenyl. Det er egnet at dobbeltbindingen er ved enden av alkenylgruppen, dvs. mellom C_n og C_{n-1} karbonene. I andre utførelsesformer er to dobbeltbindinger til stede. C_5 og C_6 alkenyler er foretrukket. Et særlig foretrukket alkenyl er C_6 alkenyl, mest foretrukket 5-heksenyl ($-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}_2$). Et ytterligere foretrukket alkenyl er $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$. Uansett er mettede alkylgrupper foretrukket.
- Foretrukket er minst én av R^1 og R^2 C_3 til C_5 alkyl. De foreliggende oppfinnere har funnet at alkylgrupper på alfakarbonet som har mellom 3 og 5 karbonatomer er særlig nyttige i å tilveiebringe grohemmende aktivitet samtidig som de også har ønsket løselighet i sjøvann og nedbrytbarhet.
- Foretrukket er minst én av R^1 og R^2 C_4 alkyl, mer foretrukket n-butyl. Studiene utført av de foreliggende oppfinnere har vist at en C_4 alkylgruppe, og særlig n-butyl, på alfakarbonet kan tilveiebringe overraskende høye nivåer av grohemmende aktivitet og nedbrytes i en egnet hastighet.
- En av R^1 og R^2 er egnet aryl (foretrukket C_6 til C_{15} aryl, mer foretrukket fenyl) og den andre er C_3 til C_{12} alkyl (foretrukket C_3 til C_6 alkyl, mer foretrukket n-butyl). Testene utført av de foreliggende oppfinnere viser at ønskede nivåer av grohemmende aktivitet er mulig med dette substitusjonsmønsteret.
- R^1 og R^2 er ikke H. I denne forbindelse har de foreliggende oppfinnere funnet at di-substitusjon på alfakarbonet er ønskelig.

Foretrukket er R^1 og R^2 det samme. Mest foretrukket er R^1 og R^2 begge n-butyl. De grohemmmende studiene utført av de foreliggende oppfinnere viser at di n-butyl substitusjon på alfakarbonet tilveiebringer utmerket grohemmmende aktivitet. Særlig har et bredt område av antibakteriell aktivitet blitt observert så vel som anti-avsetningsaktivitet. Videre oppnås høye terapeutisk ratio (TR) verdier, som indikerer at slike forbindelser tilveiebringer en nyttig grohemmmende effekt samtidig som de har et forholdsvis lavt nivå av toksisitet.

Foretrukket er én eller begge av R^1 og R^2 usubstituert. Mest foretrukket er begge usubstituert. Selv om substitusjon av R^1 og R^2 er mulig, tror således de foreliggende oppfinnere at den beste totale ytelsen når det gjelder grohemmmende effekt og nedbrytbarhet oppnås uten substitusjon. Særlig har fraværet av halogensubstituenten blitt funnet å være særlig ønskelig, spesielt med henvisning til nedbrytbarheten av forbindelsene. På samme måte er fraværet av hydroksysubstituenten også foretrukket.

Foretrukket er én eller begge av R^1 og R^2 mettet. Mest foretrukket er begge mettet.

I andre foretrukne utførelsesformer er R^1 og R^2 begge fenyl. Forbindelser med dette substitusjonsmønsteret er funnet å fremvise antibakteriell aktivitet på tvers av et bredt område av bakterier, så vel som anti-avsetningsaktivitet. Forholdsvis lave nivåer av toksisitet er også observert for dette foretrukne arrangementet.

I visse foretrukne utførelsesformer, er én av R^3 og R^4 hydroksyl og den andre er H. I enda mer foretrukne utførelsesformer er begge R^3 og R^4 H.

I andre foretrukne utførelsesformer er én av R^3 og R^4 substituert $C_1 - C_6$ alkyl. Særlig foretrukket er hydroksy- $C_1 - C_6$ alkyl, foretrukket $-CH_2CH_2OH$. Den andre av R^3 og R^4 er egnet H.

Foretrukket er én eller begge av R^3 og R^4 usubstituert. Mest foretrukket er begge usubstituert. Selv om substitusjon av R^1 og R^2 er mulig tror således de foreliggende oppfinnere at den beste totale ytelsen når det gjelder grohemmmende effekt og nedbrytbarhet oppnås uten substitusjon. Særlig er

fraværet av halogensubstituenten blitt funnet å være spesielt ønskelig, særlig med henvisning til nedbrytbarheten av forbindelsene.

En særlig foretrukket kombinasjon av substituenten er som følger:

- 5 (i) minst én av R^1 og R^2 er n-butyl
 (ii) begge R^3 og R^4 er H

I slike foretrukne kombinasjoner hvor bare én av R^1 og R^2 er n-butyl, er det foretrukket at den andre er aryl, foretrukket C_5 til C_{15} aryl, mer foretrukket fenyl.

10

I de mest foretrukne forbindelser er ingen av substituentene fenyl og foretrukket er ingen av substituentene aryl.

15

Passende er forbindelsen valgt fra forbindelser 12.2, 12.1, 12.7, 12.4, 12.5, 12.6, 12.8, 12.9, 12.10, 12.11, 12.12, 4.1, 9.3, 4.5 og 4.3. Foretrukket er forbindelsen valgt fra forbindelser 12.2, 12.1, 12.7, 12.4, 12.5, 12.8, 12.9, 12.10, 12.11, 12.12, 4.1, 9.3, 4.5, 4.3, og 10.7. Mer foretrukket er forbindelsen valgt fra forbindelser 12.2, 12.1, 12.7, 12.4, 12.8, 12.9, 12.10, 12.11, 12.12, 4.1, 9.3, 4.5 og 4.3. Særlig foretrukket er forbindelser 12.2, 12.1, 12.7, 12.4, 12.8, 12.9 og 4.1. Spesielt foretrukket er forbindelser 12.1, 12.2, 12.4, 12.7 og 12.8, mer foretrukket forbindelser 12.1 og 12.2 og mest foretrukket forbindelse 12.2. Også særlig foretrukket er forbindelse 4.1.

20

25

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse anvendelse av en forbindelse valgt fra 4.1, 9.3, 9.2, 4.5, 4.3, 12.1, 12.2, 12.4, 12.7, 12.8, 12.9, 12.10, 12.11, 12.12 og 11.2 i en fremgangsmåte for å forhindre eller redusere groing. Særlig foretrukket er forbindelser 12.3 og 11.2, spesielt forbindelse 12.3.

30

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse anvendelse av en ny forbindelse 9.2 i en fremgangsmåte for å forhindre eller redusere groing.

35

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å forhindre eller redusere groing av et substrat, hvori fremgangsmåten omfatter trinnet å påføre en grohemmende amidforbindelse som beskrevet heri på substratet.

Den grohemmmende amidforbindelsen er egnet påført i en mengde og konsentrasjon effektiv for å forhindre eller redusere groing. Foretrukket er den grohemmmende amidforbindelsen tilveiebrakt i en standard konsentrasjon.

5 I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en grohemmmende sammensetning omfattende en grohemmmende amidforbindelse som beskrevet heri.

10 I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en beleggsammensetning omfattende en grohemmmende amidforbindelse. Egnet omfatter beleggsammensetningen konvensjonelle additiver, for eksempel et bindemiddel. Egnet er beleggsammensetningen en malingssammensetning. For eksempel kan sammensetningen inkludere en akrylatharpiks. Beleggsammensetningen er egnet en selvpolerende maling, foretrukket en selvpolerende akrylmaling, eller
15 et silikonbelegg.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et belegg omfattende en grohemmmende amidforbindelse som beskrevet heri.

20 I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et substrat med et belegg påført derpå, hvori belegget omfatter en grohemmmende amidforbindelse som beskrevet heri. For eksempel kan substratet være et fartøy, for eksempel en båt.

25 I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en bakteriostatisk sammensetning omfattende en grohemmmende amidforbindelse som beskrevet heri.

30 I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en baktericid sammensetning omfattende en grohemmmende amidforbindelse som beskrevet heri.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en biocid sammensetning omfattende en grohemmmende amidforbindelse som beskrevet
35 heri.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en biostatisk sammensetning omfattende en grohemmende amidforbindelse som beskrevet heri.

5 I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et grohemmende sammensetning omfattende en grohemmende amidforbindelse som beskrevet heri.

10 Hvilket som helst eller flere av de eventuelle og foretrukne trekk av hvilke som helst av aspektene kan anvendes alene eller i kombinasjon, med et hvilket som helst av de andre aspektene.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Kjemiske uttrykk

15 Uttrykket "mettet," som anvendt heri, gjelder forbindelser og/eller grupper som ikke har noen karbon-karbon dobbeltbindinger eller karbon-karbon trippelbindinger.

20 Uttrykket "umettet," som anvendt heri, gjelder forbindelser og/eller grupper om har minst én karbon-karbon dobbeltbinding eller karbon-karbon trippelbinding. Forbindelser og/eller grupper kan være delvis umettet eller fullstendig umettet.

25 Uttrykket "karbo," "karbyl," "hydrokarbo," og "hydrokarbyl," som anvendt heri, gjelder forbindelser og/eller grupper som har bare karbon- og hydrogenatomer.

30 Uttrykket "hetero," som anvendt heri, gjelder forbindelser og/eller grupper som har minst ett heteroatom, for eksempel, multivalente heteroatomer (som også er egnet som ringheteroatomer) slik som bor, silisium, nitrogen, fosfor, oksygen, svovel og selen (mer vanlig nitrogen, oksygen og svovel) og monovalente heteroatomer, slik som fluor, klor, brom og jod.

Uttrykket "eventuelt substituert," som anvendt heri, gjelder en utgangsgruppe som kan være usubstituert eller som kan være substituert.

35

Hvis ikke annet er angitt gjelder uttrykket "substituert," som anvendt heri, en utgangsgruppe som har én eller flere substituent. Uttrykket "substituent"

anvendes heri i vanlig betydning og viser til en kjemisk del som er kovalent bundet til, eller hvis egnet, fusert til en utgangsgruppe. Et stort mangfold av substituent er velkjente og fremgangsmåter for deres dannelsen og innføring i forskjellige utgangsgrupper er også velkjente.

5

Alkyl: Uttrykket "alkyl," som anvendt heri, gjelder en monovalent del oppnådd ved å fjerne et hydrogenatom fra et karbonatom i en hydrokarbonforbindelse med fra 3 til 20 karbonatomer (hvis ikke annet er angitt), som kan være alifatisk eller alisyklisk, og som kan være mettet eller umettet (f.eks. delvis umettet, fullstendig umettet). Uttrykket "alkyl" inkluderer således underklassene alkenyl, alkynyl, sykloalkyl, sykloalkylenyl, sykloalkynyl etc., diskutert under.

10

Når det gjelder alkylgrupper betegner prefiksene (f.eks. C₃ til C₄, C₃ til C₆, etc.) antall karbonatomer eller område av antall karbonatomer. For eksempel gjelder uttrykket "C₃ til C₄ alkyl," som anvendt heri, en alkylgruppe med fra 1 til 4 karbonatomer. Eksempler på grupper av alkylgrupper inkluderer C₃ til C₄ alkyl ("lavere alkyl") og C₂ til C₆ alkyl. Bemerk at det første prefikset kan variere i henhold til andre begrensninger; for umettede alkylgrupper må for eksempel det første prefikset være minst 2: for sykliske og forgrenede alkylgrupper må det første prefikset være minst 3; etc.

15

20

Eksempler på (usubstituerte) mettede alkylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til metyl (C₁), etyl (C₂), propyl (C₃), butyl (C₄), pentyl (C₅) og heksyl (C₆).

25

Eksempler på (usubstituerte) mettede lineære alkylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til metyl (C₁), etyl (C₂), n-propyl (C₃), n-butyl (C₄), n-pentyl (amyl) (C₅) og n-heksyl (C₆).

30

Eksempler på (usubstituerte) mettede forgrenede alkylgrupper inkluderer isopropyl (C₃), iso-butyl (C₄), sek-butyl (C₄), tert-butyl (C₄), iso-pentyl (C₅) og neopentyl (C₅).

35

Alkenyl: Uttrykket "alkenyl," som anvendt heri, gjelder en alkylgruppe med én eller flere karbon-karbon dobbeltbindinger. Eksempler på grupper av alkenylgrupper inkluderer C₃₋₄alkenyl, C₃₋₇alkenyl, C₂₋₁₂alkenyl.

Eksempler på (usubstituerte) umettede alkenylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, etenyl (vinyl, $-\text{CH}=\text{CH}_2$) 1-propenyl ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$), 2-propenyl (allyl, $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$), isopropenyl (1-metylvinyl, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$), butenyl (C_4), pentenyl (C_5), og heksenyl (C_6).

5

Hydroksy- C_3 - C_8 alkyl: Uttrykket "hydroksy- C_3 - C_6 alkyl," som anvendt heri, gjelder en C_3 - C_6 alkylgruppe hvori minst ett hydrogenatom (f.eks. 1, 2, 3) har blitt erstattet med en hydroksygruppe. Eksempler på slike grupper inkluderer, men er ikke begrenset til $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ og $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$.

10

Hydrogen: $-\text{H}$. Bemerk at hvis substituenten ved en bestemt posisjon er hydrogen, kan det være passende å henvise til forbindelsen eller gruppen som å være "usubstituert" i den posisjonen.

15

Aryl: Uttrykket "aryl," som anvendt heri, gjelder en monovalent del oppnådd ved å fjerne et hydrogenatom fra et aromatisk ringatom av en aromatisk forbindelse, der delen har fra 3 til 20 ringatomer (hvis ikke annet er angitt). Foretrukket har hver ring fra 5 til 7 ringatomer.

20

I denne sammenhengen betegner prefiksene (f.eks. C_{3-20} , C_{5-7} , C_{5-6} , etc.) antallet ringatomer, eller område av antall ringatomer, enten det er karbonatomer eller heteroatomer. For eksempel gjelder uttrykket " C_{5-6} aryl," som anvendt heri, en arylgruppe med 5 eller 6 ringatomer. Eksempler på grupper av arylgrupper inkluderer C_{3-20} aryl, C_{5-20} aryl, C_{5-15} aryl, C_{5-12} aryl, C_{5-10} aryl, C_{5-7} aryl, C_{5-6} aryl, C_5 aryl og C_6 aryl.

25

Ringatomene kan være alle karbonatomer, som i "karboarylgrupper." Eksempler på karboarylgrupper inkluderer C_{3-20} karboaryl, C_{5-20} karboaryl, C_{5-15} karboaryl, C_{5-12} karboaryl, C_{5-10} karboaryl, C_{5-6} karboaryl, C_{5-6} karboaryl, C_5 karboaryl og C_6 karboaryl.

30

Eksempler på karboarylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, de avledet fra benzen (dvs. fenyyl) (C_6), naftalen (C_{10}), azulen (C_{10}), antracen (C_{14}), fenantren (C_{14}), naftacen (C_{18}) og pyren (C_{16}).

35

Eksempler på arylgrupper som omfatter fuserte ringer, hvorav minst én er en aromatisk ring inkluderer, men er ikke begrenset til, grupper avledet fra indan

(f.eks. 2,3-dihydro-1 H-inden) (C₉), inden (C₉), isoinden (C₉), tetralin (1,2,3,4-tetrahydronaftalen (C₁₀), acenaften (C₁₂), fluoren (C₁₃), fenalen (C₁₃), acefenantren (C₁₅) og aceantren (C₁₆).

5 Alternativt kan ringatomene inkludere ett eller flere heteroatomer, som i "heteroarylgrupper." Eksempler på heteroarylgrupper inkluderer C₃₋₂₀heteroaryl, C₅₋₂₀heteroaryl, C₅₋₁₅heteroaryl, C₅₋₁₂heteroaryl, C₅₋₁₀heteroaryl, C₅₋₇heteroaryl, C₅₋₆heteroaryl, C₅heteroaryl og C₆heteroaryl.

10 Halo (eller halogen): -F, -Cl, -Br og -I.

Hydroksy: -OH.

Andre uttrykk

15 Som anvendt heri henviser uttrykket "groing" til festing og vekst av mikroorganismer og små organismer på et substrat utsatt for eller nedsenket i et flytende medium, for eksempel et vandig medium, så vel som en økning i antall mikroorganismer og/eller små organismer i en container av det flytende mediet.

20 Følgelig anvendes "begroere" eller "mikrobegroere" om hverandre og viser til organismene som begror et substrat. Groing kan forekomme i strukturer utsatt for eller nedsenket i ferskvann så vel som i sjøvann. Særlig kan uttrykket anvendes for å vise til et fast medium eller substrat utsatt for eller nedsenket i sjøvann.

25 Følgelig viser uttrykket "grohemmende" til effekten av å forhindre, redusere og/eller eliminere groing. Grohemmende midler eller forbindelser kalles også "grohemmere".

30 En grohemmende forbindelse anvendes vanligvis i en standard konsentrasjon som er konsentrasjonen som er effektiv for formålet. Følgelig er en konsentrasjon mindre enn eller under standard konsentrasjonen en hvor det grohemmende midlet ikke er effektivt når det anvendes alene.

35 Uttrykket "substrat" som anvendt heri viser til et fast medium slik som overflater av strukturer eller fartøy utsatt for eller nedsenket i et flytende medium. Det flytende mediet kan være ferskvann eller sjøvann og kan være en mengde vann

i en kunstig anlagt container slik som en flaske, basseng eller tank, eller væsken kan være utenfor en kunstig anlagt container slik som sjøvann i åpen sjø.

5 En "struktur" som anvendt heri viser til naturlige geologiske eller kunstig anlagte strukturer slik som brygger eller oljerigger og uttrykket "fartøy" viser til kunstig anlagte transportmidler anvendt i vann slik som båter og skip.

10 "Mikroorganismene" vist til heri inkluderer virus, bakterier, sopp, alger og protozoer. "Små organismer" vist til heri kan inkludere organismer som vanligvis begror substrater utsatt for eller nedsenket i ferskvann eller sjøvann slik som krepsdyr, bryzoer og mollukser, særlig de som fester seg til et substrat. Eksempler på slike små organismer inkluderer rankeføttinger og muslinger og deres larver. Små organismer kan også kalles små dyr. Uttrykket "organisme" vist til heri skal forstås i overenstemmelse med dette og inkluderer
15 mikroorganismer og små organismer.

Uttrykket "marin organisme" som anvendt heri viser til organismer som har sjøvann som det naturlige miljø. Uttrykkene "marin mikroorganisme" og "marin liten organisme" skal forstås på samme måte.
20

Videre viser uttrykket "mikrogroing" til groing av mikroorganismer og uttrykket "makrogroing" viser til groing av organismer større enn mikroorganismer slik som små organismer definert over.

25 Uttrykkene "biocid" eller "biocid forbindelse" viser til forbindelser som inhiberer veksten av mikroorganismer og små organismer ved å drepe dem. Uttrykkene "biostatisk" eller "biostatisk forbindelse" viser til forbindelser som inhiberer veksten av mikroorganismer eller små organismer ved å forhindre dem i å reprodusere og ikke nødvendigvis ved å drepe dem.

30 Uttrykket "nedbrytning" som anvendt heri viser til den kjemiske nedbrytningen eller modifiseringen av en forbindelse i vann, foretrukket sjøvann.

35 Uttrykket "vekst" som anvendt heri viser til både økningen i antall mikroorganismer og små organismer, så vel som til utviklingen av en liten organisme fra unge til voksne faser. Følgelig kan biocider og biostatiske midler anvendes som en behandling for en beholder med væske eller til en

substratoverflate for å inhibere veksten av mikroorganismer og små organismer. Således kan biocider og biostatistiske midler være grohemmende midler og kan forhindre, redusere eller eliminere biofilmdannelse.

5 Følgelig viser uttrykkene "bakteriocid" og "bakteriostatisk" til effekter av forbindelser på bakterier.

10 Uttrykket "bioaktivitet" som anvendt heri viser til effekten på et gitt middel eller forbindelse, slik som en biocid eller biostatisk forbindelse, på en levende organisme, særlig på mikroorganismer eller små organismer.

15 En "biofilm" er en kompleks samling av mikroorganismer, vanligvis bakterier eller sopp, markert ved utskillelse av en beskyttende og klebende matriks. Biofilmer er også ofte kjennetegnet ved en overflatefesting, strukturell heterogenitet, genetisk diversitet, komplekse felles interaksjoner og en ekstracellulær matriks av polymersubstanser. Biofilmer kan også være mer resistente mot antibiotika sammenlignet med ikke-aggregerte bakterier på grunn av nærværet av matriksen.

20 Uttrykket "farmasøytisk" når det viser til en anvendelse, middel, forbindelse eller sammensetning, viser til den medisinske behandlingen av en sykdom eller forstyrrelse i mennesker eller dyr.

25 Således er en farmasøytisk forbindelse en forbindelse anvendt for den medisinske behandlingen av en sykdom eller lidelse i mennesker eller dyr.

30 Som anvendt heri viser uttrykket "standard konsentrasjon" når det gjelder et grohemmende middel eller forbindelse, til konsentrasjonen ved hvilken midlet eller forbindelsen er effektive mot mikroorganismer eller små organismer som den er rettet mot når det midlet eller den forbindelsen er anvendt alene. Følgelig betyr uttrykket "effektiv" å ha en ønsket effekt og uttrykket "under standard konsentrasjon" viser til nivået ved hvilket midlet eller forbindelsen ikke er effektive når anvendt alene.

35 Oppfinnerne har utført struktur-funksjon studier av de farmasøytiske forbindelser beskrevet i US 11/265,833. Oppfinnerne har funnet metodologi til å bryte ned disse molekylene og, basert på deres forståelse av

strukturaktivetsforholdet oppnådd fra disse studiene, er det syntetisert et antall forbindelser hvis grohemmende potensiale med hensyn til utgangsforbindelsen er vesentlig eller helt bevart, eller også øket, samtidig som strukturen til forbindelsene er forenklet for å fremme rask bakteriell nedbrytning i vann.

5

For å få en større forståelse for struktur-aktivetsforholdet til disse farmasøytika ble særlig én av dem, loperamid-hydroklorid, valgt av de foreliggende oppfinnere for mer detaljerte studier.

10

Loperamid-hydroklorid er svakt oppløselig i vann, og oppløselig i metanol, isopropylalkohol og kloroform. Det er et gulhvitt pulver med en Mv på 513,51. Dets farmakodynamikk i virveldyr er som følger: loperamid binder til opiatreseptorer i tarmveggen, inhiberer frisettingen av acetylkolin og prostaglandiner. Det er indisert for den symptomatiske kontrollen av akutt og

15

Syntesene av strukturelle derivater ble utført for å muliggjøre belysning av farmakofor ansvarlig for loperamids observerte grohemmende effekt. Ytterligere syntetiske studier fører deretter til forenklingen av kjernestrukturen og justering av fysiske og kjemiske egenskaper.

20

Over tretti syntetiske forbindelser avledet fra loperamid ble syntetisert av de foreliggende oppfinnere og testet ved å anvende tre bio-analyser til testing av antibakteriell og/eller grohemmende aktivitet.

25

Antibakteriell og/eller grohemmende aktivitet ble observert for flere av de syntetiske forbindelsene, på tross av at forbindelsene er betydelig mindre og mindre komplekse enn loperamid.

30

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor et antall forbindelser avledet fra oppbrytningen av loperamid, disse forbindelsene beholder noe eller alt av bioaktiviteten til loperamid. Noen forbindelser viser faktisk overraskende høyere nivåer av aktivitet enn loperamid.

35

I tillegg har de foreliggende oppfinnere funnet at små strukturelle endringer kan endre bionedbrytbarheten til forbindelsene, passende til å øke sannsynligheten for at de vil bionedbrytes raskere i miljøet.

Således, ulikt eksisterende molekyler, inkludert farmasøytika, foreslått for anvendelse som et grohemmende eller antibakterielt middel, er ikke molekylerne identifisert av de foreliggende oppfinnere bare bioaktive, men strukturelt enkle og bionedbrytbare. Følgelig vil disse molekylerne være anvendelige for en rekke grohemmende applikasjoner for å forhindre marin vekst. For eksempel kan molekylerne anvendes som additiver i marine grohemmende belegg, biocider i behandling av sjøvann og forhindring av groing i prosesser som anvender sjøvann, slik som kjøletårn og i avsalting.

Dessuten fremviser flere bioaktive forbindelser også forbedret vannoppløselighet sammenlignet med loperamid.

I foretrukne utførelsesformer er disse molekyler innlemmet i belegg på en slik måte at de er beskyttet mot for tidlig nedbrytning, men frisatt ved et forhåndsbestemt tidspunkt, og deretter nedbrytes de av bakterier i miljøet. En fagmann vil være klar over at teknikkens stand innen polymer/belegg-kjemi tilveiebringer flere måter for å levere molekyler på denne måten, avhengig av det som kreves for applikasjonen.

I foretrukne utførelsesformer er disse forbindelsene innlemmet i konvensjonelle grohemmende belegg som grohemmende midler for forhindring av marin vekst. Forbindelsene kan for eksempel blandes inn i eksisterende akrylatmalinger og er derfor praktiske alternativer til eksisterende beleggalternativ. Særlig kan disse forbindelsene tilbys som miljømessige tryggere alternativer for å redusere anvendelse av eksisterende booster-biocider i eksisterende beleggformuleringer, som en erstatning for eksisterende booster-biocider som er dårlig nedbrytbare, og/eller forsterke eksisterende beleggformuleringer for å forbedre yteevne. I denne forbindelse er et antall av forbindelsene oljer og foretrukket kompatibel for innlemmelse i belegg, for eksempel silisiumbasert begroings-frisettingsbelegg. I utførelsesformer kan denne kompatibiliteten gi belegget økt effektivitet slik at det belagte substrat drar nytte av ytterligere beskyttelse.

Videre kan disse forbindelsene anvendes på en slik måte for å redusere eller erstatte kobber/metall til stede i konvensjonelle grohemmende belegg, og derved redusere den miljømessige innvirkningen av grohemmende belegg.

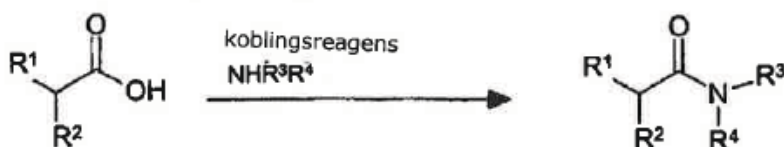
Forbindelsene kan egnet anvendes i fjerning av marine organismer i prosesser for behandling av sjøvann slik som i ballastvannbehandling og for kontroll av marin vekst i avkjølingsvann og avsaltingsprosesser. Forbindelsene er særlig egnet til prosesser hvor rask nedbrytning/fjerning av det aktive midlet er nødvendig for å forhindre miljøforurensning og for tilsvarende formål.

Alle forbindelsene som fremviser antibakteriell og/eller grohemmende aktivitet er amider.

Syntese av forbindelser

Flere fremgangsmåter for den kjemiske syntesen av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse er beskrevet heri. Disse og/eller andre velkjente fremgangsmåter kan modifiseres og/eller tilpasses på kjente måter for å forenkle syntesen av ytterligere forbindelser innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Amidene kan fremstilles med utmerket utbytte fra den tilsvarende karboksylsyren ved anvendelse av en amidkoblingsreagens som vist under:



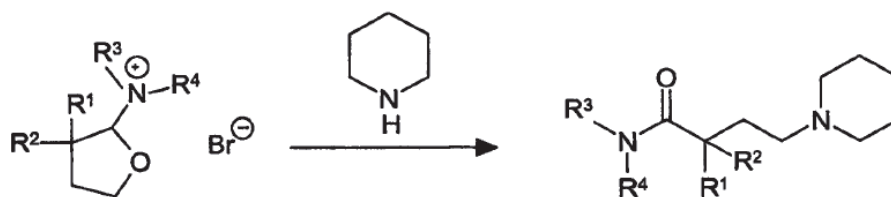
hvor $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4$ = alkyl, aryl, heteroaryl.

Alternativt kan amider fremstilles fra det tilsvarende syrekloridet i nærvær av base:



hvor $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4$ = alkyl, aryl, heteroaryl.

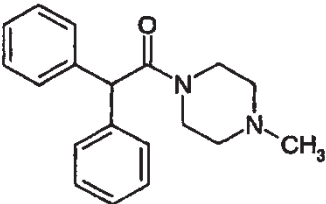
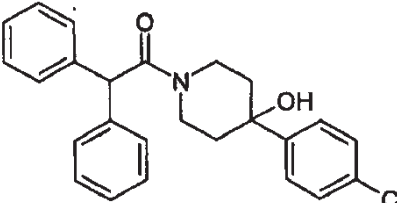
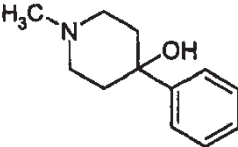
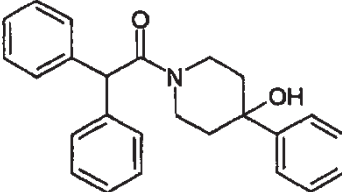
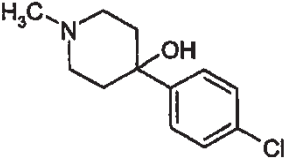
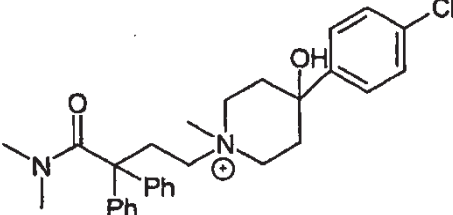
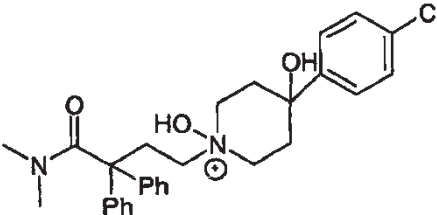
I tillegg ble utvalgte amider syntetisert ved ringåpningen av et dihydrofuraniniumsalt:



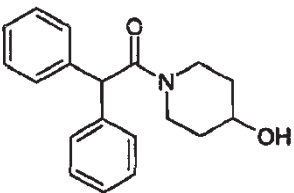
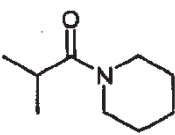
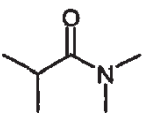
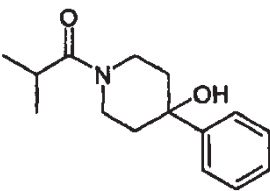
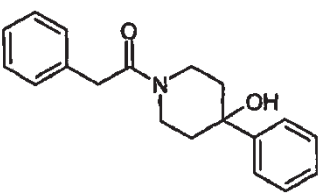
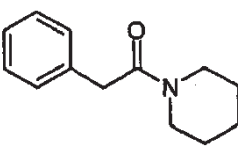
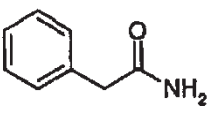
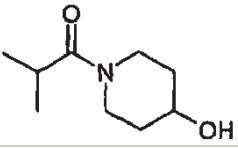
hvor R^1 , R^2 , R^3 , R^4 = alkyl, aryl, heteroaryl.

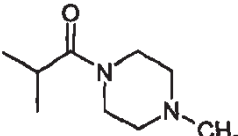
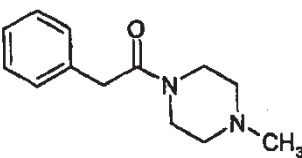
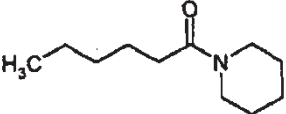
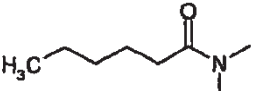
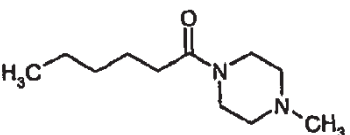
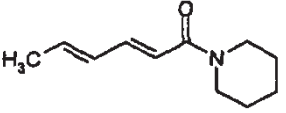
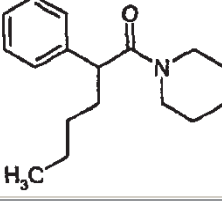
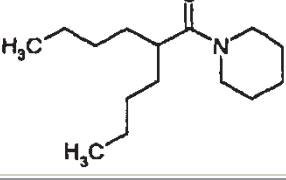
5 Strukturene til de testede forbindelsene er gitt under.

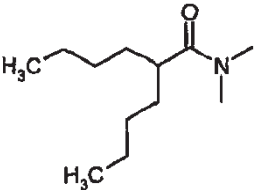
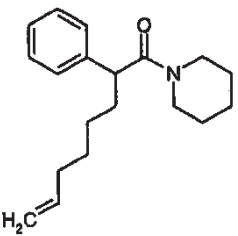
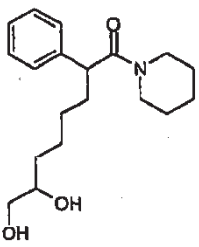
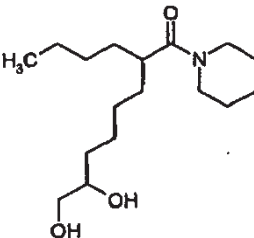
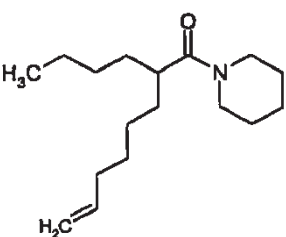
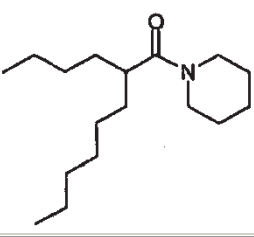
Forbindelse 3.1	
Forbindelse 3.2	
Forbindelse 3.3	
Forbindelse 3.4	
Forbindelse 4.1	

Forbindelse 4.2	
Forbindelse 4.3	
Forbindelse 4.4	
Forbindelse 4.5	
Forbindelse 4.6	
Forbindelse 4.7	
Forbindelse 5.1	

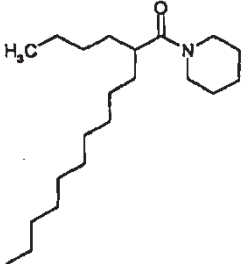
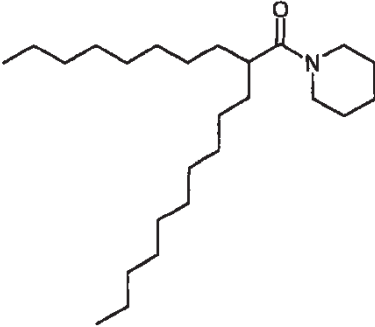
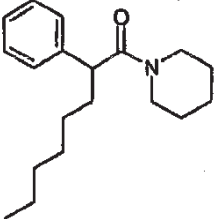
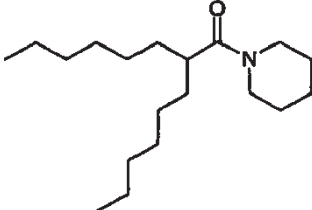
Forbindelse 5.2	
Forbindelse 5.2a	
Forbindelse 5.2b	
Forbindelse 5.3	
Forbindelse 8.1	
Forbindelse 9.1	
Forbindelse 9.2	

Forbindelse 9.3	 <chem>O=C(C1=CC=CC=C1)N1CC(O)CC1C2=CC=CC=C2</chem>
Forbindelse 10.1	 <chem>CC(C)C(=O)N1CCCCC1=O</chem>
Forbindelse 10.2	 <chem>CC(C)C(=O)N(C)C</chem>
Forbindelse 10.3	 <chem>CC(C)C(=O)N1CC(O)(C2=CC=CC=C2)CC1</chem>
Forbindelse 10.4	 <chem>O=C(C1=CC=CC=C1)N1CC(O)(C2=CC=CC=C2)CC1</chem>
Forbindelse 10.5	 <chem>O=C(C1=CC=CC=C1)N1CCCCC1=O</chem>
Forbindelse 10.6	 <chem>O=C(C1=CC=CC=C1)C</chem>
Forbindelse 10.7	 <chem>CC(C)C(=O)N1CC(O)CC1</chem>

Forbindelse 10.8	 <chem>CC(C)C(=O)N1CCN(C)CC1</chem>
Forbindelse 10.9	 <chem>CC1CCN(C)CC1C(=O)Cc2ccccc2</chem>
Forbindelse 11.1	 <chem>CCCCC(C)C(=O)N1CCCCC1</chem>
Forbindelse 11.2	 <chem>CCCCC(C)C(=O)N1CCCC1</chem>
Forbindelse 11.3	 <chem>CCCCC(C)C(=O)N1CCN(C)CC1</chem>
Forbindelse 11.4	 <chem>CCCCC=C/C=C/C(=O)N1CCCCC1</chem>
Forbindelse 12.1	 <chem>CCCC(C1=CC=C(C=C1)C(=O)N2CCCCC2)C(=O)Cc3ccccc3</chem>
Forbindelse 12.2	 <chem>CCCCC(C)C(=O)N1CCCC(C)C1</chem>

Forbindelse 12.3	
Forbindelse 12.4	
Forbindelse 12.5	
Forbindelse 12.6	
Forbindelse 12.7	
Forbindelse 12.8	

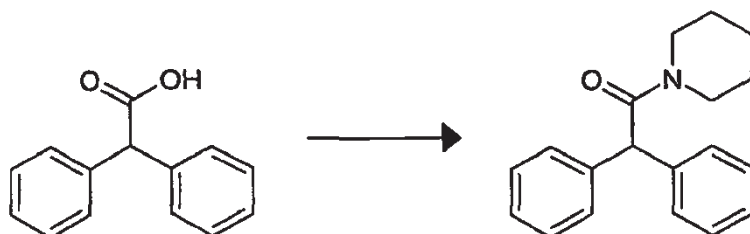
23

Forbindelse 12.9	
Forbindelse 12.10	
Forbindelse 12.11	
Forbindelse 12.12	

Disse forbindelsene ble testet for bioaktivitet mot bakterier og/eller rankeføttinger.

Syntesefremgangsmåter og data for utvalgte amidderivater**Forbindelse 4.1 - 2,2-difenyl-1-(piperidin-1-yl)etanon**

5



10

Til en løsning av karbonyldiimidazol (CDI) (0,35 g, 2,14 mmol) i tørr, nylig destillert THF (10 mL) under en argonatmosfære ble det tilsatt difenyleddiksyre (454 mg, 2,14 mmol). Reaksjonsblandingen fikk stå til omrøring ved romtemperatur i 1 time og ble deretter avkjølt til 0 °C og piperidin (0,2 mL, 1,98 mmol) i THF (5 mL) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen fikk stå i romtemperatur i 16 timer med omrøring. Reaksjonsblandingen ble helt i et vandig mettet natriumhydrogenkarbonat (20 mL) og diklormetan (25 mL) ble tilsatt. Det organiske sjiktet ble separert og den vandige fasen vasket med diklormetan (2 x 25 mL). De kombinerte organiske ekstraktene ble tørket med magnesiumsulfat, filtrert og løsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk.

20

Råproduktet ble rekrystallisert fra aceton og isolert som hvite krystaller med 72 % utbytte.

25

^1H NMR (CDCl_3):

δ 6,120 (m, 2H, CH_2); 1,48 (m, 4H, CH_2); 3,33 (m, 2H, CH_2); 3,55 (m, 2H, CH_2); 5,15 (s, 1H, C(O)CH); 7,16-7,24 (aromatisk CH).

^{13}C NMR (CDCl_3):

δ 24,5 (piperidin CH_2); 25,6 (piperidin CH_2); 26,1 (piperidin CH_2); 43,4 (piperidin CH_2); 47,1 (piperidin CH_2); 54,8 (C(O)CH); 126,9 (aromatisk CH x 2); 128,4 (kvaternært aromatisk C); 128,5 (aromatisk CH x 4); 129,0 (aromatisk CH x 4); 139,7 (kvaternært aromatisk C); 170,0 (kvaternært CO).

30

EIMS:

m/z 279 (4 %, M^+); 226 (3 %); 167 (27 %); 112 (43 %); 68 (100 %).

HREIMS:

m/z M^+ 279,1628 (beregnet for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}$ 279,1623)

Smeltepunkt:

119,6-120 °C

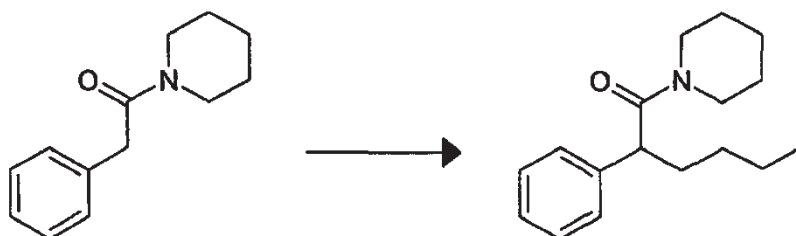
Infrarød $\nu_{\max}$ (KBr):

1637 s, 1493 w, 1435 m, 1357 w, 1278 w, 1250 m, 1219 m, 1135 w, 1017 m,
757 m, 709 s, 622 m cm^{-1}

Anal.:

Beregnet for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}$: C, 81,68, H, 7,58, N, 5,01. Funnet C, 81,73, H, 7,31, N, 5,12.

Forbindelse 12.1 - 2-fenyl-1-(piperidin-1-yl)heksan-1-on



Til en løsning av 2-fenyl-1-(piperidin-1-yl)etanon (1 g, 4,92 mmol) i tørt, nylig destillert THF (10 mL) under en argonatmosfære ved 0 °C, ble det tilsatt 2,5 M n-butyllitium (3,94 mL, 9,84 mmol) fulgt av dråpevis tilsetning av en løsning av brombutan (0,674 g, ,53 mL, 4,92 mmol) i THF (5 mL). Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til romtemperatur over natten før tilsetning av 3 N saltsyre (10 mL) og dietyleter (10 mL) og sjiktene ble skilt ved å anvende en separasjonstrakt. Det vandige sjiktet ble isolert og vasket med dietyleter (2 x 20 mL). De organiske ekstraktene ble kombinert, tørket med magnesiumsulfat, filtrert og løsningsmidlet fjernet *in vacuo* for å gi råproduktet.

Tittelproduktet ble rensset med flash silika kolonnekromatografi ved anvendelse av en løsningsmiddelgradient fra 2 % til 10 % etylacetat i rensebensin og isolert som en fargeløs olje med 54 % utbytte.

^1H NMR (CDCl_3):

δ 0,86 (t, $J=8\text{Hz}$, 3H, terminal CH_3); 0,99 (m, CH_2); 1,16 (m, CH_2); 1,18-1,46 (m, CH_2); 1,51 (m, CH_2); 1,60 (m, CH_2); 1,69 (m, CH_2); 2,09 (m, CH_2); 3,37 (t, $J=8\text{Hz}$, $N\text{-CH}_2$); 3,42 (m, kvaternært CH); 3,68 (m, CH_2); 7,19-7,33 (m, aromatisk CH).

^{13}C NMR (CDCl_3):

δ 14,0 (CH_3); 22,7 (CH_2); 24,6 (CH_2); 25,5 (CH_2); 26,0 (CH_2); 30,1 (CH_2); 34,8 (CH_2); 43,1 (N-CH_2); 46,6 (N-CH_2); 48,8 (CH); 126,6 (aromatisk CH); 127,8 (aromatisk CH); 128,6 (aromatisk CH); 140,9 (katernært aromatisk C); 171,3 (karbonyl C).

5

ES+MS:

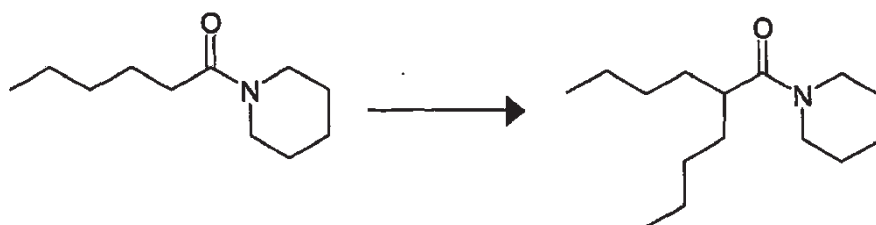
m/z 260 ($\text{M} + \text{H}$, 67 %); 282 ($\text{M} + \text{Na}$, 100 %).

EIMS:

m/z 259 (6 %, M^+); 216 (16 %, $\text{M}^+ - \text{Pr}$); 203 (47 %, $\text{M}^+ - \text{Bu}$); 112 (100 %); 91 (30 %); 69 (32 %).

10

Forbindelse 12.2 - 2-butyl-1-(piperidin-1-yl)heksan-1-on



15

Til en løsning av di-iso-propylamin (0,92 mL, 6,55 mmol) i tørt, nylig destillert THF (20 mL) under en atmosfære av argon, ble det tilsatt 2,5 M n-butyllitium (2,62 mL, 6,55 mmol) ved -78°C . Reaksjonsblandingen ble omrørt i ti minutter ved denne temperaturen. Til denne løsningen ble det tilsatt 1-(piperidin-1-yl)heksan-1-on (1,0 g, 5,46 mmol) og løsningen ble omrørt i én time ved -78°C . Brombutan (0,59 mL, 5,46 mmol) ble tilsatt og løsningen omrørt i én time ved -78°C før den fikk nå romtemperatur over natten. 3N saltsyre (10 mL) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, fulgt av tilsetning av dietyler (20 mL) og sjiktene ble skilt ved å anvende en separasjonstrakt. Det vandige sjiktet ble isolert og vasket med dietyler (2 x 20 mL). De organiske ekstraktene ble kombinert, tørket med magnesiumsulfat, filtrert og løsningsmidlet fjernet under redusert trykk for å gi råproduktet.

20

25

30

Tittelproduktet ble rensert med flash silika kolonnekromatografi (20 % etylacetat i rensbensin, R_f 0,7) til å gi en fargeløs olje med 48 % utbytte, basert på gjenvunnet utgangsmateriale.

^1H NMR (CDCl_3):

δ 0,87 (t, 6H, $J = 7\text{Hz}$, $2 \times \text{CH}_3$); 1,28 (m, CH_2); 1,42 (m, CH_2); 1,56 (m, CH_2); 1,65 (m, CH_2); 2,63 (m, 1H, CH); 3,48 (t, 2H, $J = 6\text{Hz}$, NCH_2); 3,6 (t, 2H, $J = 6\text{Hz}$, NCH_2).

5 ^{13}C NMR (CDCl_3):

δ 14,1 ($2 \times \text{CH}_3$); 22,9 (CH_2); 24,8 (CH_2); 26,0 (CH_2); 26,9 (CH_2); 29,9 (CH_2); 32,9 (CH_2); 40,7 (CH); 42,9 (N- CH_2); 46,8 (N- CH_2); 174,6 (kvaternært CO).

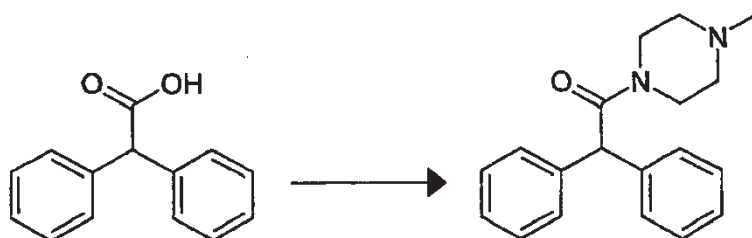
EIMS:

10 m/z 239 (6 %, M^+); 224 (2 %, $\text{M}^+ - \text{Me}$); 210 (7 %); 196 (24 %); 183 (63 %); 154 (13 %); 140 (100 %); 127 (32 %); 112 (24 %).

HREIMS:

m/z M^+ 239,2219 (beregnet for $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}$ 239,2249).

15 **Forbindelse 4.2 - 1-(4-metylpiperazin-1-yl)-2,2-difenyletanon**



20 Til en løsning av CDI (0,77 g, 4,72 mmol) i tørt THF (15 mL) ble det tilsatt difenyleddiksyre (1 g, 4,71 mmol). Reaksjonsblandingen fikk stå til omrøring ved romtemperatur i 1 time og ble deretter avkjølt til 0 °C og N-metylpiperazin (0,5 mL) i THF (10 mL) ble tilsatt. Reaksjonsblandingen fikk stå i romtemperatur i 16 timer med omrøring. Reaksjonsblandingen ble helt i et vandig mettet natriumhydrogenkarbonat (50 mL) og diklormetan (25 mL) ble tilsatt. Det

25 organiske sjiktet ble separert og den vandige fasen vasket med diklormetan (2 x 25 mL). De kombinerte organiske ekstraktene ble tørket med magnesiumsulfat, filtrert og løsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk.

30 Råproduktet ble rekrystallisert fra aceton og isolert som hvite krystaller med 88 % utbytte.

^1H NMR (CDCl_3):

δ 1,79 (m, 2H, CH_2); 2,06 (m, 2H, CH_2); 2,18 (s, 3H, NCH_3); 2,32 (m, 2H, CH_2); 3,41 (m, 2H, CH_2); 3,67 (m, 4H, CH_2); 5,12 (s, 1H, C(O)CH); 7,14-7,34 (m, 10H, aromatisk H).

5 ^{13}C NMR (CDCl_3):

δ 42,1; 45,8; 54,5; 54,7; 54,9; 121,4; 126,5; 127,1; 128,4; 128,5; 128,6; 129,0; 134,9; 139,2; 170,5 (CO).

ESIMS:

m/z 295 (100 %, $[\text{M}+\text{H}]^+$); 296 (22 %); 363 (16 %).

10

EIMS:

m/z 294 (100 %, M^+); 251(15 %); 165 (74 %); 127 (85 %).

HREIMS:

m/z M^+ 294,1731 (beregnet for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ 294,1732).

Smeltepunkt:

15

129,5-130,7°C

Infrarød ν_{max} (KBr):

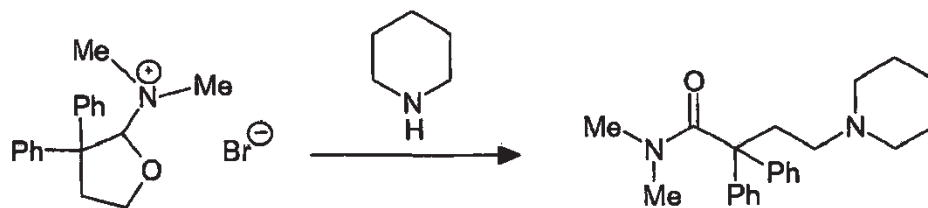
1628 s, 1493 w, 1461 m, 1433 m, 1292 m, 1230 m, 1172 w, 1042 w, 745 wcm^{-1}

Anal.:

Beregnet for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$: C, 77,52, H, 7,53, N, 9,52. Funnet C, 77,19, H, 7,23, N, 9,45.

20

Forbindelse 9.1 - *N,N*-dimetyl-2,2-difenyl-4-(piperidin-1-yl)butanamid



25

En blanding av piperidin (0,12 mL, 1,25 mmol), dihydro-*N,N*-dimetyl-3,3-difenyl-2(3H)-furaninium bromid (0,485 g, 1,4 mmol), natriumkarbonat (0,25 g, 2,35 mmol) og *N,N*-dimetylformamid (12,5 mL) ble omrørt ved 80 °C i åtte timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur og ble omrørt under en argonatmosfære i ytterligere 16 timer. Løsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk før tilsetning av vann (10 mL) og kloroform (10 mL) og sjiktene ble skilt ved anvendelse av en separasjonstrakt. Det vandige sjiktet ble isolert og vasket

30

med kloroform (2 x 20 mL). De organiske ekstraktene ble kombinert, tørket med magnesiumsulfat, filtrert og løsningsmidlet fjernet *in vacuo* for å gi råproduktet.

5 Tittelproduktet ble rensset ved rekrystallisering fra metanol for å gi blekgule krystaller med 50 % utbytte.

^1H NMR (CDCl_3):

10 δ 1,34 (m, CH_2); 1,48 (m, CH_2); 1,68 (s, CH_2); 2,03 (m, CH_2); 2,27 (m, CH_2); 2,33 (m, CH_2); 2,45 (m, CH_2); 2,97 (s, 6H, N-CH_3); 7,24-7,28 (m, aromatisk CH); 7,33-7,41 (aromatisk CH).

^{13}C NMR (CDCl_3):

15 δ 24,4 (CH_2); 26,0 (CH_2); 39,1 (CH_2); 42,0 (CH_2); 54,6 (CH_2); 56,5 (CH_2); 59,7 (kvaternært C); 126,6 (aromatisk CH); 128,1 (aromatisk CH); 128,3 (aromatisk CH); 141,0 (kvaternært aromatisk C); 173,5 (karbonyl C).

ESIMS:

m/z 351 (100 %, M + H).

HR ESIMS:

m/z M + H 351,24243 (beregnet for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}$ 351,24381).

Smeltepunkt:

20 166,7-167,8 °C.

Infrarød ν_{max} (KBr):

3434 w, 3050 m, 2923 s, 2841 m, 1637 s, 1487 m, 1447 m, 1378 s, 1269 m, 1153 s, 1115 s, 1032 m, 859 w, 765 s, 741 m, 702 s, 639 s, 584 w, 471 w cm^{-1}

Anal.:

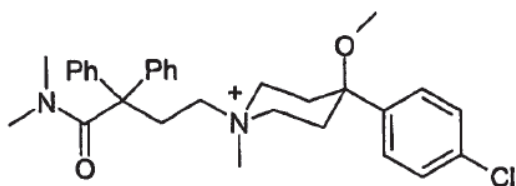
25 Beregnet for $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$: C, 78,82, H, 8,63, N, 7,99. Funnet C, 78,75, H, 8,86, N, 8,07.

Forbindelse 5.2 - N,O – dimetyl-Loperamid

30 Til en blanding av Loperamid-hydroklorid (250 mg, mmol), tetrabutyl-ammoniumjodid (0,1 ekv, 18 mg, 0,049 mmol), 20 % vandig NaOH (10 ml) i DCM (15 ml) ble det tilsatt metyljodid (5 ekv, 2,45 mmol, 152 μl). Blandingen ble omrørt under argon ved romtemperatur i 2 t, vasket med 1 N HCl (20 ml), vann (20 ml) og tørket over MgSO_4 . Den ble deretter rensset med en kort silikagelkolonne (10 % MeOH i DCM). ESI-MS analyse viste en blanding av

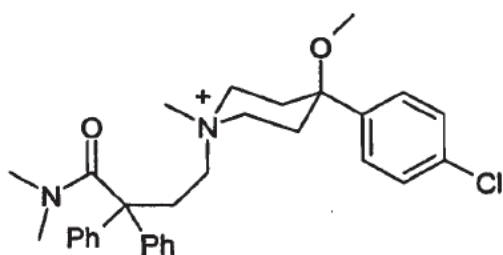
35 mono- og di-metylert produkt. Blandingen ble deretter omrørt i overskudd metyljodid (10 ekv.) under den samme faseoverføringsbetingelsen i 6 t. Den ble deretter vasket med 1N HCl (20 ml), vann (20 ml) og tørket over MgSO_4 .

Rensing ble utført med flashkromatografi (Silikagel, 0-10 % MeOH i DCM) for å gi de to cis-transisomerene som jodidsaltet.



5 Forbindelse 5.2a

Forbindelse 5.2a (135 mg, 44 %): sm.p. 152-154 °C: $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 3455, 3055, 3030, 2943, 2830, 1626, 1492, 1450, 1391, 1261, 1141, 1066, 1011, 890, 827, 754, 730, 703; δ_{H} (MeOH- d_4 , 400 MHz): 2,16-2,23 (2H, m, 2xCH-7 β), 2,27-2,31 (2H, m, 2xCH-7a), 2,35 (3H, br s, amid NCH₃- α), 2,75-2,79 (2H, m, CH₂-3), 2,92 (3H, s, OCH₃), 3,01 (3H, br s, amid NCH₃- β), 3,01-3,05 (2H, m, CH₂-4), 3,05 (3H, s, N5-CH₃), 3,35-3,41 (4H, m, 2xCH₂-6), 7,39-7,53 (14H, m, Aromatisk H); δ_{C} (MeOH- d_4 , 100 MHz): 28,3 (CH₂-7), 36,0 (amid NCH₃- β), 36,9 (CH₂-3), 38,2 (amid NCH₃- α), 42,8 (N5-CH₃), 48,9 (OCH₃), 56,9 (CH₆), 59,5 (C2), 67,0 (CH₂-4), 72,5 (C8), 127,4 (2xC11), 127,5 (2xC10), 127,9 (4xC14), 128,4 (2xC16), 128,7 (4xC15), 133,7 (C12), 138,6 (2xC13), 140,0 (C9), 173,1 (C=O); m/z (ESI): 505,6 (100 %, [M]⁺), 437,5 (14 %), 415,4 (8 %), 301,4 (9 %), 266,3 (33 %), 242,5 (40 %), 155,2 (38 %): HRMS funnet [M]⁺ 505,2617, C₃₁H₃₈ClN₂O₂ krever [M]⁺ 505,2616: Anal. funnet C 56.35, H 5.76, N 4.01, beregnet for C₃₁H₃₈ClN₂O₂-1,5 H₂O krever C 56,41, H 6,26, N 4,24.



Forbindelse 5.2b

25 Forbindelse 5.2b (42 mg, 14 %): sm.p. 62-64 °C; $\nu_{\max}$ (ren, cm^{-1}) 3438, 3029, 2932, 1624, 1492, 1449, 1393, 1256, 1159, 1069, 1012, 917, 826, 703; δ_{H} (MeOH- d_4 , 400 MHz): 1,80-1,88 (2H, m, 2xCH-7a), 2,07-2,11 (2H, m, 2xCH- β), 2,34 (3H, br s, amid NCH₃- α), 2,64-2,68 (2H, m CH₂-3), 2,94 (3H, s, OCH₃), 2,98 (3H, br s amid NCH₃-T), 3,08 (3H, s, N5-CH₃), 3,09-3,14 (2H, m, CH₂-4), 3,39-3,42 (2H, m 2xCH-6a), 3,48-3,54 (2H, m, 2xCH-6 β), 7,31-7,52 (14H, m,

aromatisk H); δ_c (MeOH- d_4 , 100 MHz): 28,5 (CH₂-7), 36,0 (amid NCH₃- β) 37,4 (CH₂-3), 38,2 (amid NCH₃- α), 49,0 (OCH₃), 51,5 (N5-CH₃), 55,0. (CH₂-4), 56,4 (CH₂-6), 59,7 (C2) 72,1 (C8), 127,3 (2xC11), 127,5 (2xC10), 127,9 (4xC14), 128,4 (2xC16), 128,8 (4xC15), 133,7 (C12), 138,8 (2xC13) 140,0 (C9) 172,9 C=O) m/z (ESI): 505,6 (100 %, [M]⁺) 415,4 (3 %) 266,3 (21 %), 169,2 (8 %) 155,2 (14 %); HRMS funnet [M]⁺ 505,2610, C₃₁H₃₀ClN₂O₂ krever [M]⁺ 505, 2616.

CAS- registreringsnumre for valgte forbindelser er som følger: forbindelse 9.1 - 95434-06-3; forbindelse 4.7 - 251106-04-4; forbindelse 5.1 - 217471-03-9; forbindelse 5.3 - 296777-82-7; forbindelse 4.4 - 4972-68-3; og forbindelse 4.6 - 6653-07-2.

De resterende forbindelser ble fremstilt ved fremgangsmåter tilsvarende de gitt ovenfor, med egnet variasjon av utgangsmaterialer.

Biologiske undersøkelser - metodologi

Biologiske undersøkelser fokuserte på den antibakterielle aktiviteten til hver forbindelse så vel som effekten av hver forbindelse på levedyktigheten til *Balanus amphifrite* nauplii (henvist til som 'rankefötting-toksisitet') og avsetning av *Balanus amphitrite* cyprids (henvist til som 'anti-avsetnings-adferd'), sistnevnte er av særlig betydning for formålene til denne studien.

Antibakteriell analyse

Det er mye av bakterier i det marine miljøet. Mange av dem danner biofilmer på faste overflater, som kan være skipsskrog eller andre nedsenkede objekter. Når de engang er dannet kan biofilmer modifisere festeadferden til begroingsmakroorganismer slik som rankeföttinger, pælemark etc. (Maki et al., 1988; O'Connor, 1996; Maki et al., 2000; Huang og Hadfield, 2003). Mikrobiell groing involverer festing av bakterielle celler på en overflate, som danner en biofilm. Etter den første festingen av celler kan flere cellesjikt dannes oppå dette sjiktet og danne en biofilm. Organismer inne i biofilmer er mer resistente mot antibiotika og rengjøringsmidler.

For kjemikalier anvendt i miljøet har aktivitet mot bakterier to implikasjoner. På den ene siden er bakteriell aktivitet ofte ansvarlig for nedbrytning av de grohemmende midlene i belegg, som resulterer i bioforringelse og dårlig

yteevne. Mikrogroingsbakterier er også et alvorlig problem i groing av membraner og varmeveksleroverflater. Ny antibakteriell aktivitet har viktige anvendelser i vannbehandlingssystemer. På den andre siden, fra et miljømessig perspektiv, kan vedvarende og sterk antibakteriell aktivitet i kjemiske midler som er kastet i det marine miljøet eventuelt resultere i innvirkning på den naturlige mikrofloraen så vel som utvikling av mer resistente bakteriestammer.

Effekten av forbindelsene på marine bakterier funnet i mikrogroings-biofilmer ble undersøkt. Plate-inhiberings-analyse (disk inhibition analysis) ble anvendt. Denne analysen er en konvensjonell metode rutinemessig anvendt for å undersøke antibakterielle forbindelser for å bestemme susceptibilitetsgrad til antibakterielle forbindelser. Diameteren til inhiberingssonen er proporsjonal med susceptibilitetsgraden til bakteriestammen. Forbindelsene ble testet mot 13 stammer av marine bakterier isolert fra kystvann ved Singapore.

13 stammer av marine bakterier ble isolert fra groingsområder lokalisert i kystvann rundt Singapore. Disse ble karakterisert i tidligere studier og rapportert i Teo et al. (US patentsøknad 11/265,833) og Choong et al. (under utarbeidelse). Tabell 1 tilveiebringer listen over stammer anvendt i denne analysen. I tillegg ble fire referansebakteriestammer også testet: *Escherichia coli* (Stamme K12, ATCC 15222), *E. coli* (stamme DH5a), *Pseudomonas aeruginosa* (stamme LMG 12228; ATCC 15692) og *P. putida* (stamme KT2440; ATCC 47054). Alle bakteriene ble også testet mot fem antibiotika: ampicillin (AMP), tetrasyklin (TETR), erythromycin (ERY), kloramfenikol (CHL) og streptomycin (STREP).

TABELL 1 – valgte biofilmstammer isolert fra forskjellige steder i marine vann ved Singapore, og deres fylogenetiske tilknytning til 16S rRNA gensekvenser.

Stamme	Isolasjonskilde	Nært beslektede arter	Fylogenetisk tilknytning
S1	PVC-panel, Ponggol Marina	<i>Rhodovulum iodosum</i>	Alfaproteobakterier
S3	Akryl-panel, Ponggol Marina	<i>Erythrobacter aquimaris</i>	Alfaproteobakterier
S4	Panel, Ponggol Marina	<i>Bacillus algalicola</i>	G(+) lav G+C (Firmikuter)

Stamme	Isolasjonskilde	Nært beslektede arter	Fylogenetisk tilknytning
S9	Inni rør av <i>Vermidid</i> , Siglap Buoy	<i>Bacillus algicola</i>	G(+) lav G+C (Firmikuter)
S10	Inni svamp, Siglap Buoy	<i>Halobacillus trueperi</i>	G(+) lav G+C (Firmikuter)
S14	Under filamentalger, Main Fairways Buoy	<i>Vibrio probioticus</i>	Gammaproteobakterier
S16	Under rankeføtting, Main Fairways Buoy	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	Gammaproteobakterier
S17	Under svamp, Main Fairways Buoy	<i>Gordonia terrae</i>	G(+) høy G+C (Aktinobakterier)
S18	Under bryozoan, Main Fairways Buoy	<i>Microbacterium esteraromatiskum</i>	G(+) høy G+C (Aktinobakterier)
S27	På <i>Pomatoleios krausil</i> , St. John's Island	<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	CFB-gruppe (Bakteroideter)
S28	Lim Chu Kang flåte	<i>Arthrobacter protophormial</i>	G(+) høy G+C (Aktinobakterier)
S29	Under sjøpung på tau, Changi fiske- oppdrettsanlegg	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	G(+) lav G+C (Firmikuter)
S30	Under sjøpung på tau, Changi fiske- oppdrettsanlegg	<i>Bacillus borophilicus</i>	G(+) lav G+C (Firmikuter)

Plater omfattende forbindelsene som skal testes ble istandgjort som følger. Den antibakterielle analysen, de rene forbindelsene ble laget opp til en konsentrasjon på 2 mg ml^{-1} i DMSO. 25 μl av beholdningen ble pipettert på hver av 6 mm sterile plater (Macherey-Nagel #484000) for å få 50 μg forbindelse pr. plate. Ekvivalent volum av DMSO ble anvendt inokulert for kontroll.

5

For alle plateinhiberingsanalysene ble bakteriekulturer dyrket i marin buljong (Pronadisa #1217.00). Sterile vattpinner dyppet i kulturene ble anvendt til å

inokulere marine agarplater med en bakterieplen ved å smøre kulturen over overflaten. Etter inokulering av platene ble plater med antibiotika, farmasøytika eller tomme kontroller plassert på hver plate. Hver konsentrasjon av antibiotika eller farmasøytika ble testet med to gjentakelser. Etter at platene var plassert på

5 agaroverflaten ble platene dyrket over natten i mørket ved 35 °C.

Etter dyrkning ble platene undersøkt for inhiberingssoner eller klaring rundt kontroll og behandlede plater. Diameteren av enhver sone med klaring eller inhibering ble målt ved anvendelse av Vernier krumpassere. Det var to

10 gjentakelser pr. behandling, og gjennomsnittet ble tatt. Det var ingen inhiberingssone rundt de tomme kontrollene i alle analysene.

Grohemmende analyser

Rene forbindelser ble suspendert i DMSO og sonikert for å oppnå en bruksløsning på 50 mg ml⁻¹ i DMSO. Denne bruksløsningen lagres ved -20 °C i 4 ml gule

15 flasker med skrukork. For bioanalysene ble et lite volum av bruksløsning tilsatt til 1 µm filtrert sjøvann i en glass-scintillasjonsflaske. Denne suspensjonen ble deretter sonikert rundt 10 minutter. Seriefortynninger ble generert til det nødvendige konsentrasjonsområdet. Seriefortynning av de ekvivalente

20 mengdene av DMSO i sjøvann ble anvendt som kontroll. Rankefötting-bioanalysemetoden anvendt følger fremgangsmåten først introdusert av Rittschof et al. (1992), og deretter av andre forfattere (Willemsen et al., 1998). Denne fremgangsmåten er nå standard praksis for mange grohemmende undersøkelser av nye forbindelser.

Toksisitetsanalyser ble modifisert fra Rittschof et al. (1992). Trinn II naupiluslarver anvendt i testene ble oppnådd fra *Balanus amphitrite* fullt utviklede oppsamlet fra klippevegger mellom tidevann ved Kranji mangrove, Singapore. Larver ble oppsamlet fra en beholder av fullt utviklede ved tiltrekning

30 til en punktluskilde og overført til 500 ml av frisk sjøvann. Deretter ble larver gjenkonsentrert med et fiberoptisk lys og tilsatt til analyser.

Duplikate analyser ble utført i 2 ml glassflasker (La Pha Pack® PN 11-14-0544) i 1 ml filtrert sjøvann i 22 til 24 timer. Analysene ble gjentatt for bekreftelse. Det

35 var to sett av kontroller, en tom kontroll bestående av 3 rør med bare sjøvann og DMSO kontroll bestående av den ekvivalente fortynningsserien med DMSO uten forbindelse). For forbindelsene var det 3 rør for hver av hver

testkonsentrasjon. Analysen ble satt i gang ved tilsetning av rankeföttingnaupilus i 50 µl sjøvann. Etter 22 til 24 timer dyrkning ved 25-27 °C ble løsninger inneholdende testdyr overført til et Bogorov-brett og bedømt som levende eller døde. Døende larver ble bedømt som døde. Resultater ble bekreftet ved å gjenta analysen. Data ble kombinert og konsentrasjonen som forårsaket 50 % dødelighet (LD50) ble beregnet ved probitanalyse ved anvendelse av et basis datamaskinprogram (Libermann, 1983). Hvis data ikke var egnet for probitanalyse ble LD50 estimert fra fremstilte data.

Rankefötting-avsetningsanalyser var basert på metodologien fra Rittschof *et al.* (1992). Rankeföttinglarver fra område-oppsamlede fullt utviklede ble dyrket på algeblanding av 1: 1 v/v av *Tetraselmis suecica* og *Chaetoceros muelleri* ved 25°C, ved tilnærmet 5×10^5 celler pr. ml tetthet. På dette regimet ble larvene omdannet til cyprider på 5 dager. Disse cypridene ble aldret ved 4 °C i 2-3 dager, og 45-70 % avsetning etter 24 timer (Willemsen *et al.*, 1998).

Avsetningstester ble utført i 7 ml nøytrale glassflasker (Samco® T1 03N1) 34 mm ganger 23 mm diameter, med 20-40 cyprider pr. brønn. Testløsninger ble laget opp til to ganger den nødvendige sluttkonsentrasjonen. 0,5 ml av testløsning ble tilsatt hver brønn, og cyprider ble overført til hver brønn i 0,5 ml sjøvann. Analyser ble gjort i triplikat. Som før var det to sett kontroller, en tom kontroll bestående av 3 rør med bare sjøvann, og DMSO kontroll bestående av den ekvivalente fortyningsserien med DMSO uten forbindelse. Etter 24 timer ble larver som hadde festet seg og blitt omdannet tellet opp og resultatet uttrykt som prosentvis avsetning. Larver som ikke var festet ble bedømt som ikke avsatt. Analysene ble gjentatt og konsentrasjonen som forårsaket 50 % avsetningsinhibering (ED50) ble bestemt ved pro bit analyse ved anvendelse av et basis datamaskinprogram (Lieberman, 1983), eller ved estimering fra fremstilte data.

Dødelig dose (LD50, toksisitet) og effektiv dose (ED50, antiavsetning) verdier er vist under. Forbindelser der både LD50 og ED50 var større enn $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, som var den høyeste konsentrasjonen testet, har ikke blitt inkludert i tabellen nedenfor, disse er vurdert til å være 'inaktive'.

Den terapeutiske ratio, eller LD50/ED50, er anvendt til å vurdere effektiviteten til forbindelsen i forhold til dets toksisitet.

Biologiske undersøkelser - resultater

Resultatene er oppsummert i tabell 2(a) og (b). Der det er aktivitet er en klar sone observert rundt platene. Bredden av den observerte inhiberingssonen er en funksjon av styrken til forbindelsen og dets oppløselighet (det vil si graden av diffusjon av forbindelsen ut av platen og inn i agarmediet). Ingen av forbindelsene viste noen aktivitet mot stamme S14 og bare én forbindelse, forbindelse 5.2, hadde aktivitet mot stamme S1. For de fleste stammer hvor det ble påvist aktivitet for loperamid og Imodium®, ble aktivitet også påvist for forbindelser 12.1, 12.2 og i de fleste tilfeller 4.1 og loperamidanalogene 4.7, 5.2, 5.3. Fjerningen av forgrening på alfakarbonet (forbindelser 3.2, 10.5, 11.1, 11.2, 11.3 og 11.4) eller erstatningen av begge fenytringene med en metylsubstituent (forbindelser 10.1 og 10.2) resulterte i et observert tap av antibakteriell aktivitet, unntatt for S16 bakteriestamme. Stamme S16 var mottakelig for en meget forskjellig rekke av forbindelser sammenlignet med de andre forbindelsene som antyder at den kan respondere til en forskjellig farmakofor. Ulikt alle andre stammer, var S16 motakelig for forbindelsene med en enkelt alkylkjede (forbindelser 11.1, 11.2 og 11.4). Fra sekvensresultater er knyttet til *Pseudoalteromonas* sp.

For alle forbindelsene ble ingen inhibering observert mot referansebakteriestammene. Dette antyder at den antibakterielle aktiviteten observert fra disse forbindelsene kan være lavere enn konvensjonelle antibiotika. Uansett er ikke dette ansett som spesielt viktig fordi aktivitetsnivåer under de til konvensjonelle antibiotika kan fortsatt tilveiebringe anvendelige resultater.

Tabell 2a: Aktivitet av forbindelser mot lokale isolater av biofilmbakterier

[illegible]

Forbindelser	BAKTERIESTAMMER												
	1	3	4	9	10	14	16	17	18	27	28	29	30
4.6	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4.7	-	++	++	++	++	-	+	+	+	-	++	++	+
5.1	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
5.2	+	++	++	++	++	-	+	+	+++	-	++	++	++
5.3	-	++	+	+	++	-	-	+	+	-	+	+	+
9.3	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
9.1	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10.4	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
10.5	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
11.1	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
11.2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12.1	-	++	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
12.2	-	++	+	+	+	-	-	+	++	+	+	+	+
LOP	-	+++	++	++	++	-	-	++	+++	++	++	++	+
IMD	-	++	++	++	+	-	+	+	+	+	++	++	+

Tabell 2b: Aktivitet av ytterligere forbindelser mot lokale isolater av biofilmbakterier

FORBINDELSER	BAKTERIESTAMMER												
	1	3	4	9	10	14	16	17	18	27	28	29	30
12.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
12.4	-	+++	+	+	+	-	-	+	++	+	-	+	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
12.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.7	+	+++	++	++	++	-	-	++	+++	+	+	+	+

Inhiberingssonen representerer et klart område rundt hver plate hvor ingen bakterievekst ble observert.

(-) Ingen sone ble observert. Testforbindelse fremviste ingen aktivitet mot bakterier i plateanalysen.

5 (+) 2-5 mm inhiberingssone rundt hver plate ble observert.

(++) 5-10 mm sone ble observert.

(+++) Større enn 10 mm sone observert.

LOP= loperamid ren forbindelse;

10 IMD= Imodium® suspendert i DMSO for å gi et innhold på 50 ug aktiv ingrediens.

5 konvensjonelle antibiotika ble også testet. Resultatene er vist i Tabell 2(c). Generelt var forbindelsene mindre virksomme enn de testede antibiotika, og aktivitetsmønsteret var forskjellig.

15

Tabell 2 (c) Aktivitet av konvensjonelle antibiotika.

	AMP		TETR		ERY		CHL	STREP	
Bakteriestammer	2 ug	10 ug	5 ug	30 ug	5 ug	15 ug	30 ug	10 ug	25 ug
1	++	++	-	-	-	-	++	++	+++
3	-	-	-	-	++	++	+++	-	-
4	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+	++
9	+	+++	+	++	+++	+++	+++	+	+
10	+++	+++	+	+	++	+++	+++	+	+
14	+	+	-	+	-	+	++	+	+
16	+	+	-	-	+	+	++	+	++
17	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	++
18	+	++	-	+	+	++	++	+	++
27	++	+++	-	+	++	++	+++	-	-
28	+	++	-	+	+++	+++	+++	+	++
29	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+	++
30	+++	+++	+	+	++	++	++	+	++
REF 1	-	+	+	++	-	+	++	+	++

Bakteriestammer	AMP		TETR		ERY		CHL	STREP	
	2 ug	10 ug	5 ug	30 ug	5 ug	15 ug	30 ug	10 ug	25 ug
REF 2	-	+	+	++	-	+	++	-	-
REF 3	-	-	+	++	+	+	++	+	++
REF 4	-	+	++	++	+	+	++	+	++

REF 1: *Escherichia coli* (Stamme K12; ATCC 15222)

REF 2: *Escherichia coli* (Stamme DH5a)

REF 3: *Pseudomonas aeruginosa* (stamme LMG 12228; ATCC 15692)

REF 4: *Pseudomonas putida* (Stamme KT2440; BCRC 10459)

5

AMP = Ampicillin

TETR = Tetrasyklin

ERY = Erythromycin

CHL = Kloramfenikol

STREP = Streptomycin

10

LD50 og ED50 verdiene for forbindelsene er vist i Tabell 3(a). For noen av forbindelsene var LD50 og ED50 større enn 50 µg/ml (som er den høyeste testede konsentrasjonen) og så, selv om aktivitet er til stede, ble det generelt ikke gjort ytterligere testing av disse forbindelsene.

15

Tabell 3(a): Bioaktivitet mot rankeföttinglarver

Forbindelse Ref	LD50 [#]	ED50*	TR	
9.1	1,68	0,07	24	
4.1	50	2,35	21,27	*
12.3	50	2,76	18,12	*
4.5	50	6,48	7,72	*
12.4	3	0,47	6,38	
12.7	1.16	0,26	6,38	
12.1	9,11	1,5	6,07	
12.2	9,83	2	4,92	
Loperamid	1,56	0,37	4,22	
10.4	50	15	3,33	*

Forbindelse Ref	LD50 [#]	ED50*	TR	
3.1	50	15,1	3,31	*
4.4	12,35	5,98	2,07	
5.3	0,66	0,45	1,47	
9.2	49,24	50	0,98	*
4.3	0,82	1	0,82	
4.6	2,41	7,92	0,30	
4.2	14,32	50	0,29	*
3.4	8,41	43,93	0,19	
* Der LD50, ED50 var >50, ble en nominell verdi på 50 tildelt for estimering av den terapeutiske ratio (TR), den aktuelle terapeutiske ratio er således sannsynlig å være høyere/lavere enn estimert. Faktisk har ytterligere eksperimenter for forbindelse 4.1 vist at LD50 er 100, og TR er 42,55. For forbindelse 11.3 har ytterligere eksperimenter vist at LD50 er 88,28. For alle de resterende forbindelser, selv om aktivitet er til stede, er verdier for LD50 og ED50 større enn 50 generelt ikke inkludert i tabellen. [#]den høyeste testede konsentrasjonen var 25 µg/ml.				

Resultatene til testene for ytterligere 5 forbindelser er vist i tabell 3(b) og 3(c) under.

5 Tabell 3(b): Toksisitet til ytterligere forbindelser mot rankeföttinglarver

Forbindelse	LD ₅₀ [#]
12.8	3,35
12.9	>25
12.10	>25
12.11	>25
12.12	0,2 - 1

For anti-avsetningstestene er verdiene gitt under gjennomsnittet over to forsøk, prosentandel cyprider som ble avsatt etter 24 timers dyrkning.

Tabell 3(c): Bioaktivitet av ytterligere forbindelser mot rankeföttinglarver

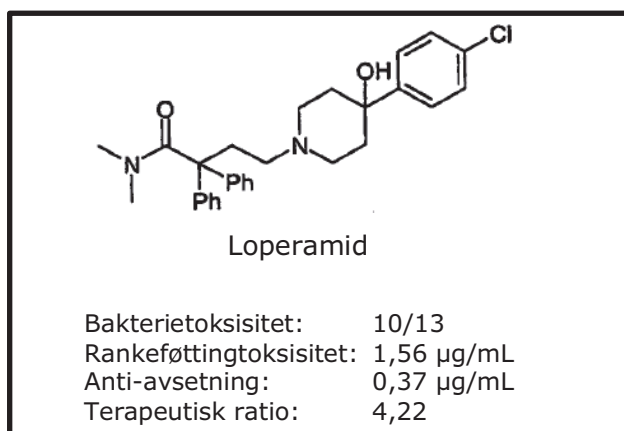
BEHANDLINGER / Testkonsentrasjon	Kontroll (bare sjøvann)	Kontroll (DMSO)	12.2	12.8	12.9	12.10
Ingen forbindelse	30,43	35,44				
0,2 ug/ml			8,94	25,82	28,14	12,5
1 ug/ml			8,42	8,62	10,56	13,00
5 ug/ml			8,37	0	1,94	11,40
25 ug/ml			0	0	1,32	17,88

5

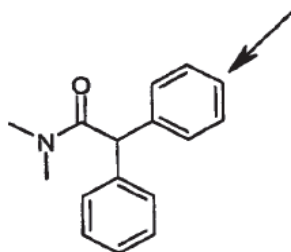
Diskusjon av resultater

Konseptuelt kan forbindelser 3.1 og 4.6 anses som de to hovedfragmentene som oppnås når loperamid-utgangsstrukturen er delt i to.

10



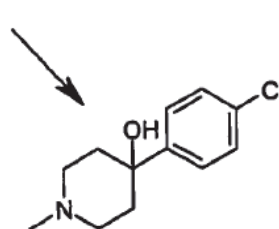
15



Forbindelse 3.1

Bakterietoksisitet: 1/13
 Rankeföttingtoksisitet: > 50 µg/mL
 Anti-avsetning: 15,10 µg/mL
 Terapeutisk ratio: 3,31

20



Forbindelse 4.6

Bakterietoksisitet: 2/13
 Rankeföttingtoksisitet: 2,41 µg/mL
 Anti-avsetning: 7,92 µg/mL
 Terapeutisk ratio: 0,30

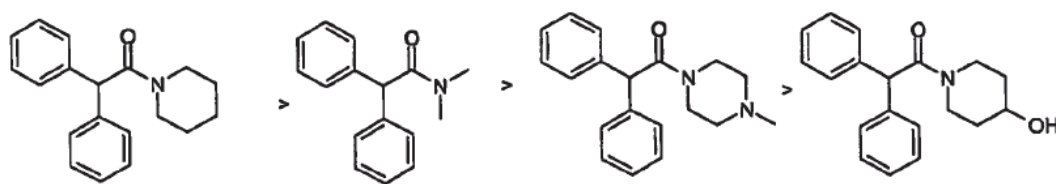
25

Biologisk styrke er til stede i begge fragmenter da bioanalyser viste at begge forbindelser 3.1 og 4.6 beholdt påviselig biologisk aktivitet.

Den terapeutiske ratio for forbindelse 4.6 var mindre enn én, som indikerer toksisitet, mens TR for forbindelse 3.1 var større enn én. Forbindelser med høye TR-verdier er bestemt til å ha godt potensiale som grohemmende forbindelser fordi de har en anti-avsetningseffekt ved konsentrasjoner under dødelig grense.

Forbindelse 3.1 er et kjent pesticid med det vanlige navnet difenamid (kommersielle navn inkluderer Dymid™ og Enide™) og dets mikroorganisme-forenklede bionedbrytning i jord har blitt dokumentert (Avidov 1990; Avidov 1988). Kugler et al. har tidligere innlevert et patent som dekker anvendelse av forskjellige insekticider og herbicider, inkludert difenamid, i grohemmende sammensetninger (Kugler, US patentnummer 5,990,043).

Gitt dens ønskede TR-verdi, ble preliminaire struktur-funksjon studier utført fra forbindelse 3.1 og disse viste flere interessante trender.



Forbindelse 4.1

Forbindelse 3.1

Forbindelse 4.2

Forbindelse 9.3

Bakterietoksisitet: 813
Rankeføtt.toksisitet: >50 µg/mL
Antiavsetning: 2,35 µg/mL
Terapeutisk ratio: 21,28

Bakterietoksisitet: 1/13
Rankeføtt.toks.: >50 µg/mL
Antiavsetning.: 15,10 µg/mL
Terapeutisk ratio: 3,31

Bakterietoksisitet: N/A
Rankeføtt.toks.: 14,32/mL
Antiavsetning: >50 µg/mL
Terapeutisk ratio: 0,29

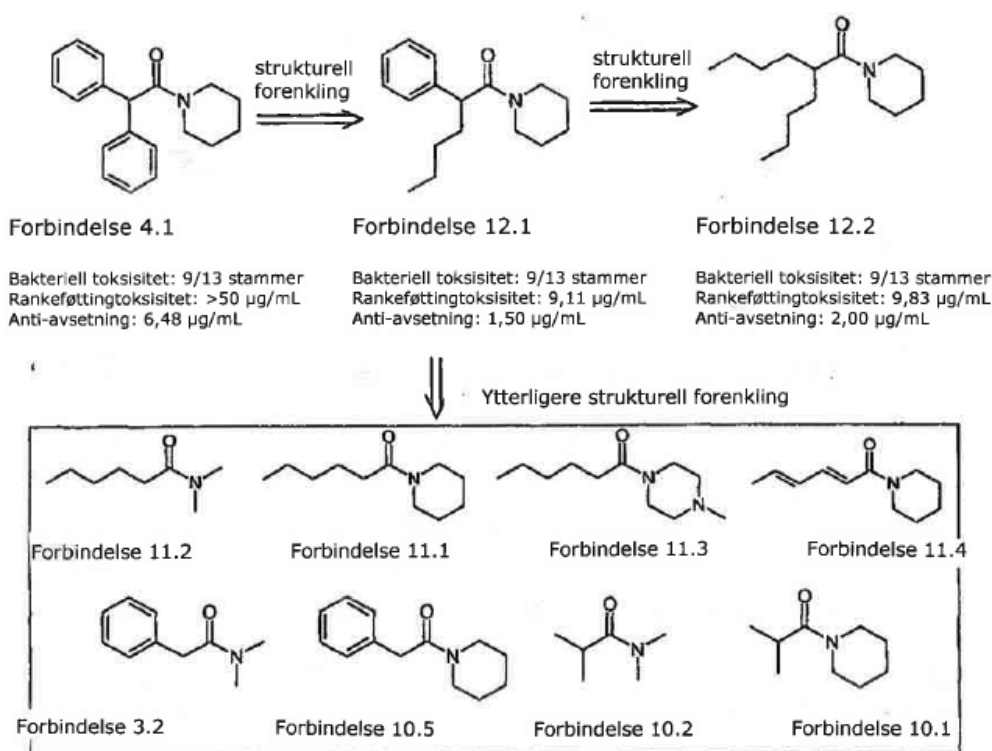
Bakterietoksisitet: 2/13
Rankef.toks.: >50 µg/mL
Antiavsetnin: >50 µg/mL
Terapeutisk ratio: -

Bakterietoksisitet er gitt som antall stammer inhibert over de totale stammer testet. Rankefötting-toksisitet er gitt som LD_{50,24t} (µg/mL) for toksisitet til Trinn II nauplius av Balanus amphitrite. Anti-avsetningsaktivitet er ED_{50, 24t} (µg/mL) mot avsetning av cyprider av Balanus amphitrite.

Innlemmelse av amidnitrogenet i en seksleddet ring (piperidin) struktur økte antibakteriell og anti-avsetningsaktivitet (forbindelse 3.1 mot forbindelse 4.1) mens innlemmelse i en N-metylpiperazinring reduserte bakterietoksisitet, økte rankefötting nauplius toksisitet, men eliminerte anti-avsetningsadferd

(forbindelse 4.2), mens tilsetningen av alkoholfunksjonalitet på piperidinringen ytterligere reduserte aktivitet (forbindelse 9.3).

Forbindelse 4.1 viste anti-avsetningsaktivitet, men ingen observerbar nauplius toksisitet, som gir opphav til en større TR-verdi. Forbindelse 4.1 ble derfor anvendt som et utgangspunkt for ytterligere strukturell forenkling. Aktiviteten og høy TR for forbindelse 4.1 er overraskende gitt at den har blitt vist å vise antispasmodisk aktivitet (Cheney, 1952), som er urelatert til aktiviteten vist heri.



Bakterietoksisitet er gitt som antallet stammer inhibert over de totale stammer testet. Rankeføttingtoksisitet er gitt som $LD_{50,24t}$ (µg/mL) for toksisitet til Trinn II nauplius av *Balanus amphitrite*. Anti-avsetningsaktivitet er $ED_{50,24t}$ (µg/mL) mot avsetning av cyprider av *Balanus amphitrite*.

Det å erstatte begge fenylgruppene med en enkelt n-betylgruppe (forbindelse 11.1) eller en umettet butylgruppe (forbindelse 11.4) og et hydrogenatom resulterte i forbindelser med redusert styrke. Generelt ser det ut til at fjerningen av forgreningen på alfakarbonet ved fjerning av én fenylgruppe (som i forbindelser 3.2, 10.5, 11.1, 11.2, 11.3 og 11.4) eller erstatningen av begge med en metylgruppe (som i forbindelser 10.1 og 10.2) resulterte i et nettotap av aktivitet.

Erstatningen av én eller begge av fenytringene i forbindelse 4.1 med n-butyلكjeder (for eksempel forbindelser 12.1 og 12.2) resulterte imidlertid ikke i et betydelig aktivitetstap.

5 Fjerningen av piperidinringn i forbindelse 12.3 resulterte i tap av antibakteriell aktivitet, men bioaktivitet mot rankeföttinglarver ble beholdt. Tilføring av -OH grupper på alkylkjeden resulterte i redusert aktivitet. Tilføring av dobbeltbindingen på alkylkjeden resulterte ikke i noen stor endring i aktivitet sammenlignet med 12.1 og 12.2.

10

De mest kraftfulle forbindelsene i serien, hvor LD50 og ED50 var mindre enn 10 µg/mL og TR-verdiene var større enn én, er forbindelsene 9.1, 5.3, 12.1, 12.2, 12.4, 12.7 og 12.8.

15

LD50 og ED50 for forbindelser 4.3 og 4.6 var også mindre enn 10 µg/mL, men deres TR-verdier er mindre enn én, som indikerer at disse forbindelser er mer toksiske enn avstötende. Av de aktive forbindelsene representerer forbindelser 12.1 (for tidligere syntese se Marlensson, 1960), 12.2, 12.4, 12.7 og 12.8 de mest lovende antibakterielle og/eller grohemmende midler.

20

Av forbindelsene med høy terapeutisk ratio mot rankeföttinger har forbindelsene 12.2, 12.4 og 12.7 den enkleste kjemiske formen. Begge disse molekylene var også aktive mot bakterier, og deres aktiviteter er sammenlignbare med (eller bedre enn) loperamid. Disse forbindelsene er mye mindre og enklere i struktur enn de fleste eksisterende grohemmende forbindelser, og mangler hvilke som helst av halogenerte og aromatiske ringstrukturer. Disse forbindelsene er derfor miljømessig uskadelige grohemmende midler.

25

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse har den betydelige fordelen av å skaffe det grohemmende beleggmarkedet et organisk alternativ til den eksisterende teknologien som i stor grad er basert på tilsetning av kobber for å oppnå signifikante grohemmende effekter. Forbindelsene vi har utviklet kan anvendes som rimelige additiver som er enkle å fremstille som ikke inneholder metaller og derfor har redusert toksisitet i marint miljø. Særlig har ikke forbindelse 12.2 noen halogen eller aromatiske ringstrukturer.

35

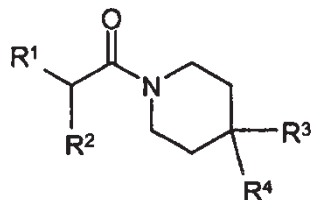
Forbindelsene kan blandes inn i eksisterende akrylmalinger og er derfor praktiske alternativer til eksisterende beleggalternativer. Videre, på grunn av deres enkle struktur, er forbindelsene interessante kandidater for nedbrytning via bakterielle midler i det marine miljøet og er mindre tilbøyelig til å akkumulere og utvise en helserisiko i fremtiden. I tillegg, gitt at de eksisterende organiske biocider slik som Diuron® og Sea-Nine® har vist seg å bioakkumulere og forårsake skadelige effekter i det marine miljøet, representerer forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse et verdifullt alternativ til tradisjonelle metallbaserte additiver.

5

10

Patentkrav

1. Anvendelse av en forbindelse med formel (I) i en fremgangsmåte for å redusere eller hindre groing



(I)

hvor

R¹ og R² er uavhengig valgt fra eventuelt substituert aryl og eventuelt substituert C₃ til C₁₂ alkyl; og

R³ og R⁴ er uavhengig valgt fra hydroksyl, eventuelt substituert C₁ til C₆ alkyl, eventuelt substituert fenyl og H.

2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor minst én av R¹ og R² er C₃₋₅ alkyl.

3. Anvendelse ifølge krav 2, hvor minst én av R¹ og R² er n-butyl.

4. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor minst én av R¹ og R² er C₅ til C₁₅ aryl, foretrukket fenyl.

5. Anvendelse ifølge krav 4, hvor (a) én av R¹ og R² er fenyl og den andre er n-butyl, eller (b) R¹ og R² er den samme.

6. Anvendelse ifølge krav 5, hvor (a) R¹ og R² begge er n-butyl, eller (b) R¹ og R² begge er fenyl.

7. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor én eller begge av R¹ og R² er usubstituert.

8. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvor (a) én av R³ og R⁴ er hydroksyl og den andre er H, (b) begge av R³ og R⁴ er H, eller (c) én eller begge av R³ og R⁴ er substituert C₁ - C₆ alkyl.

9. Anvendelse ifølge krav 8, hvor én eller begge av R³ og R⁴ er hydroksy-C₁ - C₆ alkyl.

10. Anvendelse ifølge krav 9, hvori én av R^3 og R^4 er $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ og den andre av R^3 og R^4 er H.

5 **11.** Anvendelse ifølge krav 1, hvori forbindelsen er valgt fra forbindelser 12.2, 12.1, 12.7, 12.4, 12.8, 12.9, 12.10, 12.11, 12.12, 4.1, 4.3, 9.2, 9.3 og 4.5.

10 **12.** Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, hvori fremgangsmåten for å forhindre eller redusere groing er (a) en fremgangsmåte for å forhindre eller redusere mikrogroing eller makrogroing; (b) en fremgangsmåte for å redusere eller forhindre biofilmdannelse; (c) en fremgangsmåte for å redusere eller forhindre biofilmdannelse ved én eller flere av bakterier, sopp, alger og protozoer; (d) en fremgangsmåte for å redusere eller forhindre biofilmdannelse ved bakterier; (e) en fremgangsmåte for å
15 redusere eller forhindre makrogroing ved én eller flere av krepsdyr, bryozoer og mollukser; eller (f) en fremgangsmåte for å redusere eller forhindre makrogroing ved én eller flere av rankeføttinger og muslinger og deres larver.

20 **13.** Fremgangsmåte for å forhindre eller redusere groing på et substrat, hvori fremgangsmåten omfatter trinnet å påføre en forbindelse som definert i et hvilket som helst av kravene 1 til 11 på substratet.

14. Grohemmende sammensetning eller beleggsammensetning omfattende en forbindelse som definert i et hvilket som helst av kravene 1 til 11.