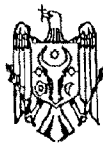




MD/EP 3810633 T2 2024.05.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3810633 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 7/62 (2006.01.01)
A61K 38/12 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2021 0390	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 05/2024, 2024.05.31
(22) Data de depozit: 2019.06.25	(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 50/2023, 2023.12.13
(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 19734346.0, 2019.06.25	(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2021, 2021.05.31
(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3810633, 2021.04.28	
(31) Numărul cererii prioritare: 201862689602 P	
(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2018.06.25	
(33) Țara cererii prioritare: US	
(71) Solicitanți: SPERO THERAPEUTICS, INC., US	
(72) Inventatori: BROWN Pamela, GB; DAWSON Michael, GB; SIMONOVIC Mona, GB; BOAKES Steven, GB; DUPERCHY Esther, GB; RIVERS Dean, GB; LESTER Roy, GB; COLEMAN Scott, US	
(73) Titular: SPERO THERAPEUTICS, INC., US	
(74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

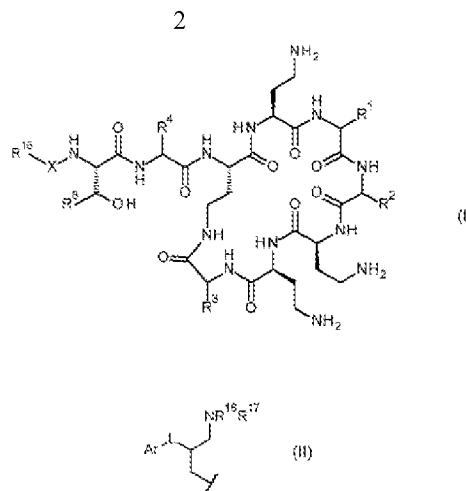
(54) Compuși

(57) Rezumat:

1

Invenția furnizează un compus de polimixină cu formula (I) și săruri, solvați și forme protejate ale acestora, compoziții farmaceutice care cuprind compușii cu formula (I) și utilizarea compușilor și compozițiilor în metode de tratament, cum ar fi metode de tratament al infecțiilor microbiene. Compușii cu formula (I) sunt reprezentați astfel: formula (I) în care -R15 este o grupare: formula (II) și -R16 este hidrogen; -R17 este hidrogen; -L este o legătură covalentă sau metilen; și -Ar este aril opțional substituit. Grupările -X-, -R1, -R2, -R3, -R4 și -R8 sunt așa cum sunt definite aici.

Revendicări: 7



MD/EP 3810633 T2 2024.05.31

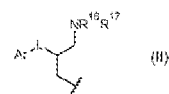
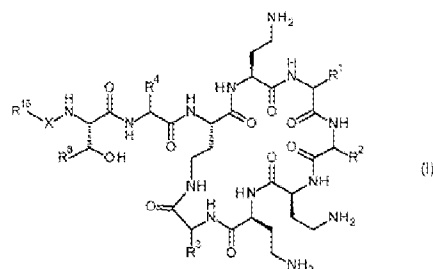
(54) Compounds**(57) Abstract:**

1

The invention provides a polymyxin compound of formula (I) and salts, solvates and protected forms thereof, pharmaceutical compositions comprising the compounds of formula (I), and the use of the compounds and compositions in methods of treatment, such as methods for the treatment of microbial infections. The compounds of formula (I) are represented thus: formula (I) wherein -R₁₅ is a group: formula (II) and -R₁₆ is hydrogen; -R₁₇ is hydrogen; -L- is a covalent bond or methylene; and -Ar is optionally substituted aryl. The groups -X-, -R₁, -R₂, -R₃, -R₄, and -R₈ are as defined herein.

Claims: 7

2



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

5 Prezentul caz revendică beneficiul și prioritatea lui US 62/689602 depusă în 25 iunie 2018 (25.06.2018).

Domeniul invenției

10 Prezenta invenție se referă la noi compuși de polimixină, compoziții farmaceutice care cuprind compușii, și la utilizarea compușilor și compozițiilor farmaceutice pentru tratament medical, de exemplu, tratamentul infecțiilor microbiene, în particular, infecții cu bacterii Gram-negative.

Context

15 WO 2013/072695 și WO 2014/188178 descriu derivați de polimixină în care fragmentul de acil gras N-terminal și fragmentul adiacent de acid diaminobutiric al polimixinei B sau al colistinei sunt înlocuite cu o grupare terminală care are un substituent amino. Astfel de derivați au activitate antibacteriană bună, având în același timp o citotoxicitate redusă.

20 WO 2015/135976 descrie, de asemenea, derivați de polimixină în care din nou fragmentul de acil gras N-terminal și acidul diaminobutiric adiacent al Polimixinei B sau Colistinei sunt înlocuite cu o grupare de capăt care are un substituent amino. Aici, poziția specifică a substituentului amino și plasarea altor substituenți în fragmentul N-terminal s-au dovedit a fi importante pentru o activitate antimicrobiană puternică într-o serie de agenți patogeni cheie, cum ar fi *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii*. Compușii dezvăluiți au păstrat, de asemenea, o citotoxicitate scăzută.

25 WO 2016/083531 descrie derivați de polimixină, în care din nou fragmentul de acil gras N-terminal și acidul diaminobutiric adiacent al polimixinei B sau colistinei sunt înlocuiți cu o grupare de capăt care are un substituent amino, cum ar fi acele grupări prezente în WO 2013/072695, WO 2014/188178 și WO 2015/135976. În plus, reziduul de aminoacid din pozițiile 6 și/sau 7 este substituit cu Polimixină B și Colistină.

30 WO 2017/054047 descrie derivați de polimixină decapeptidă, în care fragmentul de acil gras N-terminal al polimixinei B este înlocuit cu o grupare de capăt care are funcționalitate aromatică. În plus, reziduul de aminoacizi din poziția 3 și reziduurile de aminoacizi din pozițiile 6 și/sau 7 sunt substituite în raport cu Polimixina B.

35 US 2012/316105 descrie derivați de polimixină decapeptidă în care fragmentul de acil gras N-terminal al polimixinei B este înlocuit, în mod obișnuit, cu o grupare de capăt care are funcționalitate aromatică. În plus, reziduul de aminoacid din poziția 3 este substituit cu Polimixină B.

40 WO 2016/166103 descrie derivați de polimixină în care din nou fragmentul de acil gras N-terminal și acidul diaminobutiric adiacent al Polimixinei B sau al Colistinei sunt înlocuiți cu o grupare de capăt care are funcționalitate aromatică.

45 Koh și colab. este o revizuire a agenților antimicrobieni. Printre altele, Koh și colab. discută exemplele din US 2012/316105

Pentru a fi mai utili pentru terapia parenterală a infecțiilor sistemice decât polimixinele disponibile în prezent, noii derivați de polimixine trebuie să se potrivească cel puțin cu activitatea acestor polimixine cunoscute, având în același timp o toxicitate renală semnificativ mai mică *in vivo*.

Expunerea pe scurt a invenției

Invenția este definită în revendicările anexate.

50 Într-un aspect general, invenția furnizează compuși care au un nucleu deacilat de polimixină, cum ar fi un nucleu nonapetidic de Polimixină B sau de Colistină, cu reziduul de aminoacid în poziția 3 substituit cu L-Dap, care are o grupare $-C(O)-CH_2CH(3-CI-Ph)CH_2NH_2$, așa cum este definit aici, la capătul său N-terminal. Astfel de compuși își găsesc utilizare într-o metodă de tratament sau profilaxie, opțional în combinație cu un al doilea agent activ. Compușii pot fi utilizați pentru a trata o infecție microbială, cum ar fi o infecție bacteriană Gram-negativă.

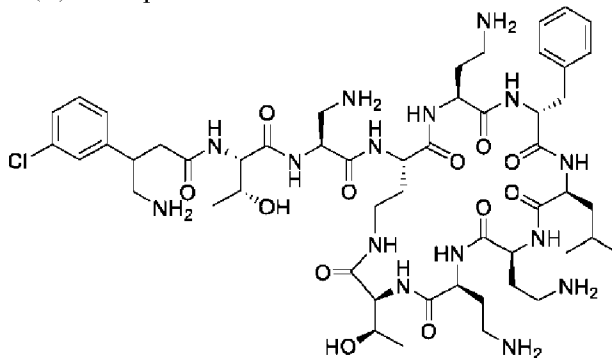
55 Compușii din prezenta invenție s-au dovedit a avea citotoxicitate scăzută echilibrată cu niveluri de medicament acceptabile pentru rinichi după administrare parenterală. Compușii din prezenta invenție se dovedesc a fi superiori, atât polimixinei B, cât și compușilor de polimixină modificați cunoscuți în domeniu, inclusiv celor raportați anterior de către prezentul solicitant. Această superioritate se manifestă în ceea ce privește una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: citotoxicitate mai mică, niveluri de medicament acceptabile pentru rinichi (adică, toxicitate renală acceptabilă, care rezultă din niveluri de

medicamente în rinichi care nu sunt crescute) după administrare parenterală, eficacitate în modelele de coapsă și plămâni de șoarece, și/sau MIC superioară împotriva tulpinilor bacteriene patogene, fiind în același timp echivalente cu compușii din stadiul tehnicii în ceea ce privește celelalte.

De obicei, compușii cunoscuți în domeniu prezintă una, sau poate două dintre aceste caracteristici avantajoase, dar nu toate. De exemplu, acum este relativ obișnuit să se găsească compuși de polimixină cu citotoxicitate mai mică, dar această citotoxicitate mai mică este adesea însoțită de o reducere a activității antibacteriene. În plus, compușii cu o citotoxicitate mai mică pot fi totuși găsiți în rinichi la niveluri ridicate după dozare. Astfel de compuși sunt, prin urmare, încă toxici și nu sunt utili în metode de tratament medical.

Într-un prim aspect al invenției, este furnizat un compus cu formula (II) și săruri, solvați și forme protejate acceptabile farmaceutic ale acestuia.

Compusul cu formula (II) este reprezentat astfel:



Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus cu formula (II), opțional, împreună cu unu sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic.

Într-un alt aspect, este furnizat un compus cu formula (II) sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus cu formula (II), pentru utilizare într-o metodă de tratament sau profilaxie.

Într-un alt aspect, este furnizat un compus cu formula (II), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus cu formula (II), pentru utilizare într-o metodă de tratare a unei infecții microbiene.

O infecție microbială poate fi o infecție bacteriană, cum ar fi o infecție bacteriană Gram-negativă. Infecția bacteriană Gram-negativă poate fi selectată din grupul constând din *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella*

spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp. și alte Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp.,

Acinetobacter spp., *Stenotrophomonas*, și *Legionella*.

Aici sunt descrise metode pentru prepararea compușilor cu formula (II) precum și a compușilor intermediari pentru utilizare la prepararea compușilor cu formula (II).

Acestea și alte aspecte și variante de realizare a invenției sunt descrise mai detaliat mai jos.

Descrierea detaliată a invenției

Prezenta invenție furnizează compuși cu formula (II), așa cum este descris mai detaliat mai jos, pentru utilizare în tratamentul medical, opțional, împreună cu un al doilea agent activ.

În linii mari, compușii cu formula (II) au un nucleu de polimixină, care este un nucleu nonapeptidic, și o grupare $-C(O)-CH_2CH(3-Cl-Ph)CH_2NH_2$ la capătul N-terminal al nucleului polimixinei. Gruparea conectată la $-C(O)-$ este o grupare γ -aminopropil substituită. Gruparea γ -aminopropil este substituită cu 3-Cl-Ph în poziția β în raport cu fragmentul $-C(O)-$.

Primul reziduu de aminoacid din lanțul exociclic al compușilor din invenție – care corespunde poziției 3 în polimixină - este un reziduu L-Dap (acid diaminopropionic), mai degrabă decât un reziduu L-Dab (acid L-diaminobutiric), așa cum este prezent în Polimixină B și în Colistină.

Reziduurile de aminoacizi din pozițiile 6 și 7 ale compusului polimixină (urmând numerotarea utilizată pentru polimixină) corespund acelor reziduuri de aminoacizi prezente în polimixină B.

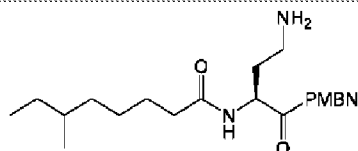
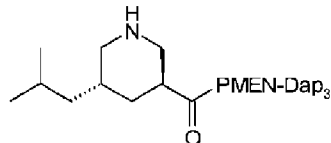
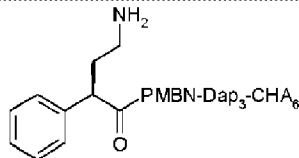
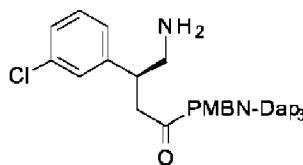
Pentru a fi mai utili pentru terapia parenterală a infecțiilor sistemice decât seria cunoscută în prezent de compuși de polimixină, noii derivați de polimixină trebuie să se potrivească cel puțin cu activitatea antibacteriană a acelor compuși de polimixină cunoscuți, având în același timp o toxicitate renală semnificativ mai mică *in vivo*.

S-a descoperit acum că nu este suficient ca un compus de polimixină să prezinte o citotoxicitate mai mică, deoarece aceasta, frecvent, nu este asociată cu o toxicitate redusă *in vivo*. Astfel, acumularea medicamentului în rinichi și eliminarea acestuia de acolo trebuie să fie, de asemenea, favorabile. Cu alte

cuvinte, combinația dintre citotoxicitate și nivelurile de medicament în rinichi după administrare parenterală este ceea ce conduce la un profil de toxicitate *in vivo*.

- 5 Acest lucru poate fi arătat prin exemplu de comparații arătat în tabelul A de mai jos, în care PMBN se referă la nucleul nonapeptidic de polimixină B și PMEN se referă la nucleul nonapeptidic de polimixină E, cu substituțiile la reziduurile de aminoacizi la pozițiile 3 și 6 (conform cu numerotarea polimixinei) prezentate, atunci când este cazul (de ex., Dap înlocuiește Dab în poziția 3 și ciclohexilalanina (CHA) înlocuiește fenilalanina în poziția 6).

Tabelul A

Compus	Structură	Citotoxi- citate	Nivel de medicament în rinichi		Toxicitate renală*
			4 ore	16 ore	
Polimixină B		1,0	128	18	++
Exemplu de referință D77, WO 2015/135976		23**	516	264	++++
Exemplu de referință 38, WO 2016/083531		9,2***	567	333	+++
Exemplul 5		11,6	170	19	+/-

- 10 Citotoxicitatea se referă la IC₅₀ măsurată comparativ cu cea înregistrată pentru Polimixină B împotriva unei linii de celule HK-2. Nivelul de medicament se referă la cantitatea de compus (μg/g de rinichi) găsită în rinichi la 4 sau 16 ore după o doză sc de 17,2 mg/kg într-un șoarece.

- 15 * Compușii au fost administrați în 4 doze, la 8 ore între ele, la 25 mg de bază liberă/kg/doză, sau 4 zile *tid* la intervale de 4 ore la 17,2 mg de bază liberă/kg/doză. După administrare, urina a fost colectată timp de 16-24 ore pentru determinarea biomarkerilor urinari ai toxicității renale (KIM-1, albumină, cistină C). Compușii au fost clasificați ca - (nu se pot distinge de vehiculul de control) până la ++++ (răspuns puternic de la toți biomarkerii).

- 20 ** În WO 2015/135976 a fost indicată o cifră de 13,3 pentru acest compus (Exemplul D77). Acest compus a fost testat acum în plus de două ori, și valoarea relativă a fost calculată pe baza valorii pentru PMB din același experiment. Valoarea medie a fost 23.

- 25 *** În WO 2016/083531 a fost indicată o IC₅₀ de 255 μg/mL pentru acest compus (Exemplul 38) față de 12 μg/mL pentru Polimixină B. Cu toate acestea, cifra pentru PMB utilizată în acea aplicație a fost o valoare mediană din mai multe experimente. Cifra de 9,2 indicată aici este prin comparație cu valoarea IC₅₀ pentru PMB determinată în același experiment

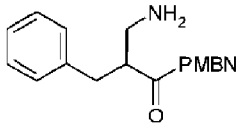
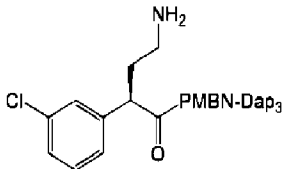
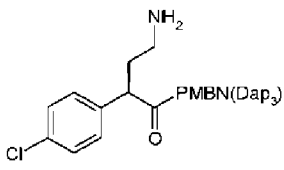
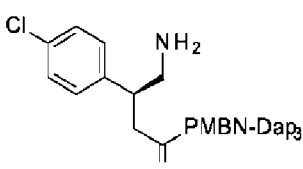
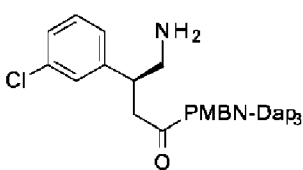
- 30 Prezentul solicitant a dezvăluit anterior în WO 2015/135976 nonapeptide de polimixină cu o grupare γ-aminopropil N-terminală substituită cu un fragment fenil sau benzil. Totuși, substituentul fenil sau benzil este furnizat în poziția α, mai degrabă decât în poziția β, în raport cu gruparea -X-. WO

2015/135976 descrie, de asemenea, o nonapeptidă de polimixină cu o grupare β -aminoetil N-terminală substituită în poziția α cu o grupare benzil. Aici, funcționalitatea amino este furnizată în poziția β mai degrabă decât în poziția γ , în raport cu gruparea -X.

5 În timp ce acești compuși cunoscuți prezintă activitate promițătoare și citotoxicitate moderat îmbunătățită în comparație cu Polimixina B, acești compuși sunt inferiori compușilor din prezenta invenție prin faptul că nu prezintă o combinație de citotoxicitate mică împreună echilibrată cu niveluri în rinichi acceptabile după administrare.

10 Acest lucru este arătat prin exemplul de comparații arătat în tabelul B de mai jos, în care PMBN se referă la nucleul nonapeptidic de polimixină B, cu substituțiile la reziduu de aminoacizi în pozițiile 3, atunci când este cazul (de ex., Dap care înlocuiește Dab în poziția 3).

Tabelul B

Compus	Structură	Citotoxicitate	Nivel de medicament în rinichi ($\mu\text{g/g}$ de rinichi, 4ore)	Nivel în rinichi la 4 ore / citotoxicitate relativă
Compus de referință D6, WO 2015/135976		4,4*	235	53
Compus de referință**		5,1	589	115
Compus de referință**		4,8	533	111
Exemplul de referință 1		8,8	268	30
Exemplul 5		11,6	170	15

* Acest compus este exemplul D6 din WO 2015/135976. Cifra indicată acolo pentru citotoxicitatea relativă a fost 3,7. Această cifră este media a două determinări repetate.

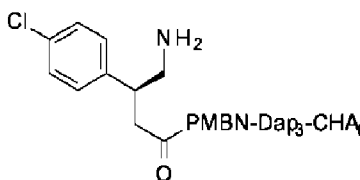
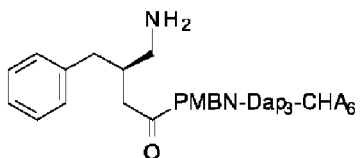
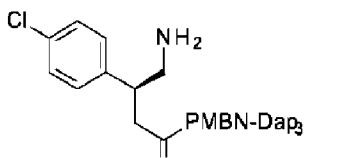
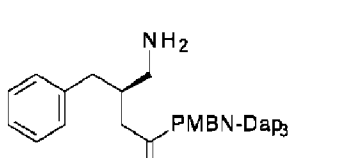
15 ** Compușii din aceste exemple de referință pot fi preparați conform metodelor descrise în WO 2015/135976.

Prezentul solicitant a dezvăluit anterior în WO 2016/083531 nonapeptide de polimixină cu grupări N-terminale modificate, în special, pe cele care includ grupări β -aril sau β -aralchil. Cu toate acestea, acești compuși cunoscuți au un reziduu de aminoacid lipofil în poziția 6, cum ar fi un reziduu de ciclohexilalanină, în timp ce compușii din prezentul caz au, de exemplu, un reziduu de fenilalanină,

leucină, norleucină, valină sau norvalină în poziția 6. Acești compuși cunoscuți sunt din nou inferiori compușilor din prezenta invenție, având în vedere combinația nesatisfăcătoare dintre citotoxicitate și nivelurile de medicament din rinichi după administrare.

- 5 Acest lucru este arătat cu titlu de exemplu de comparații arătat în tabelul C de mai jos, în care PMBN se referă la nucleul nonapeptidic al polimixinii B, cu substituțiile arătate la reziduurile de aminoacizi în pozițiile 3 și 6, atunci când este cazul (de ex., Dap care înlocuiește Dab în poziția 3, iar ciclohexilalanină (CHA) care înlocuiește fenilalanină în poziția 6).

Tabelul C

Compus	Structură	Citotoxicitate	Nivel de medicament în rinichi (μg/g rinichi, 4h)	Nivel în rinichi la 4 ore / citotoxicitate relativă
Compus de referință 50 WO 2016/083531		7,4	463	63
Compus de referință 58, WO 2016/083531		5,2	212	32
Exemplul de referință 1		8,8	268	30
Exemplul de referință 9		12,0	159	13

- 10 Compușii 50 și 58 sunt cunoscuți din WO 2016/083531, iar aceștia sunt compușii identificați ca *Izomer 1* în acest caz.

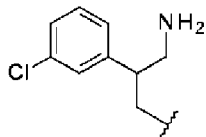
Compuși de polimixină

- 15 Compușii cu formula (II) sunt derivați N-terminali ai seriei de compuși nonapeptidă de polimixină. Nucleul compusului cu formula (II) este un derivat de nonapeptidă de Polimixină B (PMBN, Polimixină B 2-10), în care reziduul de aminoacid din poziția 3 este substituit cu L-Dap. Compușii cu formula (I) au o grupare $-C(O)-CH_2CH(3-Cl-Ph)CH_2NH_2$ la capătul N-terminal al nucleului de polimixină. Acest lucru este descris detaliat mai jos.

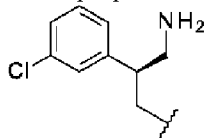
- 20 Compușii din invenție conțin un stereocentru în poziția β a grupării γ-aminopropil din fragmentul N-terminal. S-a descoperit că unul dintre stereoisomeri este asociat cu o citotoxicitate mai mică și cu niveluri mai mici de medicament în rinichi. Acest stereoisomer este stereoisomerul care eluează mai rapid în cromatografie în fază inversă, așa cum este descris detaliat în exemplele de lucru din prezentul caz.

- 25 Compusul cu formula (II) are un nucleu nonapeptidic și o grupare $-C(O)-CH_2CH(3-Cl-Ph)CH_2NH_2$ la capătul N-terminal al nucleului de polimixină. Gruparea care este conectată la $-C(O)-$ este o grupare γ-aminopropil substituită. Gruparea γ-aminopropil este substituită cu m-Cl-Ph în poziția β în raport cu fragmentul $-C(O)-$. Gruparea γ-aminopropil substituită poate fi reprezentată astfel:

8



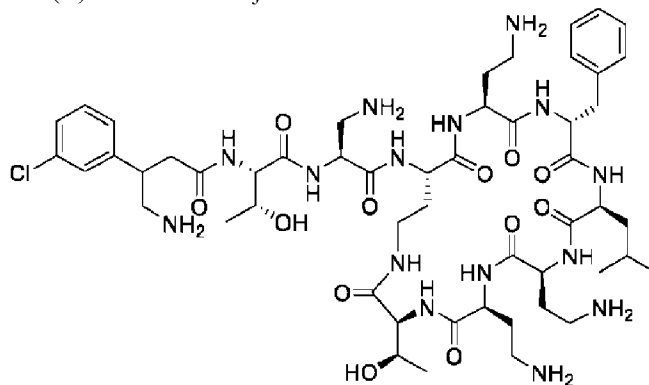
Într-o variantă de realizare, gruparea γ -aminopropil substituită poate fi reprezentată astfel:



5

Compusul (II)

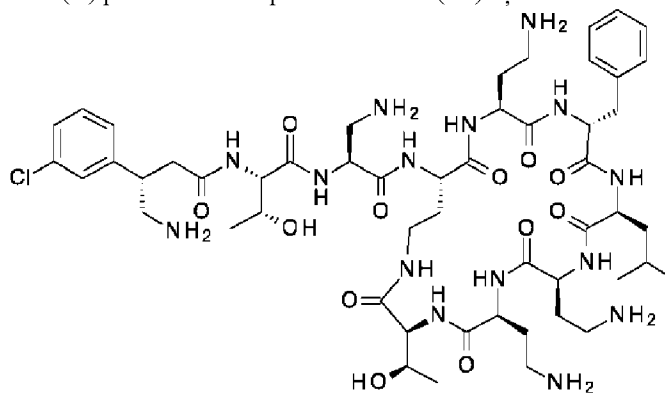
Compusul cu formula (II) este arătat mai jos:



și săruri, solvați și forme protejate ale acestuia.

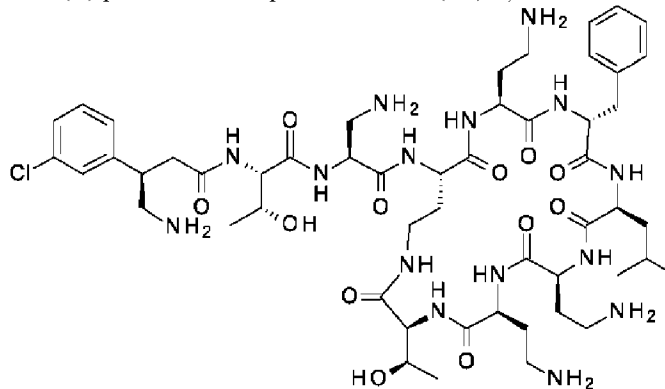
10

Compusul cu formula (II) poate fi un compus cu formula (IIa) așa cum este arătat mai jos:



și săruri, solvați și forme protejate ale acestuia.

Compusul cu formula (II) poate fi un compus cu formula (IIb) așa cum este arătat mai jos:

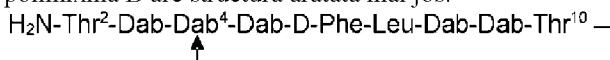


15

și săruri, solvați și forme protejate ale acestuia.

Compuși de polimixină

Compuși pentru utilizare în prezentul caz se bazează pe forme modificate de compuși de polimixină cunoscuți, cum ar fi nonapeptidă de polimixină B și nonapeptidă de colistină. Nonapeptida de polimixină B are structura arătată mai jos:



în care sunt indicate pozițiile 2, 4 și 10 (cu referire la sistemul de numerotare utilizat pentru decapeptida de polimixină B), iar reziduurile de aminoacizi sunt în configurație L, cu excepția cazului în care este indicat.

Compușii din invenție sunt derivați de nonapeptidă de polimixină B, în care (i) gruparea amino de capăt N terminal, $-\text{NH}_2$, este înlocuită cu gruparea $-\text{NH-C(O)-CH}_2\text{CH(3-CI-Ph)CH}_2\text{NH}_2$ așa cum este descris aici; și (ii) reziduul de aminoacid din poziția 3 este substituit cu L-Dap.

Metode de sinteză

Prepararea compușilor din invenție va fi familiară persoanelor de specialitate în domeniu, în special, celor care au cunoștințe despre metodele descrise în WO 2015/135976 pentru prepararea nonapeptidelor de polimixină modificate. Metodele descrise în domeniu pot fi adaptate cu ușurință pentru utilizare în prepararea compușilor din prezentul caz, ținând cont de noile grupări de capăt N terminal folosite în prezentul caz.

În general, un compus din invenție poate fi preparat prin cuplarea unui intermediar de polimixină de nonapeptidă protejat corespunzător cu un acid carboxilic care are gruparea γ -aminopropil substituită. Produsul acestei reacții este de obicei forma protejată a compusului cu formula (II). Îndepărtarea grupărilor protectoare poate fi efectuată așa cum se dorește. Aceasta este strategia generală cunoscută din WO 2015/135976.

Un intermediar de nonapeptidă protejat corespunzător poate fi el însuși preparat în conformitate cu metodele prezentate în WO 2015/135976. Așa cum este descris aici, un intermediar de nonapeptidă protejat corespunzător poate fi preparat, de asemenea, prin sinteza în fază solidă a unei nonapeptide liniare, urmată de scindarea formei liniare din suportul solid și apoi ciclizarea ulterioară a acelei forme liniare între reziduurile amino din pozițiile 4 și 10.

Compușii din invenție pot fi obținuți prin sinteză convențională de peptide, utilizând metode cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu. Metode adecvate includ sinteza în fază solidă, așa cum este descrisă de către de Visser și colab., J. Peptide Res, 61, 2003, 298-306, Vaara și colab., Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 52, 2008, 3229-3236, sau de către Velkov și colab. ACS Chem. Biol. 9, 2014, 1172. Aceste metode includ o strategie de protecție adecvată și metode pentru etapa de ciclizare.

Atunci când este necesar, compusul cu formula (II) poate fi cel puțin parțial purificat, de exemplu pentru a separa formele diastereomerice ale produsului.

Forme protejate

Compuși cu formula (II) pot fi furnizați într-o formă protejată. Aici, funcționalitatea reactivă, cum ar fi funcționalitatea amino, poate fi mascată pentru a împiedica reacția sa în timpul unei etape de sinteză. Este furnizată o grupare protectoare pentru a masca funcționalitatea reactivă, și aceste grupări protectoare pot fi îndepărtate într-o etapă ulterioară a sintezei pentru a releva funcționalitatea reactivă inițială.

Într-o variantă de realizare, forma protejată este un compus în care funcționalitatea amino, hidroxil, tiol și/sau carboxil este protejată (mascată) de către o grupare protectoare. Într-o variantă de realizare, forma protejată este un compus în care funcționalitatea lanțului lateral al reziduurilor de aminoacizi cu compusul este protejată.

În compusul cu formula (II), reziduurile de aminoacizi din pozițiile 5, 8 și 9 sunt reziduuri Dab, și lanțul lateral al reziduurilor Dab include funcționalitatea amino. Funcționalitatea de aminoacizi a fiecărui reziduu Dab poate fi protejată cu o grupare protectoare pentru amino, așa cum este descris aici. În mod similar, reziduul de aminoacid din poziția 3 este Dap, și lanțul lateral al acestui reziduu de aminoacid include funcționalitatea amino.

Gruparea de capăt N terminal este o grupare γ -aminopropil substituită. Funcționalitatea amino poate fi protejată cu grupări protectoare pentru amino, așa cum este descris aici.

Grupări protectoare, cum ar fi cele pentru reziduurile de aminoacizi, sunt bine cunoscute și bine descrise în domeniu.

Sunt disponibili comercial aminoacizi care au protecție pentru grupurile laterale, opțional, împreună cu protecție pentru amino și carboxi. Astfel, un compus de polimixină protejat poate fi preparat din materii prime aminoacizi protejate în mod corespunzător.

Velkov și colab. descriu prepararea în etape a compușilor de polimixină pe fază solidă folosind aminoacid protejat corespunzător. Utilizarea formelor protejate de treonină și Dab este dezvoltată (vezi Informații Suplimentare).

Atunci când este utilizată o grupare protectoare, aceasta poate fi îndepărtată în condiții care nu perturbă substanțial structura nucleului de polimixină, de exemplu, în condiții care nu modifică stereochimia reziduurilor de aminoacizi.

Într-o variantă de realizare, grupările protectoare sunt labile la acid, labile la bază, sau pot fi îndepărtate în condiții reducătoare.

Exemple de grupări protectoare pentru funcționalitatea amino includ Boc (terț-butoxicarbonil), Bn (benzil, Bzl), CbZ (benziloxycarbonil, Z), 2-CI-Z (2-clor), ivDde (1-[4,4-dimetil-2,6-dioxocilcohex-1-iliden]-3-metilbutil), Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonil), HSOs-Fmoc (Fmoc sulfonilat, cum ar fi 2-sulfo-Fmoc, așa cum este descris în, de ex. Schechter și colab., J. Med. Chem. 2002, 45 (19) 4264), Dde (1-[4,4-dimetil-2,6-dioxocilcohex-1-iliden]etil), Mmt (4-metoxitritil), Mtt (4-metiltritol), Nvoc (6-nitroveratroiloxycarbonil), Tfa (trifluoroacetil) și Alloc (aliloxycarbonil).

Exemple de grupări protectoare pentru funcționalitatea azotului aromatic includ Boc, Mtt, Trt și Dnp (dinitrofenil).

Într-o variantă de realizare, gruparea protectoare pentru funcționalitatea amino este selectată dintre Boc, ivDde, CbZ, Bn și Fmoc și HSOs-Fmoc.

Într-o variantă de realizare, gruparea protectoare pentru funcționalitatea amino este Boc, ivDde, Fmoc sau CbZ, cum ar fi Boc, ivDde sau Cbz.

Protejarea cu Boc poate fi asigurată pentru funcționalitatea amino prezentă în lanțurile laterale ale reziduurilor de aminoacizi prezente în pozițiile 5, 8 și 9 și, opțional, în poziția 3.

Exemple de grupări protectoare pentru funcționalitatea hidroxil includ Trt (tritol), Bn (benzil) și tBu (terț-butil).

Într-o variantă de realizare, gruparea protectoare pentru funcționalitatea hidroxil este tBu.

Alte exemple de grupări protectoare includ grupări protectoare silil eter, cum ar fi TMS, TES, TBS, TIPS, TBDMS și TBDPS. Astfel de grupări protectoare sunt îndepărtate cu TBAF, de exemplu.

Exemple de grupări protectoare pentru funcționalitatea carboxil includ Bn (benzil, Bz), tBu (terț-butil), TMSET (trimetilsililet) și Dmab ({1-[4,4-dimetil-2,6-dioxocilcohex-1-iliden]-3-metilbutil} amino benzil).

Exemple de grupări protectoare pentru funcționalitatea azotului aromatic, de exemplu, în cazul în care o astfel de funcționalitate este prezentă în gruparea -Ar, includ Boc, Mtt, Trt și Dnp (dinitrofenil).

În unele variante de realizare, sunt protejate doar anumite tipuri de funcționalități. De exemplu, numai grupările amino pot fi protejate, cum ar fi grupările amino din lanțul lateral al unui reziduu de aminoacid.

Într-o variantă de realizare, grupările amino și grupările hidroxil sunt protejate.

LogP

Un compus cu formula (II) poate avea un coeficient de partiție, cum ar fi exprimat ca valoare LogP, în anumite limite. Coeficientul de partiție poate oferi o indicație a lipofilității compusului.

Inventatorii au stabilit că compușii care au o lipofilitate mai mare au o citotoxicitate mai slabă. Compușii din invenție au de obicei valori LogP care sunt asociate cu o citotoxicitate mai mică, cum ar fi valorile LogP descrise mai jos.

O valoare LogP pentru un compus poate fi determinată experimental (de ex., prin împărțirea compusului între octanol și apă), sau poate fi prezisă folosind metode standard de calcul.

De exemplu, o referire la LogP poate fi o referire la ALogP, care poate fi determinată folosind metodele descrise de Ghose și colab. J. Phys. Chem. A, 1998, 102, 3762-3772. Astfel, ALogP este estimarea contribuției grupului Ghose/Crippen pentru LogP.

Într-o variantă de realizare, un compus are o valoare LogP, cum ar fi o valoare ALogP, de cel puțin -6,5, cel puțin -6,6, cel puțin -6,7, cel puțin -6,8, cel puțin -6,9, cel puțin -7,0, cel puțin -7,5 sau cel puțin -8,0.

Într-o variantă de realizare, un compus are o valoare LogP, cum ar fi o valoare ALogP, de cel mult -6,4, cel mult -6,3, cel mult -6,2, cel mult -6,1, cel mult -6,0, cel mult -5,9 sau cel mult -5,8.

Într-o variantă de realizare, un compus are o valoare LogP într-un interval care are limite superioară și inferioară selectate în mod corespunzător între limitele date mai sus, de exemplu, în intervalul -5,8 până la -8,0, cum ar fi -6,0 până la -6,7, cum ar fi -6,3 până la -6,7. Aceste intervale pot fi selectate atunci când gruparea

-R² este alchil nesubstituit.

Într-o altă variantă de realizare, compusul are o valoare LogP în intervalul -6,7 până la -7,4. Acest interval poate fi selectat atunci când gruparea -R² este alchil substituit cu o grupare hidroxil.

Compuși care au valori LogP, cum ar fi valorile ALogP, în limitele discutate mai sus, s-au dovedit a avea o activitate excelentă, atât împotriva tulpinilor bacteriene sensibile la polimixină, cât și a celor rezistente la polimixină. Compușii pot avea activitate antimicrobiană comparabilă cu polimixina B. În mod avantajos, astfel de compuși pot avea, de asemenea, citotoxicitate redusă în comparație cu polimixina B.

Inventatorii prezentei au descoperit că un compus care are valori LogP optime poate fi obținut prin selectarea grupului -R¹⁵ din prezentul caz, împreună cu alegeri adecvate de reziduuri de aminoacizi în pozițiile 6 și/sau 7 (cum ar fi, cu selectarea corespunzătoare a -R¹ și/sau -R²).

Agent activ

Compușii cu formula (II) pot fi utilizați fiecare împreună cu un al doilea agent activ. Inventatorii au descoperit că astfel de combinații au o activitate biologică mai mare decât ar fi de așteptat din activitatea individuală a ambilor compuși. Compușii cu formula (II) pot fi utilizați pentru a potența activitatea celui de-al doilea agent activ. În particular, compușii cu formula (II) pot fi utilizați împreună cu un al doilea agent activ pentru a spori activitatea antimicrobiană a celui agent, de exemplu, împotriva bacteriilor Gram-negative.

Fără a dori să fie legat de teorie, se crede că compușii cu formula (II) acționează asupra membranei exterioare a unei celule, de ex., o celulă bacteriană Gram-negativă, pentru a facilita absorbția celui de-al doilea agent activ în acea celulă. Astfel, agenții care altfel sunt incapabili sau slabi la traversarea membranei exterioare pot fi absorbiți într-o celulă țintă prin acțiunea compușilor cu formula (II).

Într-o variantă de realizare, combinația unui compus cu formula (II) cu al doilea agent activ este activă împotriva bacteriilor Gram-negative. Aici, nu este esențial ca, individual, oricare dintre compusul cu formula (II) sau al doilea agent activ să aibă activitate împotriva bacteriilor Gram-negative.

Într-o variantă de realizare, al doilea agent activ este un agent care are o valoare MIC măsurată împotriva unui microorganism particular, cum ar fi o bacterie, care este mai mică decât 10, mai mică decât 5 sau mai mică decât 1 microgram/ml. Microorganismul poate fi o bacterie Gram-negativă, cum ar fi o bacterie Gram-negativă selectată din grupul constând din *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*; *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa* și *Stenotrophomonas maltophilia*.

Exemple de al doilea agent activ care are activitate împotriva bacteriilor Gram-negative includ beta-lactame, tetraceline, aminoglicozide și chinolone.

Într-o variantă de realizare, al doilea agent activ este un agent care are o valoare MIC măsurată împotriva unui microorganism particular, cum ar fi o bacterie Gram-negativă, adică mai mare decât 4, mai mare decât 8, mai mare decât 16 sau mai mare decât 32 micrograme/ml. În această variantă de realizare, al doilea agent activ poate fi activ împotriva bacteriilor Gram-pozitive. De exemplu, al doilea agent activ este un agent care are o valoare MIC măsurată împotriva unei anumite bacterii Gram-pozitive care este mai mică decât 10, mai mică de 5 sau mai mică decât 1 microgram/ml. Aici, compusul cu formula (II) acționează pentru a facilita absorbția celui de-al doilea agent activ în celula bacteriană Gram-negativă. Cel de-al doilea agent activ este, prin urmare, capabil să acționeze asupra unei ținte în interiorul celulei bacteriene Gram-negative, ținta care poate fi aceeași cu ținta celui de-al doilea agent activ într-o celulă bacteriană Gram-pozitivă.

Bacteriile Gram-pozitive pot fi selectate din grupul constând din bacterii *Staphylococcus* și *Streptococcus*, cum ar fi *S. aureus* (incluzând MRSA), *S. epidermis*, *E. faecalis* și *E. faecium*.

Exemple de al doilea agent activ care au activitate împotriva bacteriilor Gram-pozitive (la valorile MIC date mai sus, de exemplu) și activitate moderată împotriva bacteriilor Gram-negative, includ rifampicină, novobiocină, macrolide, pleuromutiline. Într-o variantă de realizare, un compus care are activitate moderată împotriva bacteriilor Gram-negative poate avea o valoare MIC măsurată împotriva unei bacterii Gram-negative care este mai mică decât 32, mai mică decât 64 sau mai mică decât 128 micrograme/ml.

De asemenea, sunt adecvați pentru utilizare agenți care au activitate împotriva bacteriilor Gram-pozitive și care sunt în principal inactivi împotriva bacteriilor Gram-negative. Exemple includ acid fusidic, oxazolidinone (de ex., linezolid), glicopeptide (de ex., vancomicină), daptomicină și lantibiotice. Într-o variantă de realizare, un compus care, în principal, nu are activitate împotriva bacteriilor Gram-negative poate avea o valoare MIC măsurată în raport cu cea a unei bacterii Gram-negative care este mai mare decât 32, mai mare decât 64, mai mare decât 128, mai mare decât 256 micrograme/ml.

În circumstanțe normale, astfel de agenți nu sunt neapărat adecvați pentru utilizare împotriva bacteriilor Gram-negative din cauza capacității lor relativ slabe de a traversa membrana exterioară a unei celule bacteriene Gram-negative. Așa cum a fost explicat mai sus, atunci când sunt utilizați împreună cu un compus cu formula (II), astfel de agenți sunt adecvați pentru utilizare.

5 Într-o variantă de realizare, agentul activ poate fi selectat din grupul constând din rifampicină (rifampină), rifabutină, rifalazil, rifapentină, rifaximină, aztreonam, oxacilină, novobiocină, acid fusidic, azitromicină, ciprofloxacina, meropenem, tigeciclină, minociclină, eritromicină, claritromicină și mupirocină, și săruri, solvați și forme de promedicament acceptabile farmaceutic ale acestora.

10 Inventatorii prezentei au descoperit că compușii de polimixină cu formula (II) pot fi utilizați împreună cu anumiți compuși din familia rifamicinei pentru a trata infecțiile microbiene. Familia rifamicinei include izolate rifamicină A, B, C, D, E, S și SV și versiuni derivate sintetic ale acestor compuși, cum ar fi rifampicină (rifampină), rifabutină, rifalazil, rifapentină, și rifaximină, și săruri și solvați acceptabile farmaceutic ale acestora.

15 Într-o variantă de realizare, agentul activ este rifampicină (rifampină) și sărurile, solvații și forme de promedicament acceptabile farmaceutic ale acesteia.

Săruri, solvați și alte forme

20 Exemple de săruri ale compusului cu formula (II) includ toate sărurile acceptabile farmaceutic, cum ar fi, fără limitare, săruri de adădire acidă ale acizilor minerali puternici, cum ar fi săruri de HCl și HBr, și săruri de adădire ale acizilor organici puternici, cum ar fi o sare de acid metansulfonic. Alte exemple de săruri includ sulfați și acetati, cum ar fi acetat în sine, trifluoracetat sau tricloracetat.

Într-o variantă de realizare, compușii din prezenta dezvoltare sunt furnizați sub forma unei sări sulfat sau a unei sări a acidului trifluoroacetic (TFA). Într-o variantă de realizare, compușii din prezenta dezvoltare sunt furnizați sub formă de săruri acetat, cum ar fi acetat.

25 Un compus cu formula (II) poate fi formulat, de asemenea, sub forma unui promedicament. Promedicamentele pot include un compus antibacterian descris aici, în care una sau mai multe grupări amino sunt protejate cu o grupare care poate fi scindată *in vivo*, pentru a elibera compusul biologic activ. Într-o variantă de realizare, promedicamentul este un "promedicament amină". Exemple de promedicamente amine includ sulfometil, așa cum este descris în, *de ex.*, Bergen și colab., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 2006, 50, 1953 sau HSO₃-FMOC, așa cum este descris în *de ex.* Schechter și colab., *J. Med. Chem.* 2002, 45(19) 4264, și săruri ale acestuia. Alte exemple de promedicamente amine sunt date de către Krise și Oliyai în *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*, 2007, 5(2), 101-131.

30 Într-o variantă de realizare, un compus cu formula (II) este furnizat sub forma unui promedicament.

35 O referire la un compus cu formula (II), sau la orice alt compus descris aici, este, de asemenea, o referire la un solvat al aceluși compus. Exemple de solvați includ hidrați.

40 Un compus cu formula (II), sau orice alt compus descris aici, include un compus în care un atom este înlocuit cu un izotop existent în mod natural sau care nu este natural. Într-o variantă de realizare, izotopul este un izotop stabil. Astfel, un compus descris aici include, de exemplu, compuși care conțin deuteriu și altele asemenea. De exemplu, H poate fi în orice formă izotopică, incluzând ¹H, ²H (D) și ³H (T); C poate fi în orice formă izotopică, incluzând ¹²C, ¹³C, și ¹⁴C; O poate fi în orice formă izotopică, incluzând ¹⁶O și ¹⁸O; și altele asemenea.

45 Anumiți compuși cu formula (II) sau orice alt compus descris aici, pot exista în una sau mai multe forme particulare geometrice, optice, enantiomerice, diasteriomere, epimere, atropice, stereoizomerice, tautomerice, conformaționale sau anomere, incluzând, dar fără limitare la, forme cis și trans; forme E și Z; forme c-, t- și r-; forme endo- și exo-; forme R-, S- și mezo-; forme D- și L-; forme d- și l-; forme (+) și (-); forme ceto-, enol- și enolat; forme syn- și anti-; forme sinclinale și anticlinale; formele α și β; forme axiale și ecuatoriale; forme de barcă, scaun, răsucite, plic și jumătate de scaun; și combinații ale acestora, denumite în continuare în mod colectiv „izomeri” (sau „forme izomerice”).

50 Este de reținut că, cu excepția celor discutate mai jos pentru formele tautomerice, sunt excluși în mod specific din termenul "izomeri", așa cum este utilizat aici, izomerii structurali (sau constituționali) (adică izomerii care diferă în ceea ce privește conexiunile dintre atomi și nu doar prin poziția atomilor în spațiu). De exemplu, o referire la o grupare metoxi, -OCH₃, nu trebuie interpretată ca o referire la izomerul său structural, o grupare hidroximetil, -CH₂OH. În mod similar, o referire la orto-clorfenil nu trebuie interpretată ca o referire la izomerul său structural, meta-clorfenil. Cu toate acestea, o referire la o clasă de structuri poate include foarte bine forme izomerice structural care se încadrează în acea clasă (de ex., C₁₋₆alchil include n-propil și izo-propil; butil include n-, izo-, sec- și terț-butil; metoxifenil include orto-, meta- și para-metoxifenil).

Cu excepția cazului în care se specifică altfel, o referire la un anumit compus include toate astfel de forme izomerice, incluzând amestecuri (de ex., amestecuri racemice) ale acestora. Metode de preparare (de ex., sinteză asimetrică) și separare (de ex., mijloace de cristalizare fracționată, și cromatografice) a unor astfel de forme izomerice sunt, fie cunoscute în domeniu, fie sunt ușor obținute prin adaptarea într-

5

un mod cunoscut a metodelor prezentate aici sau a metodelor cunoscute.

Un aspect al prezentei invenții se referă la compuși în formă substanțial purificată și/sau într-o formă substanțial lipsită de contaminanți.

Într-o variantă de realizare, forma substanțial purificată are cel puțin 50% în greutate, de exemplu, cel puțin 60% în greutate, de exemplu, cel puțin 70% în greutate, de exemplu, cel puțin 80% în greutate, de exemplu, cel puțin 90% în greutate, de exemplu, cel puțin 95% în greutate, de exemplu, cel puțin 97% în greutate, de exemplu, cel puțin 98% în greutate, de exemplu, cel puțin 99% în greutate.

10

Cu excepția cazului în care este specificat, forma substanțial purificată se referă la compus în orice formă stereoisomerică sau enantiomerică. De exemplu, într-o variantă de realizare, forma substanțial purificată se referă la un amestec de stereoisomeri, adică, purificat în ceea ce privește alți compuși. Într-o variantă de realizare, forma substanțial purificată se referă la un stereoisomer, de exemplu, stereoisomer optic pur. Într-o variantă de realizare, forma substanțial purificată se referă la un amestec de enantiomeri. Într-o variantă de realizare, forma substanțial purificată se referă la un amestec echimolar de enantiomeri (adică, un amestec racemic, un racemat). Într-o variantă de realizare, forma substanțial purificată se referă la un enantiomer, de exemplu, enantiomer optic pur.

15

Într-o variantă de realizare, contaminanții reprezintă cel mult 50% în greutate, de exemplu, nu mai mult decât 40% în greutate, de exemplu, nu mai mult decât 30% în greutate, de exemplu, nu mai mult decât 20% în greutate, de exemplu, nu mai mult decât 10% în greutate, de exemplu, nu mai mult decât 5% în greutate, de exemplu, nu mai mult decât 3% în greutate, de exemplu, nu mai mult decât 2% în greutate, de exemplu, nu mai mult decât 1% în greutate.

20

Cu excepția cazului în care este specificat, contaminanții se referă la alți compuși, adică alții decât stereoisomerii sau enantiomerii. Într-o variantă de realizare, contaminanții se referă la alți compuși și alți stereoisomeri. Într-o variantă de realizare, contaminanții se referă la alți compuși și la celălalt enantiomer.

25

Într-o variantă de realizare, forma substanțial purificată este optic pură cel puțin 60% (adică, 60% din compus, pe o bază molară, este stereoisomerul sau enantiomerul dorit și 40% este stereoisomerul sau enantiomerul nedorit), de exemplu, cel puțin 70% optic pură, de exemplu, cel puțin 80% optic pură, de exemplu, cel puțin 90% optic pură, de exemplu, cel puțin 95% optic pură, de exemplu, cel puțin 97% optic pură, de exemplu, cel puțin 98% optic pură, de exemplu, cel puțin 99% optic pură.

30

35 **Metode de tratament**

Compușii cu formula (II) sau formulările farmaceutice care conțin acești compuși sunt adecvate pentru utilizare în metode de tratament și profilaxie. Compușii pot fi administrați unui subiect care are nevoie de aceștia. Compușii sunt adecvați pentru utilizare împreună cu un agent activ ("un al doilea agent activ"), de exemplu, un al doilea agent activ care este un agent antimicrobian.

35

Compușii cu formula (II) sunt utilizați într-o metodă de tratament a corpului uman sau animal prin terapie. În unele aspecte ale invenției, un compus cu formula (II) poate fi administrat unui subiect mamifer, cum ar fi un om, pentru a trata o infecție microbiană.

40

Termenul "infecție microbiană" se referă la invadarea animalului gazdă de către microbi patogeni. Aceasta include creșterea excesivă a microbilor care sunt prezenți în mod normal în sau pe corpul unui animal. Mai general, o infecție microbiană poate fi orice situație în care prezența unei populații microbiene este dăunătoare unui animal gazdă. Astfel, un animal „suferă” de o infecție microbiană atunci când un număr excesiv de populație microbiană este prezent în sau pe corpul unui animal, sau când prezența unei populații microbiene afectează celulele sau alt țesut al unui animal.

45

Compușii pot fi utilizați pentru a trata un subiect care are o infecție microbiană, sau care are risc de infecție cu un microorganism, cum ar fi o bacterie.

50

Infecția microbiană poate fi o infecție bacteriană, cum ar fi o infecție bacteriană Gram-negativă.

Exemple de bacterii Gram-negative includ, dar nu se limitează la, *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., și alte Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas* și *Legionella*, și multe altele.

55

Bacilii Gram negativi relevanți din punct de vedere medical includ o multitudine de specii. Unele dintre ele cauzează, în primul rând, probleme respiratorii (*Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*), în primul rând probleme urinare

(*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*), și în primul rând probleme gastrointestinale (*Salmonella enterica*).

Bacterii Gram-negative asociate cu infecții nosocomiale includ *Acinetobacter baumannii*, care provoacă bacteriemie, meningită secundară și pneumonie asociată cu ventilator în unitățile de terapie intensivă din unitățile spitalicești.

Într-o variantă de realizare, specia bacteriană Gram-negativă este selectată din grupul constând din *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*; *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*, și *Stenotrophomonas maltophilia*.

Într-o variantă de realizare, specia bacteriană Gram-negativă este selectată din grupul constând din *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, și *A. baumannii*.

Compușii cu formula (II) sau compozițiile care îi cuprind sunt utile pentru tratamentul infecțiilor cutanate și al țesuturilor moi, infecțiilor gastrointestinale, infecțiilor tractului urinar, pneumoniei, sepsisului, infecțiilor intra-abdominale și al infecțiilor obstetrico/ginecologice. Infecțiile pot fi infecții cu bacterii Gram-negative.

Compușii cu formula (II) sau compozițiile care îi cuprind sunt utili pentru tratamentul infecțiilor cu *Pseudomonas*, incluzând infecții cu *P. aeruginosa*, de exemplu, infecții ale pielii și ale țesuturilor moi, infecții gastrointestinale, infecții ale tractului urinar, pneumonie și sepsis.

Compușii cu formula (II) sau compozițiile care îi cuprind sunt utile pentru tratamentul infecțiilor cu *Acinetobacter*, incluzând infecție cu *A. baumannii*, pentru pneumonie, infecții ale plăgilor, infecții ale tractului urinar, și sepsis.

Compușii cu formula (II) sau compozițiile care îi cuprind sunt utile pentru tratamentul infecției cu *Klebsiella*, incluzând infecția cu *K. pneumoniae*, pentru pneumonie, infecție intra-abdominală, infecție a tractului urinar, meningită și sepsis.

Compușii cu formula (II) sau compozițiile care îi cuprind sunt utile pentru tratamentul infecției cu *E. coli*, incluzând infecții cu *E. coli*, pentru bacteriemie, colecistită, colangită, infecție intra-abdominală, infecție urinară, meningită neonatală și pneumonie.

Compușii cu formula (II) sau compozițiile care îi cuprind pot fi utilizate împreună cu un agent activ în metode de tratament.

Agentul activ poate fi un agent care are activitate împotriva microorganismului. Agentul activ poate fi activ împotriva bacteriilor Gram-negative. Agentul activ poate fi activ împotriva unui microorganism selectat din lista de mai sus.

Într-o variantă de realizare, al doilea agent activ are o valoare MIC de 10 micrograme/ml sau mai mică împotriva unui microorganism, cum ar fi *E. coli*, în absența compusului cu formula (II). Microorganismul poate fi un microorganism selectat din grupul de mai sus.

Compuși specifici pentru utilizare ca al doilea agent activ sunt descriși aici și includ: rifampicină, rifabutină, rifalazil, rifapentină și rifaximină; oxacilină, meticilină, ampicilină, cloxacilină, carbenicilină, piperacilină, tricarcilină, flucloxacilină, și nafcilină;

azitromicină, claritromicină, eritromicină, telitromicină, cetroamicină, și solitromicină; aztreonam și BAL30072;

meropenem, doripenem, imipenem, ertapenem, biapenem, tomopenem, și panipenem; tigeciclină, omadacilină, eravacilină, doxiciclină, și minociclină;

ciprofloxacină, levofloxacină, moxifloxacină, și delafloxacină;

acid fusidic;

novobiocină;

teicoplanină, telavancin, dalbavancin, și oritavancin,

și săruri și solvați acceptabile farmaceutic ale acestora;

Într-o variantă de realizare, sunt descriși aici compuși specifici pentru utilizare ca al doilea agent activ, și includ rifampicină (rifampină), rifabutină, rifalazil, rifapentină, rifaximină, aztreonam, oxacilină, novobiocină, acid fusidic, azitromicină, ciprofloxacină, meropenem, tigeciclină, eritromicină, claritromicină și mupirocină, și săruri și solvați acceptabile farmaceutic ale acestora.

Într-un aspect alternativ, compușii cu formula (II) sunt adecvați pentru utilizare în tratamentul infecțiilor fungice, de exemplu, în combinație împreună cu un agent antifungic. Agentul antifungic poate fi selectat dintre un antifungic polienic, de exemplu, amfotericină B, un antifungic imidazol, triazol sau tiazol, de exemplu, miconazol, fluconazol sau abafungin, o alilamină, o echinocandină, sau alt agent, de exemplu, ciclopirox.

Tratament

Termenul „tratament”, așa cum este utilizat aici în contextul tratării unei afecțiuni, se referă, în general, la tratament și terapie, indiferent dacă este vorba despre un om sau un animal (de ex., în aplicații veterinare), în care se obține un anumit efect terapeutic dorit, de exemplu, inhibarea progresului afecțiunii, și include o reducere a ratei de progres, o oprire a ratei de progres, atenuarea simptomelor afecțiunii, ameliorarea afecțiunii și vindecarea afecțiunii. Tratamentul ca o măsură profilactică (adică, profilaxie), de asemenea, este inclus. De exemplu, utilizarea la pacienți care nu au dezvoltat încă afecțiunea, dar care prezintă riscul de a dezvolta afecțiunea, este cuprinsă de termenul „tratament”.

Termenul „cantitate eficientă terapeutic”, așa cum este utilizat aici, se referă la acea cantitate de un compus, sau de un material, compoziție sau formă de dozare care cuprinde un compus, care este eficientă pentru producerea unui efect terapeutic dorit, proporțional cu un raport beneficiu/risc rezonabil, atunci când este administrat în conformitate cu un regim de tratament dorit.

Termenul "tratament" include tratamente și terapii combinate, așa cum este descris aici, în care două sau mai multe tratamente sau terapii sunt combinate, de exemplu, succesiv sau simultan.

Terapie combinată

Un compus cu formula (II) poate fi administrat împreună cu un agent activ. Administrarea poate fi simultană, separată sau succesivă.

Metodele și modul de administrare vor depinde de farmacocinetica compusului cu formula (II) și a celui de-al doilea agent activ.

Prin administrare "simultană", se înțelege că un compus cu formula (II) și un al doilea agent activ sunt administrați unui subiect într-o singură doză prin aceeași cale de administrare.

Prin administrare „separată”, se înțelege că un compus cu formula (II) și un al doilea agent activ sunt administrate unui subiect prin două căi diferite de administrare, având loc în același timp. Acest lucru poate să aibă loc, de exemplu, atunci când un agent este administrat prin perfuzie, iar celălalt este administrat oral în timpul perfuziei.

Prin „succesiv” se înțelege că cei doi agenți sunt administrați la momente de timp diferite, cu condiția ca activitatea primului agent administrat să fie prezentă și continuă în subiect la momentul administrării celui de-al doilea agent activ.

În general, va exista o doză succesivă astfel încât al doilea dintre cei doi agenți să fie administrat în 48 de ore, cum ar fi în 24 de ore, cum ar fi în 12, 6, 4, 2 sau 1 oră (ore) de la primul agent. Ca alternativă, agentul activ poate fi administrat primul, urmat de compusul cu formula (II).

În cele din urmă, ordinea și momentul administrării compusului și a celui de-al doilea agent activ în tratamentul combinat vor depinde de proprietățile farmacocinetice ale fiecăruia.

Cantitatea de compus cu formula (II) care urmează să fie administrată unui subiect va depinde în cele din urmă de natura subiectului și de boala care trebuie tratată. De asemenea, cantitatea de agent activ care urmează să fie administrată unui subiect va depinde în cele din urmă de natura subiectului și de boala care trebuie tratată.

Formulări

Într-un aspect, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus cu formula (II) împreună cu un purtător acceptabil farmaceutic. Compoziția farmaceutică poate cuprinde suplimentar un al doilea agent activ. Într-o variantă de realizare alternativă, în care un al doilea agent activ este furnizat pentru utilizare în terapie, al doilea agent activ poate fi formulat separat de compusul cu formula (II). Comentariile de mai jos făcute în legătură cu compusul cu formula (II) se pot aplica, prin urmare, și celui de-al doilea agent activ, așa cum este formulat separat.

Deși este posibil ca compusul cu formula (II) să fie administrat singur sau împreună cu al doilea agent activ, este de dorit să se prezinte ca o formulare farmaceutică (de ex., compoziție, preparat, medicament) care cuprinde cel puțin un compus cu formula (II), așa cum este descris aici, împreună cu unul sau mai multe alte ingrediente acceptabile farmaceutic bine cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu, incluzând, dar fără limitare la, purtători, diluanți, excipienți, adjuvanți, materiale de umplutură, tampoane, conservanți, anti-oxidanți, lubrifianți, stabilizatori, agenți de solubilizare, agenți tensioactivi (de ex., agenți de umectare), agenți de mascare, agenți de colorare, agenți de aromatizare și agenți de îndulcire, acceptabile farmaceutic. Formularea poate cuprinde în plus alți agenți activi, de exemplu, alți agenți terapeutici sau profilactici.

Astfel, prezenta invenție furnizează în plus compoziții farmaceutice, așa cum a fost definit mai sus. De asemenea, aici sunt descrise metode de obținere a unei compoziții farmaceutice, care cuprinde amestecarea a cel puțin unui compus cu formula (II), așa cum este descris aici, împreună cu unul sau mai

multe alte ingrediente acceptabile farmaceutic bine cunoscute persoanelor de specialitate în domeniu, de exemplu, purtători, diluanți, excipienți, etc. Dacă sunt formulate ca unități discrete (de ex., tablete, etc.), fiecare unitate conține o cantitate predeterminată (doză) de compus. Compoziția conține în mod opțional al doilea agent activ într-o cantitate predeterminată.

5 Termenul „acceptabil farmaceutic”, așa cum este utilizat aici, se referă la compuși, ingrediente, materiale, compoziții, forme de dozare etc., care sunt, în sfera de întindere a judecății medicale solide, adecvate pentru utilizare în contact cu țesuturile subiectului aflat în discuție (de ex., om), fără toxicitate excesivă, iritație, răspuns alergic sau altă problemă sau complicație, în mod proporțional cu un raport rezonabil beneficiu/risc. Fiecare purtător, diluant, excipient etc., de asemenea, trebuie să fie „acceptabil”
10 în sensul de a fi compatibil cu celelalte ingrediente ale formulării.

Purtători, diluanți, excipienți etc. adecvați pot fi găsiți în textele farmaceutice standard, de exemplu, Remington's Pharmaceutical Sciences, ediția a 18-a, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; și în Manual de excipienți farmaceutici, ediția a 5-a, 2005.

15 Formulările pot fi preparate prin orice metodă bine cunoscută în domeniul farmaciei. Astfel de metode includ etapa de asociere a compusului cu formula (II) cu un purtător, care constituie unul sau mai multe ingrediente accesorii. În general, formulările sunt preparate prin asociere uniformă și intimă a compusului cu purtători (de ex., purtători lichizi, purtători solizi fin divizați, etc.), și apoi modelarea produsului, dacă este necesar.

20 Formularea poate fi preparată pentru a asigura o eliberare rapidă sau lentă; eliberare imediată, întârziată, programată sau susținută; sau o combinație a acestora.

25 Formulările pot să fie, în mod adecvat, sub formă de lichide, soluții (de ex., apoase, neapoase), suspensii (de ex., apoase, neapoase), emulsii (de ex., ulei în apă, apă în ulei), elixiruri, siropuri, electuare, apă de gură, picături, tablete (incluzând, de exemplu, tablete acoperite), granule, pulberi, comprimate, pastile, capsule (incluzând, de exemplu, capsule gelatinoase tari și moi), cașete, pilule, fiole, bolusuri, supozitoare, ovule, tincturi, geluri, paste, unguente, creme, loțiuni, uleiuri, spume, spray-uri, aburi sau aerosoli.

30 Formulările pot fi furnizate în mod adecvat sub formă de platură, platură adeziv, bandaj, pansament sau altele asemenea, care sunt impregnate cu unul sau mai mulți compuși și, opțional, cu unul sau mai multe alte ingrediente acceptabile farmaceutic, incluzând, de exemplu, agenți de penetrare, de permeație și amplificatori de absorbție. Formulările pot fi furnizate, de asemenea, în mod adecvat sub formă de depozit sau rezervor.

35 Compusul poate fi dizolvat în, suspendat sau amestecat cu, unul sau mai multe alte ingrediente acceptabile farmaceutic. Compusul poate fi prezentat într-un lipozom sau în alte microparticule care sunt concepute pentru a ținti compusul, de exemplu, către componentele sanguine sau către unul sau mai multe organe. Atunci când este utilizat un lipozom, se observă că lipozomul poate conține, atât compusul cu formula (II), cât și un al doilea agent activ.

40 Formulări adecvate pentru administrare orală (de ex., prin ingestie) includ lichide, soluții (de ex., apoase, neapoase), suspensii (de ex., apoase, neapoase), emulsii (de ex., ulei în apă, apă în ulei), elixiruri, siropuri, electuare, tablete, granule, pulberi, capsule, cașete, pilule, fiole, bolusuri.

45 Formulări adecvate pentru administrare bucală includ apă de gură, comprimate, pastile, precum și plasturi, plasturi adezivi, depozite și rezervoare. Comprimatele cuprind, în mod obișnuit, compusul într-o bază aromatizată, de obicei, zaharoză și salcâm sau tragacant. Pastilele cuprind, în mod obișnuit, compusul într-o matrice inertă, cum ar fi gelatină și glicerină, sau zaharoză și salcâm. Apa de gură cuprinde, în mod obișnuit, compusul într-un purtător lichid adecvat.

50 Formulări adecvate pentru administrare sublinguală includ tablete, comprimate, pastile, capsule și pilule.

Formulări adecvate pentru administrare orală transmucozală includ lichide, soluții (de ex., apoase, neapoase), suspensii (de ex., apoase, neapoase), emulsii (de ex., ulei în apă, apă în ulei), apă de gură, comprimate, pastile, precum și plasturi, plasturi adezivi, depozite și rezervoare.

55 Formulări adecvate pentru administrare transmucozală care nu este orală includ lichide, soluții (de ex., apoase, neapoase), suspensii (de ex., apoase, neapoase), emulsii (de ex., ulei în apă, apă în ulei), supozitoare, ovule, geluri, paste, unguente, creme, loțiuni, uleiuri, precum și plasturi, plasturi adezivi, depozite și rezervoare.

Formulări adecvate pentru administrare transdermică includ geluri, paste, unguente, creme, loțiuni și uleiuri, precum și plasturi, plasturi adezivi, bandaje, pansamente, depozite și rezervoare.

Tabletele pot fi realizate prin mijloace convenționale, de exemplu, comprimare sau turnare, opțional, cu unul sau mai multe ingrediente accesorii. Tablete comprimate pot fi preparate prin comprimare într-o mașină adecvată a compusului într-o formă care curge liber, cum ar fi o pulbere sau

granule, amestecate opțional cu unul sau mai mulți lianți (de ex., povidonă, gelatină, acacia, sorbitol, tragacant, hidroxipropilmetil celuloză); materiale de umplutură sau diluanți (de ex., lactoză, celuloză microcristalină, fosfat acid de calciu); lubrifianți (de ex., stearat de magneziu, talc, silice); agenți de dezintegrare (de ex., amidon glicolat de sodiu, povidonă reticulată, carboximetil celuloză de sodiu reticulată); agenți tensioactivi sau de dispersare sau de umețare (de ex., lauril sulfat de sodiu); conservanți (de ex., p-hidroxibenzoat de metil, p-hidroxibenzoat de propil, acid sorbic); arome, agenți de îmbunătățire a aromei și îndulcitori. Tabletele turnate pot fi realizate prin turnarea într-o mașină adecvată a unui amestec de compus sub formă de pulbere umezit cu un diluant lichid inert. Tabletele pot fi opțional acoperite sau marcate, și pot fi formulate astfel încât să asigure eliberarea lentă sau controlată a compusului din acestea utilizând, de exemplu, hidroxipropilmetil celuloză în proporții variabile pentru a furniza profilul de eliberare dorit.

Tabletele pot fi prevăzute opțional cu o acoperire, de exemplu, pentru a afecta eliberarea, de exemplu, o acoperire enterică, pentru a asigura eliberarea în părți ale intestinului, altele decât stomacul.

Unguentele sunt preparate de obicei din compus și dintr-o bază de unguent parafinică sau miscibilă cu apă.

Cremele sunt preparate de obicei din compus și o bază de cremă ulei în apă. Dacă se dorește, faza apoasă a bazei cremei poate include, de exemplu, cel puțin aproximativ 30% g/g de alcool polihidroxilic, adică un alcool care are două sau mai multe grupări hidroxil, cum ar fi propilenglicol, butan-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol și polietilenglicol, și amestecuri ale acestora. Formulările topice pot include în mod dorit un compus care amplifică absorbția sau penetrarea compusului prin piele sau prin alte zone afectate. Exemple de astfel de amplificatori de penetrare dermică includ dimetilsulfoxid și analogi înrudiți.

Emulsiile sunt preparate, în mod obișnuit, din compus și o fază uleioasă, care poate cuprinde opțional doar un emulgator (cunoscut altfel ca emulsionant), sau poate cuprinde un amestec de cel puțin un emulgator cu o grăsime sau un ulei, sau, atât cu o grăsime, cât și cu un ulei. Un emulgator hidrofil poate fi inclus împreună cu un emulgator lipofil care acționează ca un stabilizator. De asemenea, este posibil să se includă, atât un ulei, cât și o grăsime. Împreună, emulgatorii cu sau fără stabilizator (stabilizatori) formează așa-numita ceară emulsionantă, iar ceara împreună cu uleiul și/sau grăsimea formează așa-numita bază de unguent emulgator care formează faza uleioasă dispersată a formulărilor de cremă.

Emulsionanții și stabilizatorii de emulsie adecvați includ Tween 60, Span 80, alcool cetostearilic, alcool miristil, monostearat de gliceril și lauril sulfat de sodiu. Alegerea uleiurilor sau grăsimilor adecvate pentru formulare se bazează pe obținerea proprietăților cosmetice dorite, deoarece solubilitatea compusului în majoritatea uleiurilor care pot fi utilizate în formulările de emulsii farmaceutice poate fi foarte scăzută. Astfel, crema ar trebui să fie un produs care nu este gras, care nu pătează și lavabil, cu consistență adecvată pentru a evita scurgerea din tuburi sau alte recipiente. Pot fi utilizați esteri alchilici mono- sau dibazici cu lanț liniar sau ramificat, cum ar fi di-izoadipat, izocetil stearat, diester de propilenglicol al acizilor grași de cocos, miristat de izopropil, decil oleat, izopropil palmitat, butil stearat, 2-etilhexil palmitat, sau un amestec de esteri cu lanț ramificat cunoscuți cu denumirea de Crodamol CAP. Acestea pot fi utilizate singure sau în combinație, în funcție de proprietățile necesare. Ca alternativă, pot fi utilizate lipide cu punct de topire mare, cum ar fi parafină albă moale și/sau parafină lichidă, sau alte uleiuri minerale.

Formulări adecvate pentru administrare intranasală, în care purtătorul este un lichid, includ, de exemplu, spray nazal, picături nazale, sau pentru administrare de aerosoli prin nebulizator, includ soluții apoase sau uleioase de compus. Ca o metodă alternativă de administrare, o pulbere uscată pentru administrare poate fi utilizată ca alternativă la aerosoli nebulizați.

Formulări adecvate pentru administrare intranasală, în care purtătorul este un solid, le includ, de exemplu, pe cele prezentate sub forma unei pulberi grosiere care are o dimensiune a particulei, de exemplu, în intervalul de la aproximativ 20 până la aproximativ 500 microni, care este administrată în modul în care este prizat tutunul, adică prin inhalare rapidă prin orificiul nazal dintr-un recipient cu pulbere ținut aproape de nas.

Formulări adecvate pentru administrare pulmonară (de ex., prin terapie prin inhalare sau insuflare) le includ pe cele prezentate sub forma unui spray de aerosoli dintr-un ambalaj presurizat, cu utilizarea unui propulsor adecvat, cum ar fi diclorodifluorometan, triclorfluorometan, diclorotetrafluoretan, dioxid de carbon sau alte gaze adecvate. Suplimentar sau ca alternativă, o formulare pentru administrare pulmonară poate fi formulată pentru administrare dintr-un nebulizator sau dintr-un inhalator de pulbere uscată. De exemplu, formularea poate fi furnizată cu purtători sau lipozomi pentru a asigura o dimensiune adecvată a particulelor pentru a ajunge la părțile corespunzătoare ale plămânului, pentru a ajuta la eliberarea unei substanțe adecvate pentru a spori reținerea în țesutul pulmonar.

Formulări adecvate pentru administrare oculară includ picături pentru ochi în care compusul este dizolvat sau suspendat într-un purtător adecvat, în special, un solvent apos pentru compus.

Formulări adecvate pentru administrare rectală pot fi prezentate sub forma unui supozitor cu o bază adecvată care cuprinde, de exemplu, uleiuri naturale sau întărite, ceară, grăsimi, polioli semi-lichizi sau lichizi, de exemplu, unt de cacao sau un salicilat; sau sub forma unei soluții sau suspensii pentru tratament prin clismă.

Formulări adecvate pentru administrare vaginală pot fi prezentate sub formă de ovule, tampoane, creme, geluri, paste, spume sau formulări spray care conțin în plus față de compus, astfel de purtători care sunt cunoscuți în domeniu ca fiind adecvați.

Formulări adecvate pentru administrare parenterală (de ex., pentru exemplu, prin injecție sau perfuzie, intravenoasă sau subcutanată), includ lichide apoase sau neapoase, izotonice, aprotogene, sterile (de ex., soluții, suspensii), în care compusul este dizolvat, suspendat sau este furnizat în alt mod (de ex., într-un lipozom sau alte microparticule). Astfel de lichide pot conține în plus alte ingrediente acceptabile farmaceutic, cum ar fi antioxidanți, tampoane, conservanți, stabilizatori, agenți bacteriostatici, agenți de suspendare, agenți de îngroșare și substanțe dizolvate care fac formularea izotonică cu sângele (sau cu alt fluid corporal relevant) beneficiarului dorit. Exemple de excipienți includ, de exemplu, apă, alcoolii, zaharuri, polioli, glicerol, uleiuri vegetale și altele asemenea. Exemple de purtători izotonici adecvați pentru utilizare în astfel de formulări includ soluții pentru injecții cu clorură de sodiu, soluția Ringer sau soluția Ringer pentru injecții cu lactat. În mod obișnuit, concentrația de compus în lichid este de la aproximativ 1 ng/ml până la aproximativ 500 μg/mL, de exemplu, aproximativ 1 ng/ml până la aproximativ 100 μg/mL, de exemplu, de la aproximativ 10 ng/ml până la aproximativ 10 μg/mL, de exemplu, de la aproximativ 10 ng/mL până la aproximativ 1 μg/mL. Formulările pot fi prezentate în recipiente sigilate cu doză unitară sau cu mai multe doze, de exemplu, fiole și flacoane, și pot fi depozitate într-o stare uscată prin congelare (liofilizată) care necesită doar adăugarea de purtător lichid steril, de exemplu, apă pentru injecții, imediat înainte de utilizare. Soluțiile și suspensiile injectabile extemporanee pot fi preparate din pulberi, granule și tablete sterile.

Doză

În general, metodele din invenție pot cuprinde administrarea la un subiect a unei cantități eficiente de un compus cu formula (II), astfel încât să asigure un efect antimicrobian. Compusul cu formula (II) poate fi administrat într-o cantitate suficientă pentru a potența activitatea unui al doilea agent activ. Al doilea agent activ este administrat unui subiect într-o cantitate eficientă, astfel încât să asigure un efect antimicrobian.

Se va aprecia de către un specialist în domeniu că dozele adecvate de compus cu formula (II) sau de agent activ, și de compozițiile care cuprind compusul cu formula (II) sau agentul activ pot varia de la pacient la pacient. Determinarea dozei optime va implica, în general, echilibrarea nivelului de beneficiu terapeutic în raport cu orice risc sau efecte secundare dăunătoare. Nivelul de dozare selectat va depinde de o varietate de factori incluzând, dar fără limitare la, activitatea compusului particular cu formula (II) sau a agentului activ, calea de administrare, perioada de administrare, viteza de excreție a compusului, durata tratamentului, alte medicamente, compuși și/sau materiale utilizate în combinație, severitatea afecțiunii și specia, sexul, vârsta, greutatea, afecțiunea, starea generală de sănătate și antecedentele medicale ale pacientului. Cantitatea de compus cu formula (II) sau de agent activ și calea de administrare vor fi în cele din urmă la latitudinea medicului, medicului veterinar sau a clinicianului, deși, în general, doza va fi selectată pentru a atinge concentrațiile locale la situsul de acțiune care să realizeze efectul dorit fără a provoca efecte secundare dăunătoare sau nocive substanțiale.

Administrarea poate fi efectuată într-o singură doză, continuu sau intermitent (de ex., în doze divizate la intervale adecvate) pe tot parcursul tratamentului. Metodele de determinare a celor mai eficiente mijloace și doză pentru administrare sunt bine cunoscute de persoanele de specialitate în domeniu, și vor varia în funcție de formularea utilizată pentru terapie, scopul terapiei, celula (celulele) țintă care este tratată, și subiectul care este tratat. Pot fi efectuate administrări unice sau multiple, cu nivelul de doză și modelul selectat de medicul curant, medicul veterinar sau clinician.

În general, o doză adecvată de un compus cu formula (II) sau agent activ este în intervalul de la aproximativ 10 μg până la aproximativ 250 mg (mai obișnuit, de la aproximativ 100 μg până la aproximativ 25 mg) la fiecare kilogram de greutate corporală a subiectului, pe zi. Atunci când compusul cu formula (II) sau agentul activ este o sare, un ester, o amidă, un promedicament sau altele asemenea, cantitatea administrată este calculată pe baza compusului de bază și, astfel, greutatea reală care trebuie utilizată este crescută în mod proporțional.

Kit-uri

Un aspect descris aici, dar care nu face parte din invenție, se referă la un kit care cuprinde (a) un compus cu formula (II) sau o compoziție care cuprinde un compus așa cum este definit în oricare dintre formulele (II), de ex., furnizat în mod obișnuit într-un recipient adecvat și/sau cu ambalaj adecvat; și (b) instrucțiuni de utilizare, de exemplu, instrucțiuni scrise despre cum să se administreze compusul sau compoziția.

Instrucțiunile scrise pot include, de asemenea, o listă de indicații pentru care compusul cu formula (II) este un tratament adecvat.

Într-o variantă de realizare, trusa cuprinde suplimentar (c) un al doilea agent activ sau o compoziție care cuprinde al doilea agent activ. Aici, instrucțiunile scrise pot include, de asemenea, o listă de indicații pentru care al doilea agent activ, împreună cu compusul cu formula (II), este adecvat pentru tratament.

Căi de administrare

Un compus cu formula (II), un al doilea agent activ sau o compoziție farmaceutică care cuprinde compusul cu formula (II) sau al doilea agent activ poate fi administrată unui subiect prin orice cale convenabilă de administrare, fie sistemic/periferic, fie topic (adică la situsul de acțiune dorit).

Căile de administrare includ, dar nu sunt limitate la, orală (de ex., prin ingestie); bucală; sublinguală; transdermică (incluzând, de ex., printr-un plastru, pansament, etc.); transmucozală (incluzând, de exemplu, printr-un plastru, pansament, etc.); intranasală (de ex., prin spray nazal); oculară (de ex., prin picături pentru ochi); pulmonară (de ex., prin inhalare sau terapie prin insufleare folosind, de exemplu, un aerosol, de exemplu, prin gură sau nas); rectală (de ex., prin supozitor sau clismă); vaginală (de ex., prin pesar); parenterală, de exemplu, prin injectare, sau perfuzie, incluzând subcutanată, intradermică, intramusculară, intravenoasă, intraarterială, intracardiacă, intratecală, intraspinală, intracapsulară, subcapsulară, intraorbitală, intraperitoneală, intratraheală, subcuticulară, intraarticulară, subarahnoidă și intrasternală; prin implantarea unui depozit sau rezervor, de exemplu, subcutanat sau intramuscular.

Subiectul / Pacientul

Subiectul/pacientul poate fi un cordat, un vertebrat, un mamifer, un mamifer placentar, un marsupial (de ex., cangur, wombat), o rozătoare (de ex., un porc de guinea, un hamster, un șobolan, un șoarece), murină (de ex., un șoarece), un lagomorf (de ex., un iepure), aviar (de ex., o pasăre), canin (de ex., un câine), felin (de ex., o pisică), ecvin (de ex., un cal), porcină (de ex., un porc), ovină (de ex., o oaie), bovină (de ex., o vacă), o primată, simian (de ex., o maimuță sau antropoid), o maimuță (de ex., marmoset, babuin), un antropoid (de ex., gorilă, cimpanzeu, urangutan, gibbon) sau un om. În plus, subiectul/pacientul poate fi oricare dintre formele sale de dezvoltare, de exemplu, un fetus.

Într-o variantă de realizare, subiectul/pacientul este un om.

De asemenea, este avut în vedere că invenția poate fi pusă în practică pe un animal non-uman care are o infecție microbială. Un mamifer non-uman poate fi o rozătoare. Rozătoarele includ șobolani, șoareci, porci de guinea, chinchilla, și alte rozătoare mici de dimensiuni similare utilizate în cercetările de laborator.

Alte opțiuni

Fiecare și toate combinațiile compatibile ale variantelor de realizare descrise mai sus sunt dezvoltate în mod explicit aici, ca și cum fiecare combinație ar fi prezentată individual și explicit.

Diverse alte aspecte și variante de realizare a prezentei invenții vor fi evidente pentru persoanele de specialitate în domeniu care au în vedere prezenta dezvoltare.

"și/sau" atunci când este utilizat aici trebuie să fie considerată dezvoltare specifică a fiecăreia dintre cele două caracteristici sau componente specificate, cu sau fără cealaltă. De exemplu, "A și/sau B" trebuie considerate dezvoltări specifice pentru fiecare dintre (i) A, (ii) B, și (iii) A și B, la fel ca și cum fiecare ar fi prezentat individual aici.

Cu excepția cazului în care contextul dictează altfel, descrierile și definițiile caracteristicilor prezentate mai sus nu sunt limitate la niciun aspect sau variantă de realizare particulară a invenției, și se aplică în mod egal tuturor aspectelor și variantelor de realizare care sunt descrise. În cazul în care variantele de realizare adecvate din punct de vedere tehnic pot fi combinate, dezvoltarea se extinde la toate permutările și combinațiile variantelor de realizare furnizate aici.

Anumite aspecte și variante de realizare a invenției vor fi acum ilustrate cu titlu de exemplu și cu referire la figurile descrise mai sus.

Exemple

Următoarele exemple sunt furnizate numai pentru a ilustra prezenta invenție și nu au scopul de a limita sfera de întindere a invenției, așa cum este descris aici.

5

Abrevieri

Abreviere	Semnificație
PMBN	Nonapeptidă de polimixină B
PMB	Polimixină B
Thr	Treonină
Ser	Serină
DSer	D-serină
Leu	leucină
Ile	izoleucină
Phe	Fenilalanină
Dphe	D-fenilalanină
Val	Valină
Dab	Acid α,γ -diaminobutiric
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamină
HATU	hexafluorofosfat de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium
DCM	Diclorometan
TFA	Acid trifluoracetic
ND	Nedeterminat
N/A	Nu se aplică
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamidă
PMBH	Heptapeptidă de polimixină B (3-10)
PMBD	Decapeptidă de Polimixină B
Pro	Prolină
Dap	acid α,β -diaminopropionic
Gly	Glicină
NorLeu	Norleucină
Ruphos	2-Diciclohexilfosfino-2',6'-diizopropoxibifenil
Xphos	2-Diciclohexilfosfino-2',4',6'-triizopropilbifenil
SFC	Cromatografie de fluid supercritic
Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonil
Cbz	Benziloxycarbonil
HCTU	hexafluorofosfat de O-(1H-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium
Boc	terț-butiloxycarbonil
PyBOP	hexafluorofosfat de (Benzotriazol-1-iloxi)tripirolidinofosfoniu
NMM	morfolină de <i>N</i> -metil
THF	Tetrahydrofuran

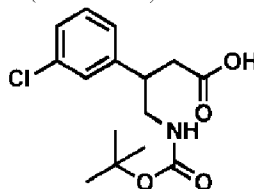
Abreviere	Semnificație
ivDde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutil
DPPA	Difenilfosporil azidă
TIS	Tri-izopropil silan
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
IPA	Izopropanol

Exemple de sinteză

Sinteza acizilor de capăt N-terminal

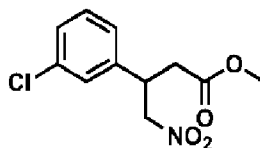
- 5 În prezenta lucrare, acizi 4-aminobutanoici 3-substituiți au fost utilizați în formă protejată adecvat. Sinteza aminoacizilor care nu sunt standard este detaliată mai jos împreună cu metodologia de separare a enantiomerilor

Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic - Izomerul 1 și Izomerul 2



10

(i) 3-(3-clorfenil)-4-nitrobutanoat de metil

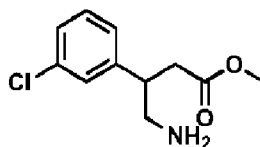


15

- Un amestec de acid 3-clorocinamic (10 g), metanol (100 ml) și acid sulfuric concentrat (4 ml) a fost agitat la temperatura camerei timp de 20 de ore. Amestecul a fost evaporat până la uscare, și reziduurile au fost împărțite între diclormetan (DCM) și apă. Faza apoasă a fost separată și extrasă cu DCM suplimentar. Extractele organice au fost combinate, au fost uscate cu sulfat de magneziu, au fost filtrate și evaporate până la uscare, pentru a se obține esterul metilic sub forma unui solid alb (10,19 g). Acest solid a fost dizolvat în nitrometan (32 mL) și a fost tratat cu 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enă (DBU) (8,5 mL). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 20 ore, apoi a fost evaporat până la uscare și reziduurile au fost împărțite între HCl 0,5 M apos și dietil eter. Faza apoasă a fost separată și extrasă cu dietil eter suplimentar. Extractele organice au fost combinate, au fost spălate cu saramură, au fost uscate cu sulfat de magneziu, au fost filtrate și evaporate până la uscare. Reziduurile au fost purificate pe silice, prin eluare cu hexan și acetat de etil (0-100%). Frațiunile corespunzătoare au fost combinate și evaporate până la uscare, pentru a se obține produsul dorit sub forma unui ulei galben (9,93 g, randament 70%).

- 30 $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2,71-2,79 (2H, m), 3,66(3H, s), 3,93-4,01 (1H, m), 4,62 și 4,73 (2H, ABq, apare ca 2x dd, J 12,8, 8,0 Hz), 7,11-7,28 (4H, m).

(ii) 4-amino-3-(3-clorfenil)butanoat de metil



35

- La o soluție de 3-(3-clorfenil)-4-nitrobutanoat de metil (9,93 g) în acid acetic (90 mL) agitată la aproximativ 0°C a fost adăugată în porții pulbere de zinc (20,1 g) (**avertisment:** exotermă întârziată). Amestecul a fost lăsat să se încălzească la temperatura camerei, cu agitare timp de 19 ore. Amestecul a

fost evaporat până la uscare și reziduurile au fost împărțite între NaHCO apos și acetat de etil. Amestecul a fost apoi filtrat prin Celite și fazele apoase și organice au fost separate. Faza apoasă a fost extrasă din nou cu acetat de etil suplimentar. Extractele organice au fost combinate, au fost spălate cu saramură, au fost uscate cu sulfat de magneziu, au fost filtrate și evaporate până la uscare, pentru a se obține produsul dorit sub forma unui ulei portocaliu (4,80 g).

(iii) Compusul din titlu - racemic

Un amestec de 4-amino-3-(3-clorfenil)butanoat de metil (4,80 g), dicarbonat de di-*terț*-butil (5,28 g) și diclormetan (100 ml) au fost agitate la temperatura camerei timp de 18 ore. Amestecul a fost evaporat până la uscare și reziduurile au fost purificate pe silice, prin eluare cu eter de petrol 40-60 și acetat de etil (0-100%). Frațiunile corespunzătoare au fost combinate și evaporate până la uscare, pentru a se obține esterul 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoatului de metil protejat cu Boc sub forma unui solid crem (2,59 g).

Un amestec de 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoat de metil (2,49 g), hidroxid de litiu (546 mg), 1,4-dioxan (40 mL) și apă (40 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 64 de ore. Amestecul a fost apoi evaporat până la uscare. Reziduurile au fost dizolvate în apă, au fost neutralizate cu soluție apoasă de HCl 1 M și au fost extrase cu acetat de etil ($\times 2$). Extractele organice au fost combinate, au fost spălate cu saramură, au fost uscate cu sulfat de magneziu, au fost filtrate și evaporate până la uscare, pentru a se obține produsul dorit sub forma unui ulei galben (2,51 g).

m/z 314 (MH⁺) C₁₅H₂₀ClNO₄ necesită 313,11. ¹H RMN (400MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1,40 (9H, s), 2,42-2,73 (2H, m), 3,24-4,49 (4,4 H, m, include CH₃OD, CH₂, și CH), 7,17-7,38 (4H, m).

(iv) Compusul din titlu - separarea izomerilor - metoda 1

Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (2,09 g) a fost dizolvat la 60 mg/mL în metanol și apoi a fost purificat prin SFC utilizând condițiile descrise mai jos (condițiile de separare preparativă 1). Frațiunile combinate care conțin izomerul 1 îmbogățit (prelucrare mai rapidă) și izomerul 2 (prelucrare mai lentă) au fost combinate, concentrate și fiecare a fost purificată din nou individual în aceleași condiții cromatografice.

Frațiunile combinate de fiecare izomer 1 și izomer 2 au fost apoi evaporate până aproape de uscare folosind un evaporator rotativ, au fost transferate în vase finale cu DCM, care a fost îndepărtat sub un curent de azot la 40°C înainte de a fi depozitate într-un cuptor cu vid la 40°C și 5 mbar timp de 16 ore.

Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (izomerul 1)

Solid alb, 883 mg, 95,6% ee. Timp de retenție 2,89 minute în sistem analitic 1.

Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (izomerul 2)

Solid alb, 876 mg, 98,6% ee. Timp de retenție 3,29 minute în sistem analitic 1.

Condiții preparative de separare 1:

Berger Multigram II SFC

Detalii ale coloanei: Lux A1 (Phenomenex, 21,2 mm \times 250 mm, 5 μ m)

Temperatura coloanei: 40°C

Debit: 50 ml/min

BPR: 125 BarG

Lungime de undă a detectorului: 210 nm

Volum de injectare: 300 μ L (18 mg)

Condiții izocratice: 12:88 EtOH: CO₂ (0,1% v/v NH₃)

Condiții de analiză 1:

Waters UPC2

Detalii ale coloanei: Lux C4 (Phenomenex, 4,6 mm \times 250 mm, 5 μ m)

Temperatura coloanei: 40°C

Debit: 4 ml/min

Lungime de undă a detectorului: 210-400 nm

Volum de injectare: 1,0 μ L

BPR: 125 BarG

Condiții izocratice: 10:90 EtOH:CO₂ (0,1% v/v NH₃)

(v) Compusul din titlu - separarea izomerilor - metoda 2

Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic purificat prin SFC folosind condițiile descrise mai jos (condiții de separare preparativă 2). După separare, fracțiunile au fost uscate pe evaporator rotativ la temperatura băii de 40°C pentru a obține enantiomerii separați doriți. Enantiomerul cu prelucrare mai lentă a fost purificat suplimentar pe aceeași coloană prin eluare cu 20% B.

Condiții preparative de separare 2:

Instrument: Thar 200 SFC preparativă (SFC-10)

Coloană: ChiralPak AY, 300 × 50 mm I.D., 10 μm

Fază mobilă: A pentru CO₂ și B pentru IPA

Gradient: B 25%

Debit: 200 ml/min

Contrapresiune: 100 bar

Temperatura coloanei: 38°C

Lungime de undă: 220 nm

Timp al ciclului: ~4,5 min

Condiții analitice 2:

Instrument: SFC analitică Waters UPC2 (SFC-H)

Coloană: ChiralPak AY, 150 × 4,6 mm I.D., 3 μm

Faza mobilă: A pentru CO₂ și B pentru IPA (0,05% DEA)

Gradient: B 5-40%

Debit: 2,5 ml/min

Contrapresiune: 100 bar

Temperatura coloanei: 40°C

Lungime de undă: 220 nm

Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (izomerul 1).

Timp de retenție 2,796 minute. Stereochimie (*R*) atribuită prin comparație cu izomerul (2) de mai jos.

Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (izomerul 2).

Timp de retenție 3,264 minute. Stereochimie (*S*) atribuită prin cristalografie cu molecule mici a materialului deprotejat de BOC, așa cum este descris mai jos.

(vi) Confirmarea stereochemiei

Sare trifluoracetat a acidului (S)-4-amino-3-(3-clorfenil)butanoic

La o soluție răcită cu apă cu gheață de izomer 2 al acidului 4-((*terț*-butoxicarbonilamino)-3-(3-clorfenil)butanoic (Timp de retenție 3,264 minute la metoda de analiză 2) (1,5 g, 4,78 mmoli) în diclorometan (20 ml) a fost adăugat acid trifluoracetic (5 ml). După adăugare, amestecul a fost agitat la această temperatură timp de 4 ore. Amestecul de reacție a fost apoi concentrat. Amestecul brut a fost dizolvat în apă (10 ml) și a fost liofilizat pentru a se obține produsul; Sare TFA a acidului (S)-4-amino-3-(3-clorfenil)butanoic (1,5 g, randament 95%). LC-MS: *m/z* 214 (M+H)⁺

Acid (S)-4-amino-3-(3-clorfenil)butanoic

La o soluție de sare a acidului trifluoracetic a acidului (S)-4-amino-3-(3-clorfenil)butanoic (0,5 g, 1,53 mmoli) în apă (10 mL), a fost adăugat hidroxid de amoniu apos diluat până când pH-ul a ajuns la 7. Soluția rezultată a fost depozitată într-un balon deschis de 25 ml și a fost menținută la temperatura camerei timp de 1 zi. După cristalizare, lichidul mamă a fost decantat, și cristalele solide au fost supuse studiilor de difracție de raze X.

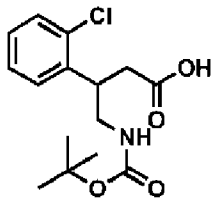
Studiile de difracție de raze X au arătat că compusul are stereochemia (*S*).

Condiții de difracție de raze X:

A fost folosit difractometrul CCD Bruker APEX-II.

Cristalul a fost menținut la 302,71 K în timpul colectării datelor. Folosind Olex2 (Dolomanov și colab.), structura a fost descifrată cu programul de soluție de structură ShelXT [2] (Sheldrick A71) folosind Intrinsic Phasing și a fost rafinată cu pachetul de rafinare ShelXL [3] folosind minimizarea Least Squares (Sheldrick C71).

Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(2-clorfenil)butanoic

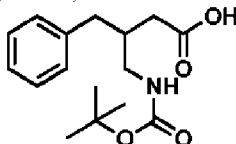


Compusul a fost preparat din acid 2-clorocinamic urmând metodologia pentru acid 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic, așa cum este descris în etapele (i) până la (iii) de mai sus.

5 Compusul a fost obținut sub forma unui ulei incolor.

m/z 314 (MH^+), $C_{15}H_{21}ClNO_4$ masă exactă 313,11.

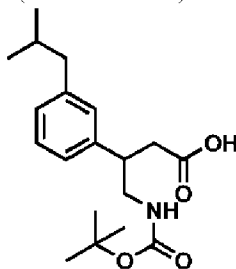
Acid 3-benzil-4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)butanoic



10 3-benzil-4-nitrobutanoat de metil (Tetrahedron Asymmetry, 19, 2008, 945) a fost transformat în compusul din titlu urmând metodologia pentru acid 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic, așa cum este descris în etapele (i) până la (iii) de mai sus.

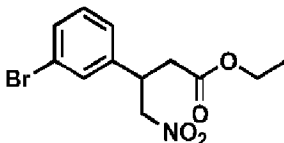
m/z 294 (MH^+), $C_{16}H_{23}NO_4$ masă exactă 293,16.

Acid 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-izobutilfenil)butanoic



15

(i) 3-(3-bromfenil)-4-nitrobutanoat de etil



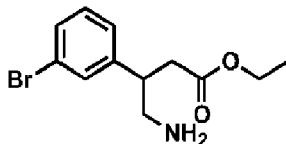
20 Un amestec de hidură de sodiu (60%) în ulei mineral (394,26 mg, 9,86 mmoli) și 1,2-dimetoxietan (22,5 mL) (DME) a fost răcit la 0°C. A fost adăugat prin picurare trietilfosfonoacetat (10,2 mL, 51,43 mmoli), și amestecul a fost agitat timp de 10 min. A fost adăugată prin picurare o soluție de 3-bromobenzaldehidă (1,0 mL, 8,57 mmol) în DME (5 mL). Amestecul de reacție a fost încălzit la temperatura camerei și a fost refluxat timp de 3 ore.

25 Amestecul a fost evaporat până la uscare și reziduurile au fost împărțite între hexan și apă. Stratul apos a fost separat și a fost extras cu hexan suplimentar. Extractele organice au fost combinate, au fost spălate cu apă, au fost uscate cu $MgSO_4$, au fost filtrate și evaporate până la uscare. Reziduurile au fost purificate pe silice prin eluare cu eter de petrol 40-60 și acetat de etil (0-100%). Frațiunile corespunzătoare au fost combinate și evaporate până la uscare, pentru a se obține (E)-3-(3-bromfenil)prop-2-enoat de etil sub forma unui solid alb (1,44 g, 65%). Acesta a fost transformat în 3-(3-bromfenil)-4-nitrobutanoat de etil folosind condițiile de nitrare din prepararea acidului 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic, etapa (i), așa cum este descris mai sus, pentru a se obține produsul cu un randament de 60%.

m/z 316, 318 (MH^+). $C_{12}H_{14}BrNO_4$ necesită 315,01.

35

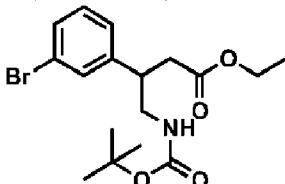
(ii) 4-amino-3-(3-bromfenil)butanoat de etil



3-(3-bromofenil)-4-nitrobutanoatul de etil (1,08 g) a fost transformat în 4-amino-3-(3-bromofenil)butanoat de etil folosind condițiile descrise mai sus pentru acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic în etapa (ii), pentru a se obține produsul cu randament de 67%.

m/z 286 și 288 (MH⁺), C₁₂H₁₆BrNO₂ masă exactă 285,04.

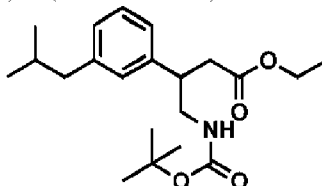
(iii) 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-bromofenil)butanoat de etil



4-amino-3-(3-bromofenil)butanoat de etil (655 mg) a fost transformat în 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-bromofenil)butanoat de etil în condițiile descrise mai sus pentru acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic în etapa (iii), pentru a se obține produsul cu randament de 72%.

m/z 386 și 388 (MH⁺), C₁₇H₂₄BrNO₄ masă exactă 385,09.

(iv) 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-izobutilfenil)butanoat de etil



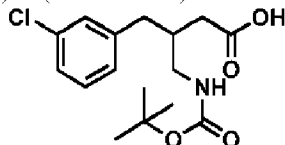
Un amestec de Ruphos (48,3 mg, 0,1 mmoli), fosfat de potasiu tribazic (330 mg, 1,55 mmoli), 3-(3-bromofenil)-4-((*terț*-butoxicarbonilamino)butanoat de etil (200 mg, 0,52 mmoli) și acid izobutilboronic (132 mg, 1,29 mmoli) în toluen (9 mL) a fost degazat de patru ori prin evacuare / spălare cu azot înainte de adăugare de acetat de paladiu (II) (5,8 mg, 0,03 mmoli). Amestecul a fost agitat la 110°C timp de 100 min. Amestecul de reacție a fost lăsat să se răcească înainte de a fi filtrat prin Celite și a fost lăsat peste noapte în soluție. Amestecul a fost evaporat până la uscare și a fost purificat pe silice, prin eluare cu eter de petrol 40-60 și acetat de etil (0-100%). Frațiunile corespunzătoare au fost combinate și evaporate până la uscare, pentru a se obține 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-izobutilfenil)butanoat de etil sub forma unui ulei incolor, (74 mg, 39%).

m/z 364 (MH⁺). C₂₁H₃₃NO₄ masă exactă 363,24.

(v) Compusul din titlu

Un amestec de 4-((*terț*-butoxicarbonilamino)-3-(3-izobutilfenil)butanoat de etil (74 mg, 0,2 mmoli) și hidroxid de litiu (15 mg, 0,6 mmoli) în 1,4-dioxan (3 mL) și apă (3 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 16 ore. Amestecul a fost evaporat până la uscare și reziduurile au fost împărțite între acetat de etil și apă. Faza organică a fost separată și aruncată. Stratul apos a fost acidulat cu HCl (apos) 1 M și a fost extras cu acetat de etil (x2). Extractele organice au fost combinate, au fost uscate cu MgSO₄, au fost filtrate și evaporate până la uscare, pentru a se obține acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-izobutilfenil)butanoic sub forma unui ulei incolor (65 mg). m/z 336 (MH⁺) C₁₉H₂₉NO₄ masă exactă 335,21.

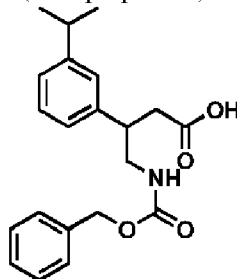
Acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorbenzil)butanoic



2-(3-Clorfenil) acetaldehidă a fost transformată în 3-(3-clorbenzil)-4-nitrobutanoat de etil așa cum este descris pentru acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-izobutilfenil)butanoic în etapa (i), așa cum este descris mai sus. Reducerea și protejarea ca în etapele (ii) și (iii), urmate de hidroliză ca în etapa (v) de mai sus au condus la compusul din titlu sub forma unui ulei incolor.

5 m/z 328 (MH⁺). C₁₆H₂₂ClNO₄ masă exactă 327,12.

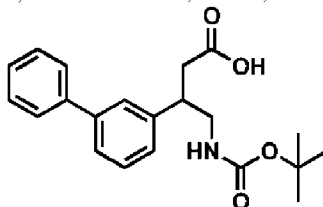
Acid 4-(((benziloxi)carbonil)amino)-3-(3-izopropilfenil)butanoic



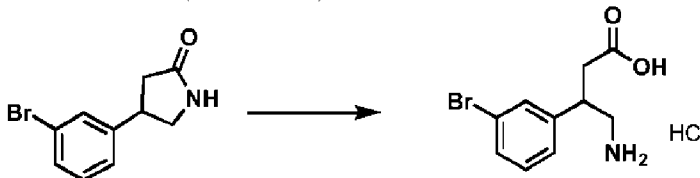
10 Un amestec de 4-amino-3-(3-izopropilfenil)butanoat de etil (1,55 g, 6,21 mmol) (preparat folosind metodologia pentru acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-izobutilfenil)butanoic, etapele (i) până la (ii), așa cum este descris mai sus) și bicarbonat de sodiu (0,783 g 9,32 mmoli) a fost dizolvat în apă (10 mL) și 1,4 -dioxan (5 ml). Amestecul a fost răcit într-o baie de gheață și a fost tratat cu o soluție de cloroformiat de benzil (0,98 mL, 6,84 mmoli). Amestecul a fost agitat la 10°C timp de 1 oră, apoi a fost lăsat să se încălzească la temperatura camerei. După agitare timp de 20 ore, amestecul a fost evaporat până la uscare, și reziduurile au fost împărțite între dietil eter și soluție apoasă de HCl 0,5 M. Stratul apos a fost separat și extras cu dietil eter suplimentar. Extractele organice au fost combinate, au fost spălate cu saramură, au fost uscate pe MgSO₄ anhidru, și au fost evaporate. Produsul brut a fost purificat pe silice, prin eluare cu eter de petrol 40-60 și acetat de etil (0-100%). Frațiunile care conțin produs au fost combinate și evaporate până la un ulei galben pal (1,74 g, 73%). Esterul etilic a fost hidrolizat cu hidroxid de litiu așa cum a fost descris anterior în etapa (iii) pentru prepararea acidului 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-izobutilfenil)butanoic, urmată de cromatografie pe silice prin eluare cu eter de petrol 40-60 și acetat de etil (0-100%) pentru a se obține compusul din titlu sub forma unui solid alb (60%).

25 m/z 356 (MH⁺). C₂₁H₂₅NO₄ masă exactă: 355,18.

Acid 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((*terț*-butoxicarbonil)amino)metil)butanoic



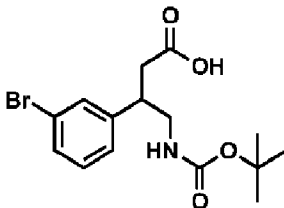
(i) clorhidrat de acid 4-amino-3-(3-bromfenil)butanoic



30 Un amestec de 4-(3-bromfenil)pirolidin-2-onă (1,0 g, 4,16 mmoli) și HCl 6 M apos (15,0 ml, 90 mmoli) a fost încălzit la 100°C timp de 16 ore. Amestecul a fost evaporat până la uscare, a fost evaporat concomitent cu apă, urmată de acetat de etil și apoi diclorometan (DCM), pentru a se obține produsul dorit sub forma unui solid alb, cu un randament cantitativ presupus.

35 m/z 258 și 260 (MH⁺) C₁₀H₁₂BrNO₂ masă exactă: 257,01.

(ii) Acid 3-(3-bromfenil)-4-(*terț*-butoxicarbonilamino)butanoic



Un amestec de clorhidrat de acid 4-amino-3-(3-bromfenil)butanoic (1,31 g, 4,45 mmol), terț-butoxicarbonil carbonat de terț-butil (Boc-O-Boc, 1,41 g, 6,45 mmoli), 1,4- dioxan (8 mL) și soluție apoasă de NaOH 1 M (8,0 mL, 8 mmoli) a fost agitat la temperatura camerei timp de 64 de ore. Amestecul a fost evaporat până la uscare. Reziduurile au fost dizolvate în apă, au fost neutralizate cu soluție apoasă de HCl 1 M și au fost extrase cu acetat de etil ($\times 2$). Extractele organice au fost combinate, au fost uscate cu $MgSO_4$, au fost filtrate și evaporate până la uscare, pentru a se obține produsul dorit (1,60 g, 86%) sub forma unui ulei incolor.

m/z 357,5 și 359,4 (MH^+). $C_{15}H_{20}BrNO_4$ masă exactă: 357,06.

(iii) Compusul din titlu

Un amestec de acid 3-(3-bromfenil)-4-(terț-butoxicarbonilamino)butanoic (2,69 g, 7,51 mmoli), acid fenilboronic (2,3 g, 18,8 mmoli), acetat de paladiu (II) (84 mg, 0,38 mmoli), Xphos (716 mg, 1,5 mmoli) și fosfat de potasiu tribazic (4781,9 mg, 22,53 mmoli) în 1,4-dioxan (130 mL) a fost agitat la 100°C sub atmosferă de azot timp de 2 ore. Amestecul a fost apoi lăsat să se răcească la temperatura camerei, a fost filtrat prin Celite, a fost spălat cu acetat de etil și a fost evaporat până la uscare. Reziduurile au fost purificate pe silice, prin eluare cu eter de petrol și acetat de etil (0-100%). Frațiunile corespunzătoare au fost combinate și evaporate până la uscare, pentru a se obține produsul dorit, 1,44 g, sub forma unui solid gri (randament 42%).

m/z 355 (M^+), observat $C_{21}H_{25}NO_4$ masă exactă: 355,18.

(iv) Separarea chirală

Acid 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((terț-butoxicarbonil)amino)metil)butanoic (1,44 g) a fost dizolvat la 30 mg/mL în MeOH și apoi a fost purificat prin SFC utilizând metoda de mai jos. Frațiunile combinate de fiecare izomer 1 (prelucrare mai rapidă) și izomer 2 (prelucrare mai lentă) au fost apoi evaporate până aproape de uscare folosind un evaporator rotativ, au fost transferate în vase finale cu DCM, care a fost îndepărtat sub un curent de aer comprimat la 40°C înainte de a fi depozitate într-un cuptor cu vid la 40°C și 5 mbar până la greutate constantă.

Izomerul 1, acid 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((terț-butoxicarbonil)amino)metil)butanoic. 523 mg de solid alb. Timp de retenție: (condiții de analiză 3) 2,70 min. *ee* 99,8%.

Izomerul 2, acid 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((terț-butoxicarbonil)amino)metil)butanoic. 537 mg de solid alb. Timp de retenție: (condiții de analiză 3) 3,46 min. *ee* 99,8%.

Condiții de purificare 3:

Berger Multigram II SFC

Detalii ale coloanei: Lux A1 (Phenomenex, 21,2 mm \times 250 mm, 5 μ m)

Temperatura coloanei: 40°C

Debit: 50 ml/min

BPR: 100 BarG

Lungime de undă a detectorului: 215 nm

Volum de injectare: 1,000 μ L (30 mg)

Condiții izocratice: 15:85 EtOH:CO₂ (0,2% v/v NH₃)

Condiții de analiză 3:

Waters UPC2

Detalii ale coloanei: Amy-C (YMC GmbH, 4,6 mm \times 250 mm, 5 μ m)

Temperatura coloanei: 40°C

Debit: 4 ml/min

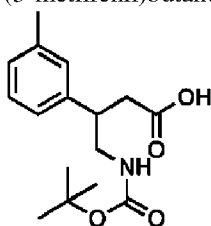
Lungime de undă a detectorului: 210-400 nm

Volum de injectare: 1,0 μ L

BPR: 125 BarG

Condiții izocratice: 15:85 EtOH:CO₂ (0,2% v/v NH₃)

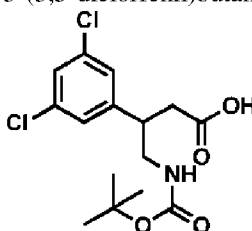
Acid 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-metilfenil)butanoic



4-(3-Metilfenil)pirolidin-2-onă a fost transformată în compusul din titlu utilizând metodologia
5 descrisă mai sus pentru prepararea acidului 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-((*tert*-
butoxicarbonil)amino)metil)butanoic în etapele (i) până la (ii). Compusul din titlu a fost obținut sub forma
unui ulei incolor.

m/z 294 (MH^+). $C_{16}H_{23}NO_4$ masă exactă 293,16.

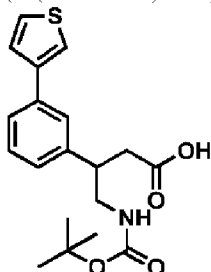
10 Acid 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3,5-diclorfenil)butanoic



3,5-diclorbenzaldehydă a fost transformată în compusul din titlu utilizând metodologia descrisă
15 mai sus pentru prepararea acidului 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-izobutilfenil)butanoic în etapele
(i) până la (iii). Esterul etilic a fost hidrolizat așa cum a fost descris pentru etapa (v) din prepararea
acidului (3-izobutilfenil)butanoic, pentru a se obține compusul din titlu sub forma unui ulei incolor.

m/z 348. (MH^+). $C_{15}H_{19}Cl_2NO_4$ masă exactă 347,07.

Acid 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-(tiofen-3-il)fenil)butanoic



4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-bromfenil)butanoat de etil (207 mg, 0,54 mmoli) a reacționat
cu acid 3-tienilboronic utilizând metodologia descrisă mai sus pentru prepararea acidului (3-
25 izobutilfenil)butanoic în etapa (iv). Produsul a fost hidrolizat așa cum a fost descris în etapa (v) pentru a
se obține compusul din titlu sub forma unui ulei incolor.

m/z 362 (MH^+). $C_{19}H_{23}NO_4S$ masă exactă 361,13.

Nonapeptide de polimixine intermediare și compuși de produs

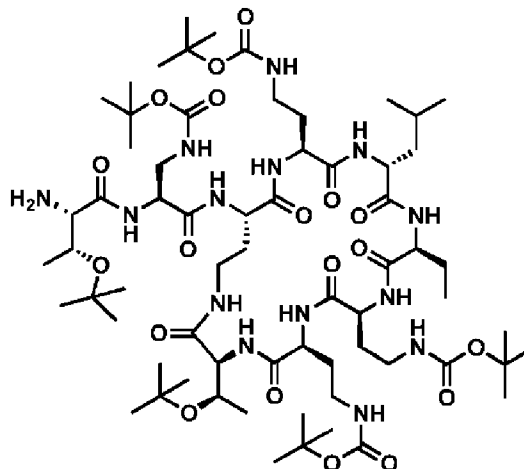
30 *Intermediarul 1: H-Thr(O-tBu)-Dap(BOC)-Ciclo[Dab-Dab(BOC)-DPhe-Leu-Dab(BOC)-
Dab(BOC)-Thr]*

A fost descris anterior în WO 2015/135976 ca intermediar 11 – heptapeptidă de Tetra- (N-Boc)-
L-Thr(O-tBu)-L-Dap-polimixină B.

35 *Intermediarul 2: H-Thr(O-tBu)-Dap(BOC)-Ciclo[Dab-Dab(BOC)-Leu-Leu-Dab(BOC)-
Dab(BOC)-Thr]*

A fost descris anterior în WO 2015/135976 ca intermediar 14 – heptapeptidă de Tetra- (N-Boc)-
L-Thr(O-tBu)-L-Dap-polimixină E.

Intermediarul 3: H-Thr(O-tBu)-Dap(BOC)-Ciclo[Dab-Dab(BOC)-Dleu-L-Abu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr(O-tBu)]



5 (i) CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Dab-Dab(Boc)-Dleu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)-OH

Peptida liniară CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Dab(ivDde)-Dab(Boc)-Dleu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu) a fost preparată pe rășină prin sinteza peptidei în fază solidă folosind chimia Fmoc, folosind metodologia din metoda generală 3 descrisă mai sus. Secvența a început cu clorurii de clorotritil (CTC)-rășină (2,0 g), preîncărcată cu Fmoc-Thr(tBu)-OH la o încărcare de 0,75 mmol/g. Peptida legată de rășină (3,93 g, care corespunde la 1,5 mmol) a fost plasată într-un balon conic de 500 ml și a fost tratată cu hidrazină 4% în DMF (100 ml). Amestecul a fost plasat într-un agitator și a fost agitat ușor timp de 30 de minute. Amestecul a fost turnat într-o coloană sinterizată, apoi a fost spălat cu DMF (3 x 100 mL). A fost aplicat aer comprimat pentru a îndepărta ultimele urme de DMF. Procedura a fost apoi repetată cu THF și cu DCM.

Rășina a fost apoi tratată cu 4:1 DCM: hexafluoroizopropanol (100 mL) pentru a scinda peptida din rășină. După 30 de minute, coloana a fost drenată și procedura a fost repetată. Rășina a fost apoi spălată de trei ori cu DCM (100 mL). Eluanții și substanțele de spălare combinate au fost evaporate sub presiune redusă și au fost uscate *in vid* peste noapte. Au fost obținute 724 mg de solid alb (2,35 g, cantitativ).

20 m/z 1552, $C_{73}H_{126}N_{14}O_{22}$ necesită 1550,92.

(ii) CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-ciclo[Dab-Dab(Boc)-DLeu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)]

25 CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Dab-Dab(Boc)-DLeu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)-OH brut (724 mg, 0,466 mmoli) a fost dizolvat în DMF (75 mL), a fost tratat cu diizopropiletilamină (DIPEA) (361 mg, 0,49 mL, 2,8 mmoli) apoi au fost răcite într-o baie de gheață. A fost adăugată prin picurare difenil fosforil azidă (256 mg, 0,2 mL, 0,93 mmoli), apoi amestecul a fost agitat timp de 2 ore cu răcire în baie de gheață. Baia de gheață a fost îndepărtată și soluția a fost agitată la temperatura camerei timp de încă 2 ore. Solventul a fost evaporat și reziduul a fost aplicat pe o Coloană ISCO cu SiO_2 (40 g) și a fost cromatografiat cu 0-10% MeOH în DCM. Frațiunile care conțin produs au fost combinate și evaporate până la o spumă albă. Au fost obținute 418 mg (58%).

m/z 1534, $C_{73}H_{124}N_{14}O_{21}$ necesită 1532,91.

(iii) Compusul din titlu

35 CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-ciclo[Dab-Dab(Boc)-DLeu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)] (531mg, 0,346 mmoli) a fost dizolvat în metanol (50 mL) și a fost tratat cu formiat de amoniu (545 mg, 8,6 mmoli) și 10% Pd/C (173 mg). După agitare la temperatura camerei peste noapte, amestecul de reacție a fost filtrat prin Celite și reziduul a fost spălat cu MeOH. Solventul a fost evaporat și reziduul a fost dizolvat în EtOAc, conținând 10% MeOH, a fost spălat cu apă x 3 și a fost uscat cu sulfat de magneziu. Solventul a fost evaporat pentru a rămâne un solid alb. Pentru a îndepărta orice urmă de formiat, solidul a fost dizolvat în metanol (160 ml) și a fost agitat cu rășină Ambersep 900 (12 ml) timp de 30 de minute. Amestecul a fost filtrat și evaporat până la uscare, pentru a se obține 464 mg de solid alb (96%).

m/z 1400, $C_{65}H_{118}N_{14}O_{19}$ necesită 1398,87.

45

Metode generale

Sinteza totală a derivaților de nonapeptidă de polimixină a fost efectuată așa cum urmează.

O peptidă liniară cu protejare ortogonală a grupării γ -amino a reziduiului Dab implicat în ciclizare a fost construită pe rășină, cu aminoacidul de capăt C-terminal (de obicei Thr) atașat la faza solidă. După deprotejarea parțială a Dab-ului implicat în ciclizare (reziduul 4 în sistemul de numerotare a polimixinei), urmată de îndepărtarea din rășină, peptidele liniare rezultate au fost ciclizate în afara rășinii. Au fost utilizate două metode generale, așa cum este descris mai jos.

Metoda generală 1: Sinteza totală folosind protejare cu CBZ a grupărilor amină

Sinteza peptidei liniare protejate (reziduurile 2-10 și gruparea N-terminală) a fost efectuată pe un sintetizator automat de peptide utilizând chimia standard Fmoc a peptidei în fază solidă. Mai precis, sinteza a fost efectuată folosind rășină Fmoc-Thr(tBu)-PEG-PS ca materie primă. Cuplarea aminoacizilor Fmoc cu protecția CBZ pe grupările amino terminale a fost realizată folosind 5 echivalenți molari (față de încărcarea cu rășină) de aminoacid Fmoc și HATU în DMF cu activare in situ, folosind 10 echivalenți molar de DIPEA. Deprotejarea de Fmoc a fost efectuată utilizând piperidină 20% în dimetilformamidă. BOC a fost folosit ca grupare protectoare ortogonală pe Dab implicat în ciclizare.

Peptida liniară legată de rășină a fost tratată cu TFA/TIS/H₂O (96/2/2v/v) timp de 2 ore pentru a releva reziduul Dab implicat în ciclizare și pentru a scinda peptida din rășină. Acest material a fost ciclizat folosind PyBop/HOBt/NMM (4/4/8 echivalenți molari în raport cu încărcarea inițială) în DMF timp de 3 ore. Materialul brut a fost parțial evaporat, a fost preluat cu acetonitril/apă și a fost liofilizat peste noapte. Grupările CBZ au fost apoi îndepărtate folosind 10% Pd/C în acid acetic/MeOH/apă (5/4/1 v/v).

Produsul brut a fost purificat, și diastereomerii au fost separați prin HPLC preparativă (Tabelul 3). Este de reținut că condițiile specifice au fost optimizate pentru fiecare pereche de diastereomeri.

Metoda generală 2: Sinteza totală folosind protejarea cu Boc a grupărilor amină

Sinteza peptidei liniare protejate (reziduurile 2-10 și gruparea N-terminală) a fost efectuată pe un sintetizator automat de peptide utilizând chimia standard Fmoc a peptidei în fază solidă. Mai precis, sinteza a fost efectuată utilizând rășină de clorură de clorotritil (CTC), preîncărcată cu Fmoc-Thr(tBu)-OH (încărcare ~0,78 mmol/g), pe o scară de 0,05 - 0,1 mmol. Cuplarea Fmoc-aminoacizi a fost realizată folosind 5 echivalenți molar (față de încărcarea cu rășină) de aminoacid Fmoc și HATU în DMF cu activare in situ, folosind 10 echivalenți molar de DIPEA. Deprotejarea de Fmoc a fost efectuată utilizând piperidină 20% în dimetilformamidă. Gruparea protectoare ivDde a fost utilizată ca protecție ortogonală pe reziduul Dab implicat în ciclizare.

Pentru a elimina gruparea ivDde, peptida liniară a fost tratată cu 3% hidrazină în DMF (100 mL la fiecare 100 μ moli, repetat de două ori), urmată de spălare cu DMF \times 3, EtOH \times 3 și dietil eter \times 3. Peptida liniară parțial deprotejată a fost apoi scindată din rășină prin spălarea rășinii cu 20% HFIP în DCM. Reziduul rezultat a fost dizolvat în 50% acetonitril/apă și a fost uscat prin congelare peste noapte. Peptida liniară protejată a fost dizolvată în DMF (20 mL/mmol de rășină), a fost ciclizată cu DPPA, (3 echivalenți molar în raport cu încărcarea rășinii) și DIPEA (6 echivalenți molar în raport cu încărcarea rășinii). Această soluție a fost agitată la temperatura camerei peste noapte. Grupările BOC au fost îndepărtate cu TFA, și peptida brută a fost liofilizată.

Produsul brut a fost purificat, și diastereomerii au fost separați prin HPLC preparativă utilizând condițiile HPLC preparative 4 descrise mai jos. Este de reținut că condițiile specifice au fost optimizate pentru fiecare pereche de diastereomeri.

Metoda generală 3: Cuplarea acidului la nonapeptidă și separarea

Metodele de cuplare a capătului N-terminal al unei nonapeptide la un aminoacid sunt descrise mai jos în legătură cu exemplul de compuși 5 și 6. Condițiile descrise sunt adaptabile pentru alte combinații de nonapeptidă și aminoacid.

Etapa 1

H-Thr(O^t-Bu)-Dap(BOC)-Ciclo[Dab-Dab(BOC)-DPhe-Leu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr].

(Intermediarul 1) (0,07 mmol) a fost dizolvat în diclormetan (4 mL) și a fost tratat cu acid 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (1,5 echiv în raport cu substratul de polimixină), *N,N*-diizopropiletilamină (3,0 echiv.), urmată de HATU (2,0 echiv.). După 16 ore, terminarea reacției a fost confirmată prin LCMS și amestecul de reacție a fost evaporat până la uscare. A fost adăugată apă (aproximativ 10 ml) și amestecul a fost triturat, apoi a fost agitat energic timp de 1 oră. Precipitatul rezultat a fost colectat prin filtrare și a fost uscat *in vid* peste noapte.

Etapa 2

Derivatul protejat cu Boc din Etapa 1 a fost dizolvat în diclormetan (3 mL) și a fost tratat cu TFA (1 mL). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei până când LCMS a confirmat deprotejarea completă. Solventul a fost evaporat și reziduul a fost cromatografat prin HPLC preparativă utilizând condițiile date în condițiile de HPLC preparativă 4, pentru a separa diastereoizomerii. Frațiunile care conțin diastereomerul de prelucrare precoce au fost combinate, au fost evaporate până la volum mic și au fost liofilizate pentru a se obține Exemplul 5 sub formă de sare TFA. Frațiunile care conțin diastereomerul de prelucrare ulterioară au fost combinate, au fost evaporate până la volum mic și au fost liofilizate pentru a se obține Exemplul 6 sub formă de sare TFA.

Este de reținut că condițiile specifice au fost optimizate pentru fiecare pereche de diastereomeri.

Condiții de HPLC preparativă 4:

Coloană:	Waters Sunfire C18 OBD 5 μ m \times 19 mm \times 150 mm	
Fază mobilă:	A: apă/acetonitril 90/10, v/v, 0,15% TFA. B: acetonitril/apă 90/10, v/v, 0,15% TFA	
Debit:	10 ml/min	
Gradient:	Timp (minute)	% de fază mobilă A
	0	100%
	3	100%
	8	85%
	13,5	85%
	15	75%
	18	0%
	23	100%
25	100%	
Detectare:	210 nm	

Condiții analitice pentru HPLC 4:

Coloană:	Phenomenex Hyperclone C18 BDS 5 μ m \times 4,6 mm \times 150 mm	
Fază mobilă:	A: apă/acetonitril 90/10, v/v, 0,15% TFA. B: acetonitril/apă 90/10, v/v, 0,15% TFA	
Debit:	1 ml/min	
Gradient:	Timp (minute)	% fază mobilă A
	0	100%
	20	40%
	21	0%
	23	0%
	23,5	100
25	100	
Detectare:	210, 254 nm	

Volum injectare:	de 20 μ L	
---------------------	---------------	--

Metoda generală 3b: Cuplarea enantiomerilor individuali la nonapeptidă

Aminoacizi puri enantiomeric au fost cuplați la capătul N-terminal al compușilor nonapeptidă folosind aceleași condiții ca cele descrise mai sus în metoda generală 3a pentru aminoacizi amestecați enantiomeric.

Exemplele de compuși 5 și 6

Cuplarea acidului 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (izomerul 2)

(Timp de retenție 3,46 min în metoda analitică 1 sau 3,264 min în metoda analitică 2) în condițiile metodei generale 3a urmată de deprotejare a condus la obținerea exemplului 5. Exemplului (5) i s-a atribuit stereochemia (S) în urma determinării cu raze X a configurației absolute a acidului 4-amino-3-(3-clorfenil)butanoic derivat din acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (izomerul 2).

Cuplarea acidului 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (izomer 1, timp de retenție 2,89 min în metoda analitică 1 sau 2,796 min în metoda analitică 2) în condițiile metodei generale 3a urmată de deprotejare a condus la obținerea Exemplului 6. Exemplului (6) i s-a atribuit stereochemia (R) în urma determinării cu raze X a configurației absolute a acidului 4-amino-3-(3-clorfenil)butanoic derivat din acid 4-((*terț*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorfenil)butanoic (izomerul 1).

Metoda generală 4: Transformarea în sare acetat

Rășină AG1-X2 (Bio-Rad Laboratories Ltd) sub formă de acetat cu 200-4 ochiuri, a fost regenerată prin spălare cu 10% acid acetic apos, urmată de 1% acid acetic apos, și a fost plasată într-un cartuș fritat. O soluție de compus sub formă de sare TFA în apă a fost aplicată pe coloană, utilizând o încărcare de 30 g de rășină la 1 g de sare TFA, și coloana a fost lăsată să picure sub gravitație, prin eluare cu apă. Frațiunile care conțin produs au fost combinate și liofilizate până la un solid alb.

Analiza compușilor finali a fost efectuată prin HPLC utilizând condițiile descrise mai sus (condiții HPLC analitice).

Date analitice exemplificatoare pentru compușii din Exemplele 5 și 6, sub formă de săruri de acetat, sunt date mai jos.

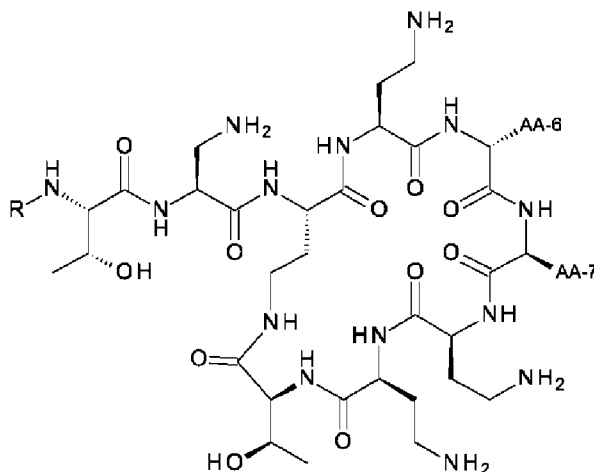
Exemplul 5: (izomer mai rapid) ^1H RMN al sării acetat (400 MHz, D_2O): δ (ppm) 0,70 (3 H, d, J 6,1 Hz), 0,77 (3 H, d, J 6,3 Hz), 0,78-0,90 (1H, m), 1,13 (3H, d, J 6,3 Hz), 1,17 (3H, d, J 6,4Hz), 1,36-1,52 (2H, m), 1,75-2,06 (17 H, m, include 1,91, s, OAc), 2,10-2,30 (4H, m), 2,72-2,91 (4H, m), 3,02-3,49 (14H, m), 4,12-4,32 (8 H, m), 4,48 (1 H, dd, J 5,6, 9,0 Hz), 4,54-4,60 (1H, m), 4,63-4,68 (1H, m), 7,25-7,41(9H, m). m/z 1145 [MH^+], 573[$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$.

Exemplul 6: (izomer mai lent) ^1H RMN al sării acetat (400 MHz, D_2O): δ (ppm) 0,60- 0,67 (6 H, m), 0,69 - 0,84 (4 H, m), 1,16 (3H, d, J 6,4Hz), 1,33-1,50 (2 H, m), 1,76-2,04 (19 H, m, include 1,88, s, OAc), 2,06-2,26 (4 H, m), 2,67-2,86 (4 H, m), 3,00-3,46 (14 H, m), 3,98-4,04 (1 H, m) 4,14-4,30 (7H, m), 4,45 (1 H, dd, J 5,6, 9,0 Hz), 4,54 (1 H, apare ca t, J 8,3 Hz), 4,72 (1 H, dd, J 5,0, 8,9 Hz), 7,20-7,40 (9 H, m). m/z 1145 [MH^+], 573[$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$.

În toate exemplele, diastereomerii au fost atribuiți pe baza timpului de retenție în HPLC (izomeri cu eluare rapidă și lentă) împreună cu deplasarea chimică a reziduului Thr care trece de la 1,13 ppm, în izomerul cu eluare rapidă, la aproximativ 0,65 ppm, în izomerul cu eluare lentă.

Compuși de exemplu și de referință

Tabelul 1 enumeră exemple de compuși din invenție împreună cu compuși de referință furnizați pentru înțelegerea utilă a invenției. Aceștia sunt compuși care au structura generală arătată mai jos:



Gruparea R este arătată în tabel împreună cu reziduurile de aminoacizi la pozițiile 6 și 7 (AA-6 și, respectiv, AA-7 folosind sistemul de numerotare a polimixinei).

În acești compuși de exemplu și de exemplu de referință, reziduul de aminoacid din poziția QQQ este L-Thr, reziduul de aminoacid din poziția 3 este L-Dap, și aminoacidul din poziția QQQ este L-Thr.

Stereochimia absolută în lanțul lateral -R a fost atribuită prin comparație cu Exemplul 5 și Exemplul 6 care au fost corelate cu material cu stereochemie absolută cunoscută.

În exemple și în exemple de referință 1-6 și 15-33, determinarea a fost făcută prin compararea timpilor de retenție relativi și a spectrului ^1H RMN al diastereomerilor (de ex., luând în considerare deplasarea chimică a reziduului Thr în poziția 2).

În Exemplele de referință 7-14, determinarea a fost făcută prin compararea timpilor relativi de retenție în HPLC ai diastereomerilor.

Tabelul furnizează timpii de retenție în HPLC pentru compușii de exemplu. Condițiile HPLC care au fost utilizate pentru analiză sunt prezentate mai jos.

Coloană: Phenomenex Hyperclone BDS C18, 4,6 mm × 150 mm, 5 μm

Debit: 1 ml/min

Eluant:

A = 10% AcN/90% apă/0,15% TFA

B = 90% AcN/10% apă/0,15% TFA

Gradient:

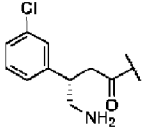
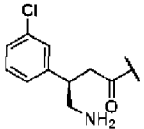
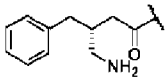
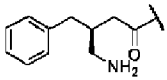
Minute	% A	% B
0	100	0
20	40	60
21	0	100
23	0	100
23,5	100	0
25	100	0

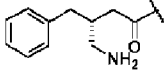
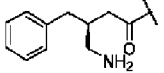
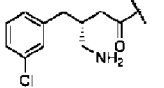
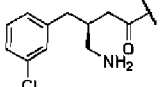
Detectare: 210, 254 nm

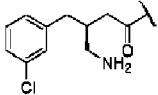
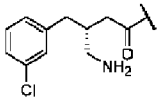
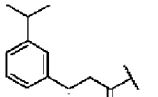
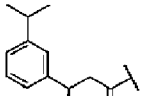
În tabelul 1, un asterisc (*) indică un exemplu de referință.

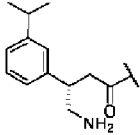
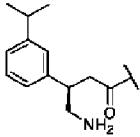
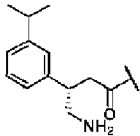
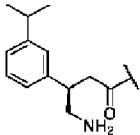
Tabelul 1 - Compuși de exemplu și de referință

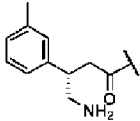
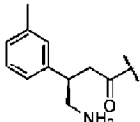
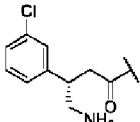
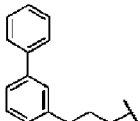
Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC t_R (min.)	m/z
1*	(S)-4-amino-3-(4-clorfenil)butanoil -Thr- Dap- Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82C IN15O12	1143,6	9,6	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
2*	(R)-4-amino-3-(4-clorfenil)butanoil -Thr- Dap- Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82C IN15O12	1143,6	9,7	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
3*	(S)-4-amino-3-(2-clorfenil)butanoil -Thr- Dap- Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82C IN15O12	1143,6	9,1	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
4*	(R)-4-amino-3-(2-clorfenil)butanoil -Thr- Dap- Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82C IN15O12	1143,6	9,4	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺

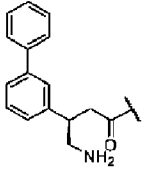
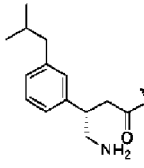
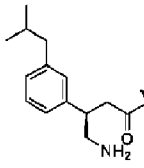
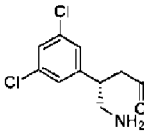
Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC tr (min.)	m/z
5	(S)-4-amino-3-(3-clorfenil)butanoil -Thr- Dap- Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a, 3b	C52H82C IN15O12	1143,6	9,6	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
6	(R)-4-amino-3-(3-clorfenil)butanoil -Thr- Dap- Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a, 3b	C52H82C IN15O12	1143,6	9,8	1145 [MH+] 573 [M+2H] ²⁺
7*	(R)-4-amino-3-benzilbutanoil-Thr-Dap- Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab- Thr]. Izomerul 1		Leu	Leu	3a	C50H87N 15012	1089,7	8,8	1091 [MH+] 546 [M+2H] ²⁺
8*	(S)-4-amino-3-benzilbutanoil-Thr-Dap- Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab- Thr]. Izomerul 2		Leu	Leu	3a	C50H87N 15012	1089,7	9,1	1091 [MH+] 546 [M+2H] ²⁺

Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC t_R (min.)	m/z
9*	(R)-4-amino-3-benzilbutanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Izomerul 1</i>		Phe	Leu	3a	C53H85N 15012	1123,7	10,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
10*	(S)-4-amino-3-benzilbutanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Izomerul 2</i>		Phe	Leu	3a	C53H85N 15012	1123,7	11,0	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
11*	(R)-4-amino-3-(3-clorbenzil)butanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Izomerul 1</i>		Phe	Leu	3a	C53H84ClN IN15012	1157,6	11,0	1159 [MH+] 580 [M+2H] ²⁺
12*	(S)-4-amino-3-(3-clorbenzil)butanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Izomerul 2</i>		Phe	Leu	3a	C53H84ClN IN15012	1157,6	11,4	1159 [MH+] 580 [M+2H] ²⁺

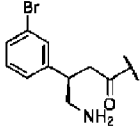
Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC tr (min.)	m/z
13*	(S)-4-amino-3-(3-clorbenzil)butanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Izomerul 2</i>		Leu	Leu	3a	C50H86C IN15O12	1123,6	10,4	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
14*	(R)-4-amino-3-(3-clorbenzil)butanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Izomerul 1</i>		Leu	Leu	3a	C50H86C IN15O12	1123,6	9,9	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
15*	(S)-4-amino-3-(3-izopropilfenil)butanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Leu	3a	C52H91N 15012	1117,7	10,7	1119 [MH+] 560 [M+2H] ²⁺
16*	(R)-4-amino-3-(3-izopropilfenil)butanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Leu	3a	C52H91N 15012	1117,7	10,9	1119 [MH+] 560 [M+2H] ²⁺

Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC tr (min.)	m/z
17*	(S)-4-amino-3-(3-izopropilfenil)butanoil- Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Abu	1	C53H85N 15012	1123,7	9,2	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
18*	(R)-4-amino-3-(3-izopropilfenil)butanoil- Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Abu	1	C53H85N 15012	1123,7	9,4	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
19*	(S)-4-amino-3-(3-izopropilfenil)butanoil- Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Thr-Dab-Dab-Thr]		Leu	Thr	1	C50H87N 15013	1105,7	7,6	1107 [MH+] 554 [M+2H] ²⁺
20*	(R)-4-amino-3-(3-izopropilfenil)butanoil- Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Thr-Dab-Dab-Thr]		Leu	Thr	1	C50H87N 15013	1105,7	7,8	1107 [MH+] 554 [M+2H] ²⁺

Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC t_R (min.)	m/z
21*	(S)-4-amino-3-(<i>m</i> -tolil)butanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C53H85N 15012	1123,7	8,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
22*	(R)-4-amino-3-(<i>m</i> -tolil)butanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C53H85N 15012	1123,7	8,9	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
23*	(S)-4-amino-3-(3-clorfenil)butanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	2	C47H80Cl IN15012	1081,6	9,2	1083 [MH+] 542 [M+2H] ²⁺
24*	(S)-3-([1,1'-bifenil]-3-il)-4-aminobutanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3b	C53H85N 15012	1123,7	8,5	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺

Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC t_r (min.)	m/z
25*	(R)-3-([1,1'-bifenil]-3-il)-4-aminobutanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3b	C53H85N 15012	1123,7	8,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] ²⁺
26*	(S)-4-amino-3-(3-izobutilfenil)butanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H89N 15012	1103,7	8,9	1105 [MH+] 553 [M+2H] ²⁺
27*	(R)-4-amino-3-(3-izobutilfenil)butanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H89N 15012	1103,7	9,1	1105 [MH+] 553 [M+2H] ²⁺
28*	(S)-4-amino-3-(3,5-diclorfenil)butanoil-- Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DnorLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Norleu	Abu	2	C47H79Cl I2N1501 2	1115,5	8,0	1117 [MH+] 559 [M+2H] ²⁺

Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC tr (min.)	m/z
29*	(R)-4-amino-3-(3,5-diclorfenil)butanoil-- Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DnorLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Norleu	Abu	2	C47H79C I2N15O1 2	1115,5	8,1	1117 [MH+] 559 [M+2H] ²⁺
30*	(S)-4-amino-3-(3-(tiofen-3-il)fenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H83N 15O12S	1129,6	8,4	1131 [MH+] 566 [M+2H] ²⁺
31*	(R)-4-amino-3-(3-(tiofen-3-il)fenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H83N 15O12S	1129,6	8,5	566 [M+2H] ²⁺
32*	(S)-4-amino-3-(3-bromfenil)butanoil -Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C47H80B rN15O12	1125,5	7,1	1128 [MH+] 564 [M+2H] ²⁺

Ex.	Denumire	-R	AA-6	AA-7	Metoda generală	Formulă	Masa	HPLC t_R (min.)	m/z
33*	(R)-4-amino-3-(3-bromfenil)butanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr].		Leu	Abu	3a	C ₄₇ H ₈₀ B rN15O12	1125,5	7,5	1128 [MH+] 564 [M+2H] ²⁺

Rezultate biologice

Compușii din invenție și compușii de referință au fost testați, iar rezultatele au fost comparate cu exemple comparative, care includ compuși raportați anterior în domeniu.

5

Determinarea MIC

Inoculul a fost preparat prin realizarea unei suspensii directe de colonii izolate (selectate dintr-o placă de agar Mueller-Hinton de 18-24 ore) ajustată la standardul McFarland de 0,5. Testarea MIC a fost efectuată prin diluții în serie de antibiotice de două ori în bulion Mueller-Hinton ajustat cu cationi în plăci de microtitrare sterile cu 96 de godeuri, într-un volum total de 170 μL (150 μL de bulion care conține agentul antimicrobian, 20 μL de inocul). Testele au fost efectuate în dublu exemplar. Plăcile au fost incubate aerob fără agitare timp de 18-20 ore la 35°C cu MIC definită ca cea mai scăzută concentrație de medicament care a împiedicat creșterea vizibilă. Câțiva dintre compuși au fost supuși la mai multe teste, iar atunci când este cazul, MIC prezentată este valoarea mediană obținută. Valorile MIC sunt exprimate în $\mu\text{g/mL}$.

15

Test de toxicitate in vitro pentru celule renale

Testul de toxicitate *in vitro* pentru celule renale a fost efectuat conform următorului protocol.

Celule HK-2 au fost menținute și testate în mediu Keratinocyte-SFM suplimentat cu 5 ng/ml factor de creștere epidermică (EGF) și 50 $\mu\text{g/mL}$ de extract hipofizar bovin (BPE). Celulele au fost însămânțate la 7500 de celule în fiecare godeu în plăci cu 96 de godeuri și au fost lăsate să adere peste noapte. Polimixină B (PMB) și compuși de testare au fost dizolvate în 10% DMSO în apă pentru a se obține o soluție stoc de 20 și, respectiv, 60 mg/mL. Compușii de testare au fost diluați pentru a se obține o concentrație maximă de 3000 sau 1000 $\mu\text{g/ml}$ cu diluții semi-log pentru a se obține un interval de concentrație de 9 puncte plus vehicul de control. PMB a fost de asemenea diluat pentru a se obține o concentrație maximă de 1000 $\mu\text{g/ml}$ cu diluții semi-log. Nivelurile de apă și DMSO au fost menținute constante la 5% și, respectiv, 0,5%. Compușii de testare au fost incubati cu celule timp de 24 de ore la 37°C, 5% CO₂ într-o atmosferă cu umiditate. CellTiter-Blue a fost diluat în PBS (1:4) și au fost adăugate 20% (v/v) și au fost incubate la 37°C timp de 2 ore înainte ca produsul fluorescent să fie detectat.

20

25

Numai valorile medii de fundal au fost scăzute înainte ca datele să fie analizate folosind GraphPad Prism. Valorile individuale pentru fiecare compus au fost normalizate la godeurile cu vehicul de control. Valorile concentrației de compus au fost reprezentate grafic ca valori log pentru a permite ajustarea unei curbe doză-răspuns. Partea de jos a curbei a fost restricționată la zero și au fost determinate valorile IC₅₀.

30

Valorile IC₅₀ sunt exprimate în raport cu cele pentru PMB în același experiment. Atunci când s-au făcut mai multe determinări, au fost prezentate valorile mediane.

35

Măsurători ale nivelului în rinichi la patru ore

Compuși au fost administrați subcutanat la 17,2 mg de bază liberă/kg la șoareci (n = 2 sau 3). La patru ore după administrare, animalele au fost eutanasiate și rinichii au fost îndepărtați, au fost tăiați din grăsime și din țesut conjunctiv, au fost cântăriți și congelați imediat. După dezghețare la temperatura camerei, perechi de rinichi de la fiecare animal au fost plasați în tuburi conice de 2 ml care conțineau granule de oxid de zirconiu stabilizate cu ceria cântărite în prealabil. Au fost adăugate acid trifluoracetic, TFA (0,25 ml, 0,15% v/v în apă) și tuburile au fost încărcate pe un omogenizator FastPrep-24 (MP Biomedicals Europe) și au fost supuse la 3 cicluri de 30 de secunde fiecare la o viteză de 6 m/sec. O alicotă (200 μL) de omogenat a fost diluată cu un volum calculat de soluție de TFA (0,15% v/v în apă) pentru a se obține o concentrație finală de 0,167 grame de rinichi/gram de omogenat.

40

45

Omogenate de rinichi (100 μL) au fost amestecate cu metanol (190 μL) și TFA (110 μL , 10% v/v în apă) și au fost depozitate peste noapte la -20°C pentru precipitarea proteinei. După 10 min de centrifugare la 13000 rpm și la 6°C, 200 μL de supernatanți au fost transferați în inserții de sticlă și au fost analizați prin LC-MS-MS.

Tabelul 2 - Rezultate biologice

Ex.	AlogP	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>		HK-2 rel la PMB	Nivel în rinichi la 4 ore (µg/g)*	Nivel în rinichi la 4 ore/Rel HK-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
1*	-6,3	4	0,125	8	0,125	0,25	0,06	0,06	0,06	8,8	267	30
2*	-6,3	8	0,25	2	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	7,2	538	75
3*	-6,3	32	1	65	0,5	0,5	0,5	1	2	ND	ND	ND
4*	-6,3	16	0,5	16	0,25	0,5	0,25	1	1	ND	ND	ND
5	-6,3	8	0,125	16	0,125	0,25	0,25	0,06	0,125	11,6	170	15
6	-6,3	8	0,125	8	0,125	0,5	0,125	0,5	0,5	7,8	381	49
7*	-6,9	16	0,25	32	ND	0,25	0,125	0,125	0,125	ND	ND	ND
8*	-6,9	16	0,125	32	ND	0,5	0,06	0,25	0,125	ND	ND	ND
9*	-6,5	8	0,25	64	0,25	0,5	0,125	0,125	0,25	12,0	159	13
10*	-6,5	8	0,125	16	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25	8	346	43
11*	-5,9	4	0,5	16	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	5,2	163	32
12*	-5,9	4	0,5	8	0,5	0,5	0,125	0,25	0,25	ND	ND	ND
13*	-6,2	8	0,5	16	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	ND	ND	ND
14*	-6,2	8	1	32	0,5	1	0,5	0,5	0,5	ND	ND	ND
15*	-6,1	4	0,125	16	0,125	0,5	0,25	0,06	0,06	52,1	443	8,5
16*	-6,1	16	0,5	8	0,25	1	0,5	0,5	0,5	ND	ND	ND
17*	-6,5	8	0,125	16	0,125	0,25	0,125	0,06	0,06	29,0	231	8
18*	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	32,8	535	16,3
19*	-7,9	32	0,25	64	0,25	1	0,25	0,25	0,25	101,4	386	4
20*	-7,9	64	1	64	2	2	0,5	1	2	ND	ND	ND
21*	-6,5	16	0,125	32	0,25	0,5	0,25	0,125	0,125	267	209	8

Ex.	AlogP	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>		HK-2 rel la PMB	Nivel în rinichi la 4 ore (µg/g)*	Nivel în rinichi la 4 ore/Rel HK-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
23*	-7,4	32	0,125	64	0,125	0,5	0,25	0,125	ND	>41	263	<6,4
22*	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,5	0,25	1	1	ND	ND	ND
24*	-6,5	4	0,125	16	0,25	0,25	0,125	0,06	0,03	21,8	203	9
25*	-6,5	16	0,25	2	0,5	0,5	0,25	0,125	0,125	ND	ND	ND
26*	-6,4	8	0,06	8	0,5	0,5	0,25	0,03	0,06	>58	353	<6,1
27*	-6,4	16	0,25	2	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	ND	ND	ND
28*	-6,5	16	0,125	8	0,125	0,25	0,25	0,06	0,125	68,5	408	6,0
29*	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,5	0,25	0,125	0,125	ND	ND	ND
30*	-6,8	8	0,125	16	0,125	0,5	0,25	0,06	ND	37,5	252	6,7
31*	-6,8	16	0,125	4	0,25	0,25	0,25	0,125	ND	ND	ND	ND
32*	-7,3	32	0,25	32	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125	ND	ND	ND
33*	-7,3	64	0,5	16	0,5	0,5	0,5	1	1	ND	ND	ND

ND - nedeterminat (netestat)

* - Compus de referință

Date biologice suplimentare*Compararea toxicității renale cu Exemplul 5 și cu exemplele de referință D77 și 38*

5

La șoareci (n = 6) au fost administrate subcutanat de trei ori pe zi Polimixină B, sulfat de colistină, Exemplul de referință D77, Exemplul de referință 38 sau Exemplul 5, la 17,2 mg de bază liberă/kg. Începând imediat după prima doză în ziua 4, șoarecii au fost transferați în cuști metabolice individuale și urina a fost colectată în următoarele 24 de ore pentru determinarea nivelurilor de biomarker (albumină, cistatină C, KIM-1). Medii geometrice ale nivelurilor de biomarkeri sunt prezentate în tabelul de mai jos:

10

Compus	Albumină (μg/24 ore)	Cistatină C (ng/24 ore)	KIM-1 (ng/24 ore)
PMB	1.154 – 1.912	1.155 – 1.400	4 - 22
Colistină	2.353 – 2.548	1.266 – 1.678	42 - 89
Exemplu de referință D77	3.639	7.542	130
Exemplu de referință 38	2.362	14.015	79
Exemplul 5	1.004	827	3

15

Valorile PMB arată intervalul din 4 experimente și colistina din 2 experimente.

Creșterea albuminei, cistatinei C sau KIM-1 în urină sunt semne de deteriorare renală. Exemplul 5 a arătat cele mai scăzute niveluri dintre toți cei 3 biomarkeri ai toxicității renale.

Exemplul de referință D77 este descris în WO 2015/135976. Exemplul de referință 38 este descris în WO 2016/083531.

20

Compararea toxicității renale - Exemplele 5, 9 și 17

25

La șoareci (n = 6) au fost administrate subcutanat patru doze de PMB, Exemplul 5, Exemplul de referință 9 sau Exemplul de referință 17, la 25 mg de bază liberă/kg, la intervale de 8 ore. După a patra doză, animalele au fost transferate în cuști metabolice individuale și urina a fost colectată timp de 24 de ore pentru determinarea biomarkerilor urinari. După colectarea urinei, șoarecii au fost eutanasiați și rinichii au fost recoltați pentru histopatologie.

Compus	Albumină (μg/24 ore)	Cistatină C (ng/24 ore)	KIM-1 (ng/24 ore)
PMB	1.147	1.425	58
Exemplul 5	343	448	1
Exemplul de referință 9	749	754	2

30

Niciunul dintre animalele din grupurile cu Exemplul 5 sau cu Exemplul de referință 9 nu au prezentat la histopatologie semne de degenerare sau regenerare. În contrast, toate cele 6 animale tratate cu PMB au prezentat o regenerare tubulară minimă.

Într-un experiment separat, Exemplul de referință 17 a fost comparat cu PMB.

Compus	Creștere în comparație cu vehiculul de control		
	Albumină	Cistatină C	KIM-1
PMB	29 ×	2 ×	771 ×
Exemplul de referință 17	2,7 ×	1,8 ×	4,7 ×

Au fost evaluate, de asemenea, semnele histopatologice:

	PMB	Exemplul de referință 17
Degenerescență/necroză tubulară	4 normal/1 minim	Toate normale
Tubuli bazofili	4 minim/1 ușor	3 normal/2 minim

Comparație dintre toxicitatea renală a exemplului 5 și cu PMB la maimuță Cynomolgus

La masculi de maimuță Cynomolgus (n = 3) a fost administrat Exemplul 5 prin perfuzie intravenoasă timp de 1 oră la 20 mg/kg/doză, de 3 ori pe zi timp de 7 zile. Într-un experiment separat, la masculi de maimuță (n = 3) a fost administrat PMB aceeași perioadă la 4mg/kg/doză. În ambele experimente, la animale de control a fost administrat ser fiziologic de 3 ori pe zi.

La sfârșitul perioadei de 7 zile, a fost prelevat sânge și au fost determinate nivelurile serice de azot ureic și creatinină din sânge ca indicatori ai deteriorării renale. În cazul Exemplului 5, nivelurile medii de BUN și creatinină au fost crescute cu mai puțin decât 50% comparativ cu cele ale animalelor de control cu soluție salină. Cu toate acestea, la animalele cărora le-a fost administrat PMB, nivelul de BUN a fost crescut cu 76% în comparație cu cel al animalele de control, iar nivelul de creatinină a fost de 2,6 × mai mare.

Rinichii au fost recoltați la sfârșitul perioadei de administrare de 7 zile și au fost examinați microscopic. Dintre cele trei animale tratate cu PMB, 2 au prezentat degenerare tubulară ușoară și 1 minimă. Dintre animalele tratate cu Exemplul 5, 1 a prezentat o degenerare tubulară ușoară și 2 au prezentat o degenerare minimă.

Doza din aceste experimente a fost de 5 x mai mare cu Exemplul 5 decât cu PMB, dar semnele de toxicitate renală au fost reduse. Expunerea la medicament dintr-un ciclu de administrare, în ziua 7 de administrare (AUC_{0-8 ore}) a fost de 234 μg.ora/mL pentru Exemplul 5 și 117 μg.ora/mL pentru PMB.

Eficacitatea compușilor într-un model neutropenic de coapsă murină infectat cu E. coli ATCC 25922

După ce au fost neutropenici (ciclofosfamidă 150 mg/kg ziua-4, 100 mg/kg ziua-1), șoareci CD-1 (n = 5) au fost inoculați în fiecare coapsă cu aproximativ 10⁵ cfu de *E. coli* ATCC25922. La șoareci au fost administrate IV 0,125, 0,5 și 3 mg/kg de sulfat de PMB sau de compus de testare (greutate echivalentă de bază liberă) la 1, 3,5 și 6 ore după infectare. La 9 ore după infectare, șoarecii au fost eutanasiați și coapsele au fost pregătite pentru numărarea coloniilor.

Scăderea numărului de colonii în raport cu un vehicul de control este arătată în tabelul de mai jos. În fiecare caz, scăderea observată cu PMB în același experiment este arătată în paranteze:

Compus	Scădere log, în cfu, în comparație cu vehiculul de control		
	0,125 mg/kg	0,5 mg/kg	3 mg/kg
Exemplul 5	0,1 (0,4)	2,2 (2,6)	3,4 (3,5)
Exemplul de referință 9	0,1 (0,4)	0,5 (0,6)	3,7 (3,9)
Exemplul de referință 17	0 (0,1)	1,3 (1,1)	3,7 (3,7)
Exemplul de referință 24	0 (0)	0,4 (0,5)	2,4 (2,9)

Toți compușii au fost la fel de eficienți ca PMB.

Eficacitatea compușilor într-un model neutropenic de coapsă murină infectat cu K. Pneumoniae ATCC 43816

După ce au fost neutropenici (ciclofosfamidă 150 mg/kg ziua-4, 100 mg/kg ziua-1), șoareci CD-1 (n = 5) au fost inoculați în fiecare coapsă cu aproximativ 10⁵ cfu de *K. pneumoniae* ATCC43816. La șoareci au fost administrate IV doze adecvate de sulfat de PMB sau de compus de testare (greutate

echivalentă de bază liberă) la 2, 6 și 10 ore după infectare. La 16 ore după infectare, șoarecii au fost eutanasiați și coapsele au fost pregătite pentru numărarea coloniilor.

Scăderea numărului de colonii în raport cu un vehicul de control este arătată în tabelul de mai jos. În fiecare caz, scăderea observată cu PMB în același experiment este arătată în paranteze:

5

Doză (mg/kg)	Scădere log, în cfu, în comparație cu vehiculul de control	
	Exemplul 5	Exemplul de referință 24
0,125	0 (0,2)	0 (0,2)
0,25	ND	0,2 (0,2)
0,5	4,8 (4,9)	0,2 (0,9)
1	4,8 (5,2)	ND
2	ND	4,7 (4,0)
4	5,3 (5,6)	ND

ND = Nedeterminat

Ambii compuși au fost la fel de eficienți ca PMB.

10

Eficacitatea compușilor într-un model neutropenic de coapsă murină infectat cu A. baumannii NCTC13301

După ce au fost neutropenici (ciclofosamidă 150 mg/kg ziua-4, 100 mg/kg ziua-1), șoarecii CD-1 (n = 5) au fost inoculați în fiecare coapsă cu aproximativ 105 cfu de *A. baumannii* NCTC13301. La 15 șoarecii au fost administrate IV 0,125, 0,5, 1 și 4 mg/kg de sulfat de PMB sau de compus de testare (greutate echivalentă de bază liberă) la 2, 6 și 10 ore după infectare. La 16 ore după infectare, șoarecii au fost eutanasiați și coapsele au fost pregătite pentru numărarea coloniilor.

Scăderea numărului de colonii în raport cu un vehicul de control este arătată în tabelul de mai jos. În fiecare caz, scăderea observată cu PMB în același experiment este arătată în paranteze:

20

Doza (mg/kg)	Scădere log, în cfu, în comparație cu vehiculul de control	
	Exemplul 5	Exemplul de referință 24
0,125	0,4 (0,3)	0,1 (0,1)
0,5	3,1 (4,2)	2,2 (4,1)
1	6,7 (5,8)	5,5 (5,0)
4	7,4 (6,5)	5,7 (5,3)

Ambii compuși au fost la fel de eficienți ca PMB.

25

Eficacitatea compușilor într-un model neutropenic de plămân murin infectat cu A. baumannii NCTC13301

După ce au fost neutropenici (ciclofosamidă 200 mg/kg ziua-4, 150 mg/kg ziua-1), șoarecii CD-1 (n = 8) au fost inoculați intranasal cu aproximativ 107 cfu în fiecare plămân cu *A. baumannii* NCTC13301. La șoarecii a fost administrat SC sulfat de PMB (20 mg/kg) sau doze adecvate de compus de testare (greutate echivalentă de bază liberă) la 2, 6 și 10 ore după infectare. La 16 ore după infectare, șoarecii au fost eutanasiați și plămânii au fost pregătiți pentru numărarea coloniilor.

Scăderea numărului de colonii în raport cu un vehicul de control este arătată în tabelul de mai jos. În fiecare caz, scăderea observată cu PMB în același experiment este arătată în paranteze:

35

Doză (mg/kg)	Scădere log, în cfu, în comparație cu vehiculul de control	
	Exemplul 5	Ref. Exemplul 24
2,5	0	0,9
10	0	1,6
20	2,5 (0)	2,7 (0)
30	4,0	3,9

PMB nu a fost eficient în acest model la doza maximă tolerată. Exemplul 5 a fost mai eficient la 20 mg/kg și ar putea fi administrat, de asemenea, la niveluri mai mari pentru a obține un efect mai mare datorită toxicității reduse.

5

Eficacitatea compuşilor într-un model neutropenic de plămân murin infectat cu P. aeruginosa ATCC 27853

După ce au fost neutropenici (ciclofosfamidă 200 mg/kg ziua-4, 150 mg/kg ziua-1), șoareci CD-1 (n = 8) au fost inoculați intranasal cu 10⁴ - 10⁵ cfu în fiecare plămân cu *P. aeruginosa* ATCC27853. La șoareci au fost administrate SC doze adecvate de sulfat de PMB sau de compus de testare (greutate echivalentă de bază liberă) la 2, 6 și 10 ore după infectare. La 16 ore după infectare, șoarecii au fost eutanasiați și plămânii au fost pregătiți pentru numărarea coloniilor.

10

Scăderea numărului de colonii în raport cu un vehicul de control este arătată în tabelul de mai jos. În fiecare caz, scăderea observată cu PMB în același experiment este arătată în paranteze:

15

Doză (mg/kg)	Scădere log, în cfu, în comparație cu vehiculul de control	
	Exemplul 5	Exemplul de referință 24
2,5	0 (0)	0,8 (0,3)
5	0 (0)	ND
7,5	ND	3,2 (1,0)
10	2 (0,7)	ND
20	3,6 (2,6)	4,4 (3,7)
40	ND	5,7

ND = Nedeterminat

Ambii compuși au arătat o eficacitate superioară față de PMB în acest model.

Valorile MIC cu Exemplul 5 în prezența Rifampicinei

20

Organism	Colecția de tulpini nr.	Genotip de rezistență cunoscut	Polimixină B (PMB)	PMB+Rif (1 µg/mL)	Exemplul 5	Ex. 5+Rif (1 µg/mL)
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	NA	0,25	≤0,015	0,125	≤0,015
	CDF-1	MCR-1	4	0,06	8	0,06
	IHMA 940398	NA	16	0,06	32	0,125
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13882	NA	0,25	0,06	0,125	0,06
	IHMA 580884	NA	8	0,06	16	0,125

Organism	Colecția de tulpini nr.	Genotip de rezistență cunoscut	Polimixină B (PMB)	PMB+Rif (1 µg/mL)	Exemplul 5	Ex. 5+Rif (1 µg/mL)
	IHMA 520329	SHV-12, KPC-2	64	0,125	>64	0,06
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	NA	0,5	0,125	0,25	0,125
	IHMA 517175	NA	8	0,25	8	0,5
	IHMA 644636	NA	32	0,5	32	1
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	OXA-23	0,25	≤0,015	0,06	≤0,015
	IHMA 851735	OXA-23	8	0,03	0,25	≤0,015
	IHMA 517303	NA	>64	0,125	>64	0,03

Valorile MIC (µg/mL) au fost determinate prin microdiluție în bulion în condiții CLSI.

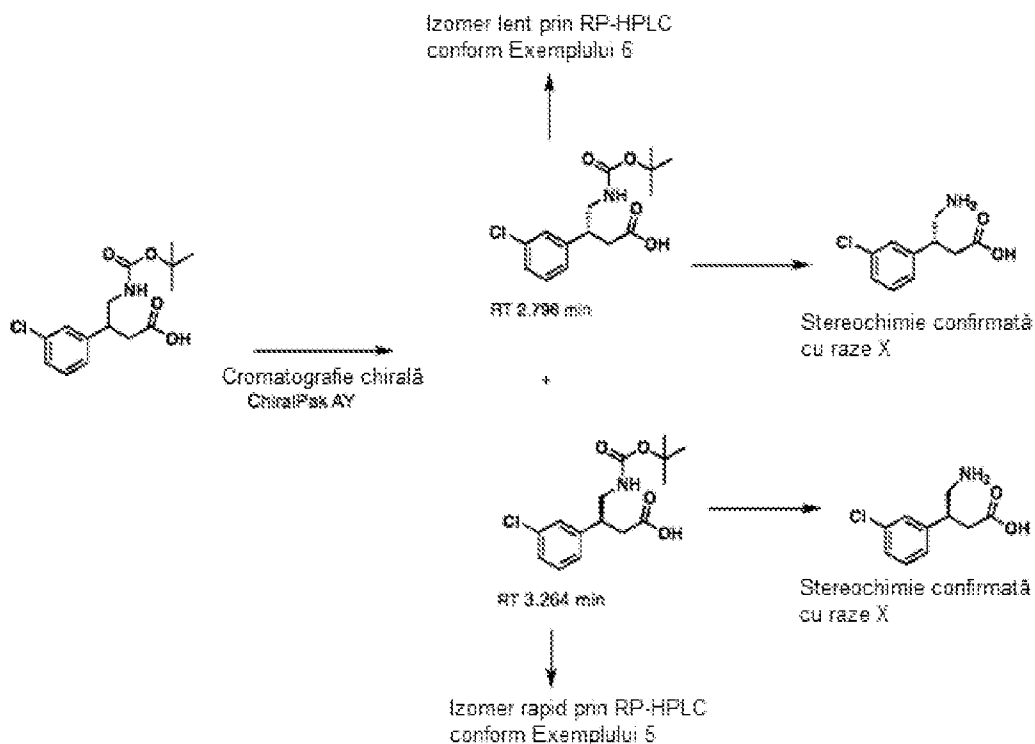
5 Atât PMB cât și Exemplul 5 prezintă o sinergie puternică cu rifampicina chiar și împotriva tulpinilor cu sensibilitate redusă la polimixine.

Studiu de stereochimie

10 Compușii din invenție conțin un stereocentru în poziția β a grupării γ-aminopropil din fragmentul N-terminal. În mod surprinzător, s-a descoperit că unul dintre stereoizomerii aflați în această poziție este asociat de obicei cu o citotoxicitate mai mică și cu niveluri mai scăzute de medicament în rinichi. Acesta este stereoizomerul care eluează mai rapid la cromatografia în fază inversă.

15 De exemplu, în perechea de diastereoizomeri referitoare la Exemplele 5 și 6, diastereoimerul care eluează mai rapid dintr-o coloană HPLC în fază inversă prezintă o expunere renală mai mică și o citotoxicitate mai mică decât izomerul corespondent mai lent. Diastereoimerul mai rapid (Exemplul 5) este derivat din acid (S)-4-amino-3-(3-clorfenil) butanoic, prin analiza cu raze X a moleculelor mici ale aminoacidului corespondent (așa cum este arătat în schema de mai jos).

Schema 1

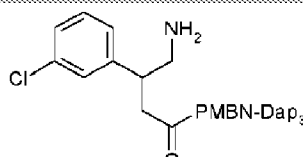
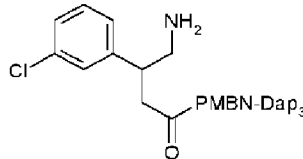
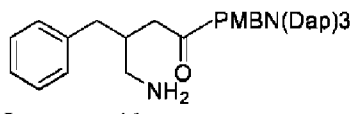
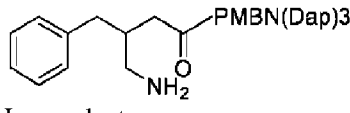


Alte comparații sunt arătate în Tabelul 3 de mai jos. Diastereomerii (epimeri din gruparea de capăt N-terminal) care eluează mai rapid în cromatografia în fază inversă și care au deplasări chimice RMN similare cu cele date pentru Exemplul 5, este probabil să aibă aceeași stereochemie absolută ca și Exemplul 5, așa cum este descris mai sus.

Stereochimia absolută atribuită fiecăruia dintre compușii din Tabelul 3 este arătată în Tabelul 1. Exemplele de referință sunt marcate cu un asterisc (*).

Tabelul 3 - Rezultate de stereochemie

Exemplu	Structură	Citotoxicitate	Nivel medicament rinichi	de în ore/ Nivel în rinichi la 4 ore/ citotoxicitate relativă
1*	<p>Izomer „rapid”.</p>	8,8	268	30
2*	<p>Izomer „lent”.</p>	7,2	538	75
5		11,6	170	15

Exemplu	Structură	Citotoxicitate	Nivel de medicament în rinichi	de în ore/ Nivel în rinichi la 4 ore/ citotoxicitate relativă
	 <p>Izomer „rapid”.</p>			
6	 <p>Izomer „lent”.</p>	7,8	381	49
9*	 <p>Izomer rapid</p>	12,0	159	13
10*	 <p>Izomer lent</p>	8,0	346	43

Citotoxicitatea se referă la IC₅₀ măsurată, în comparație cu cea înregistrată pentru Polimixină B, împotriva unei linii de celule HK-2.

5 Nivelul de medicament se referă la cantitatea de compus găsită în rinichi la 4 ore după o doză sc de 17,2 mg/kg (μg/g) într-un model de șoarece.

Date suplimentare

10 Toxicitatea renală a exemplului de referință 24 în comparație cu cea a PMB după patru doze, la șoarece

15 La grupuri de șoareci masculi CD-1 (n = 5) au fost administrate subcutanat de patru ori la intervale de 8 ore, fie Polimixină B (PMB) la 12,5 sau 25 mg de bază liberă/kg, fie compusul din Exemplul de referință 24, la 25, 50 sau 75 mg de bază liberă/kg. Imediat după a patra doză, șoarecii au fost transferați în cuști metabolice și urina a fost colectată timp de 24 de ore pentru determinarea biomarkerilor urinari. După colectarea urinei, șoarecii au fost sacrificați pentru histopatologie renală. Nivelurile medii ale biomarkerilor sunt arătate în Tabelul 4 de mai jos.

Tabelul 4 - Biomarkeri urinari

Compus	Doză (mg/kg)	Biomarkeri urinari				
		Cistatină C	β-2 microglobuline	Kim-1	NGAL	Albumină
Vehicul	-	22,24	0,05	17,01	0,00	3,44
PMB	12,5	29,45	3,43	21,89	0,30	3,75
PMB	25	44,51	43,83	3.446,42	4,37	7,73
Ex 24	25	31,04	0,05	27,61	0,00	4,78

Compus	Doză (mg/kg)	Biomarkeri urinari				
		Cistatină C	β -2 microglobuline	Kim-1	NGAL	Albumină
Ex 24	50	33,97	13,22	171,59	0,63	6,95
Ex 24	75	81,44	68,51	1.203,41	3,71	10,93

Biomarkerii urinari au fost normalizați la creatinina urinară.

Pentru toți cei cinci biomarkeri, la 50 mg/kg, expresia de Exemplul de referință 24 a fost mai mică decât la 25 mg/kg de PMB, și pentru doi (Kim-1, NGAL) din cei cinci biomarkeri expresia la doză de 75 mg/kg a fost mai mică decât pentru PMB la 25 mg/kg.

Rezultatele histopatologice sunt arătate în Tabelul 5 de mai jos.

Tabelul 5 - Rezultate histopatologice

Compus	Doză (mg/kg)	Histopatologie		
		Degenerescență tubulară/necroză	Tubuli bazofili (cortex)	Cifrele mitotice au crescut
Vehicul	-	0/5	0/5	0/5
PMB	12,5	0/5	0/5	0/5
PMB	25	5/5 (2 minim /2 ușoară /1 moderată*)	5/5 (1 minim /2 ușor/2 moderat*)	3/5 (2 minim /1 ușor)
Ex. 24	25	0/5	0/5	0/5
Ex. 24	50	2/5 (2 minim)	2/5 (2 minim)	2/5 (2 minim)
Ex. 24	75	5/5 (1 minim /3 ușoară/1 moderată))	5/5 (2 minim /1 ușor /1 moderat /1 marcat)	5/5 (5 minim)

* Un animal a murit în timpul studiului

Histopatologia renală la doza de 50 mg/kg de Exemplul de referință 24 a fost mai puțin severă decât cea la o doză de 25 mg/kg de PMB, și histopatologia renală a fost similară la o doză de 75 mg/kg de Exemplul 24, în comparație cu cea la o doză de 25 mg/kg de PMB.

Referințe

de Visser și colab. J. Peptide Res, 61, 2003, 298

Dolomanov și colab. J. Appl. Cryst. 42, 2009, 339

Felluga și colab. Tetrahedron Asymmetry, 19, 2008, 945

Sheldrick Acta Cryst. A71, 2015, 3-8

Sheldrick Acta Cryst. C71, 2015, 3-8

Vaara și colab. Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 52, 2008. 3229

Velkov și colab. ACS Chem. Biol. 9, 2014, 1172

Velkov și colab. ACS Chem. Biol. 9, 2014, 1172

WO 2014/188178

WO 2016/083531

WO 2013/072695

WO 2015/135976

WO 2017/054047

US 2012/316105

WO 2016/166103

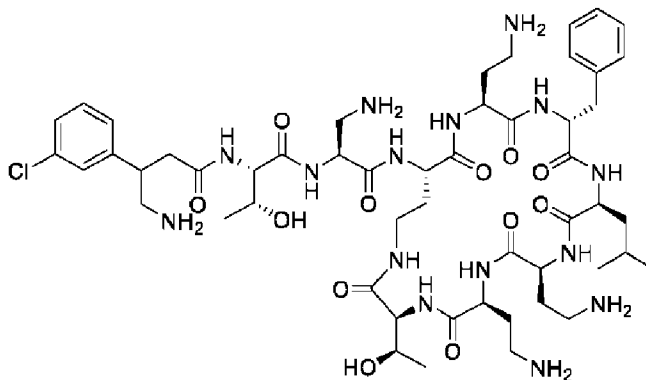
Koh și colab. Aminoacizi 2017, 49, 1653

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- KOH JUN-JIE ET AL: "Recent advances in synthetic lipopeptides as anti-microbial agents: designs and synthetic approaches", AMINO ACIDS, SPRINGER VERLAG, AU, vol. 49, no. 10, 19 August 2017 (2017-08-19), pages 1653-1677, XP036320623, ISSN: 0939-4451, DOI: 10.1007/S00726-017-2476-4 [retrieved on 2017-08-19]
- WO-A1-2015/135976
- WO-A1-2016/083531
- WO-A1-2016/166103
- WO-A1-2017/054047
- US-A1- 2012 316 105

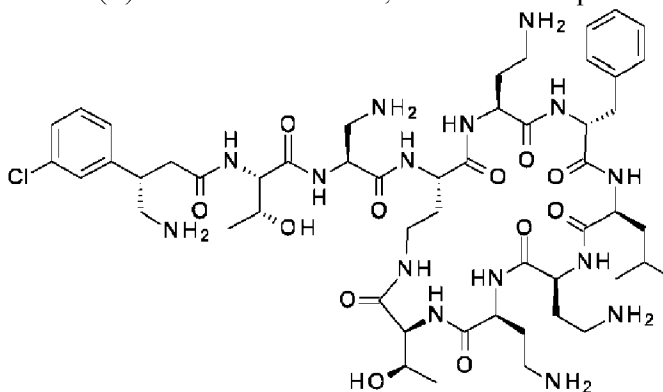
(57) Revendicări:

1. Un compus cu formula (II):



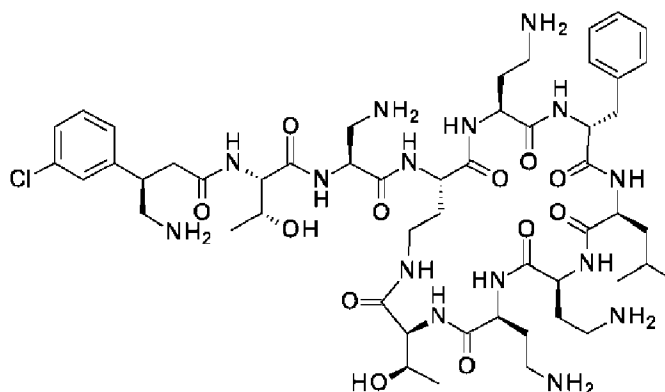
și săruri, solvați și forme protejate ale acestuia.

2. Un compus cu formula (II) conform revendicării 1, care este un compus:



și săruri, solvați și forme protejate ale acestuia.

3. Un compus cu formula (II) conform revendicării 1, care este un compus:



și săruri, solvați și forme protejate ale acestuia.

4. O compoziție farmaceutică care cuprinde un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, opțional împreună cu unul sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic.

5. Un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, sau o compoziție farmaceutică conform revendicării 4, pentru utilizare într-o metodă de tratament sau profilaxie.

6. Un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, sau o compoziție farmaceutică conform revendicării 4, pentru utilizare într-o metodă de tratare a unei infecții microbiene, cum ar fi o infecție bacteriană.

7. Un compus sau compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 6, în care infecția microbiană este o infecție bacteriană Gram-negativă, cum ar fi o infecție cu o bacterie Gram-negativă selectată dintre *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Yersinia pseudotuberculosis* și alte Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio*, bacterii cu acid acetic, *Legionella* și alfa-proteobacterii.