

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
27. Oktober 2005 (27.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/100380 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 5/06, A61K 38/05, A61P 31/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/003463
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
2. April 2005 (02.04.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 018 405.4 16. April 2004 (16.04.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER HEALTHCARE AG [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ENDERMANN, Rainer [DE/DE]; In den Birken 152a, 42113 Wuppertal (DE). EHLERT, Kerstin [DE/DE]; Auf den Pöthen 51, 42553 Velbert (DE). RADDATZ, Siegfried [DE/DE]; Jakob-Böhme-Str. 21, 51065 Köln (DE). CANCHO-GRANDE, Yolanda [ES/DE]; Lindenstr. 28, 40723 Hilden (DE). MICHELS, Martin [DE/DE]; Nibelungenstr. 65, 42653 Solingen (DE). SCHUHMACHER, Joachim [DE/DE]; Am Ringelbusch 12 b, 42113 Wuppertal (DE). WEIGAND, Stefan [DE/DE]; Rückertweg 53, 42115 Wuppertal (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER HEALTHCARE AG; Law and Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**  
— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 2005/100380 A1

(54) Title: ANTIBACTERIAL AMIDE MACROCYCLES II

(54) Bezeichnung: ANTIBAKTERIELLE AMID-MAKROZYKLEN II

(57) Abstract: The invention relates to antibacterial amide macrocycles and to methods for their production. The invention also relates to their use in the treatment and/or prophylaxis of diseases and to their use for producing drugs for use in the treatment and/or prophylaxis of diseases, especially of bacterial infections.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft antibakterielle Amid-Makrozyklen und Verfahren zu ihrer Herstellung, ihre Verwendung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten sowie ihre Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, insbesondere von bakteriellen Infektionen.

### Antibakterielle Amid-Makrozyklen II

Die Erfindung betrifft antibakterielle Amid-Makrozyklen und Verfahren zu ihrer Herstellung, ihre Verwendung zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten sowie ihre Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, insbesondere von bakteriellen Infektionen.

In WO 03/106480 und WO 04/012816 werden antibakteriell wirkende Makrozyklen vom Biphenomycin B Typ mit Amid- bzw. Estersubstituenten beschrieben.

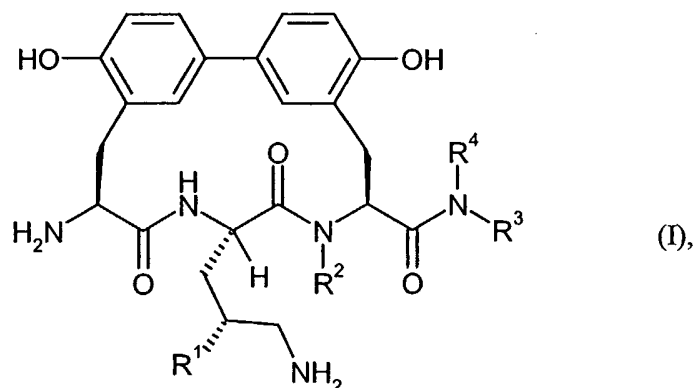
In US 3,452,136, Dissertation R. U. Meyer, Universität Stuttgart, Deutschland 1991, Dissertation V. Leitenberger, Universität Stuttgart, Deutschland 1991, Synthesis (1992), (10), 1025-30, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1992), (1), 123-30, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1991), (10), 744, Synthesis (1991), (5), 409-13, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1991), (5), 275-7, J. Antibiot. (1985), 38(11), 1462-8, J. Antibiot. (1985), 38(11), 1453-61, wird der Naturstoff Biphenomycin B als antibakteriell wirksam beschrieben. Teilschritte der Synthese von Biphenomycin B werden in Synlett (2003), 4, 522-526 beschrieben.

Chirality (1995), 7(4), 181-92, J. Antibiot. (1991), 44(6), 674-7, J. Am. Chem. Soc. (1989), 111(19), 7323-7, J. Am. Chem. Soc. (1989), 111(19), 7328-33, J. Org. Chem. (1987), 52(24), 5435-7, Anal. Biochem. (1987), 165(1), 108-13, J. Org. Chem. (1985), 50(8), 1341-2, J. Antibiot. (1993), 46(3), C-2, J. Antibiot. (1993), 46(1), 135-40, Synthesis (1992), (12), 1248-54, Appl. Environ. Microbiol. (1992), 58(12), 3879-82, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1992), (13), 951-3 beschreiben einen strukturell verwandten Naturstoff, Biphenomycin A, der am Makrozyklus eine weitere Substitution mit einer Hydroxygruppe aufweist.

Die Naturstoffe entsprechen hinsichtlich ihrer Eigenschaften nicht den Anforderungen, die an antibakterielle Arzneimittel gestellt werden. Auf dem Markt sind zwar strukturell andersartige antibakteriell wirkende Mittel vorhanden, es kann aber regelmäßig zu einer Resistenzentwicklung kommen. Neue Mittel für eine gute und wirksamere Therapie sind daher wünschenswert.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, neue und alternative Verbindungen mit gleicher oder verbesserter antibakterieller Wirkung zur Behandlung von bakteriellen Erkrankungen bei Menschen und Tieren zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der Formel



in welcher

R<sup>1</sup> gleich Wasserstoff oder Hydroxy ist,

R<sup>2</sup> gleich Wasserstoff oder Methyl ist,

5 R<sup>3</sup> gleich C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl bedeutet,

wobei Alkyl substituiert ist mit einem Substituenten, wobei der Substituent ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Hydroxycarbonyl, Aminocarbonyl, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-carbonyl und C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylaminocarbonyl,

10

worin Alkylaminocarbonyl substituiert sein kann mit einem Substituenten, wobei der Substituent ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Hydroxycarbonyl, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-carbonyl und Aminocarbonyl,

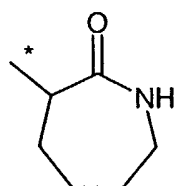
und

15

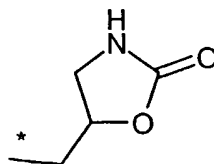
wobei Alkyl substituiert sein kann mit einem oder zwei weiteren Substituenten, wobei die Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Amino, Hydroxycarbonyl, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-carbonyl, Aminocarbonyl, Guanidino und Hydroxy substituiertes Phenyl,

oder

R<sup>3</sup> gleich eine Gruppe der Formel



oder



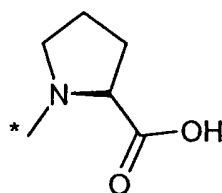
ist

und

R<sup>4</sup> gleich Wasserstoff ist

oder

- 5 R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, eine Gruppe der Formel



bilden,

und ihre Salze, ihre Solvate und die Solvate ihrer Salze.

- 10 Erfindungsgemäße Verbindungen sind die Verbindungen der Formel (I) und deren Salze, Solvate und Solvate der Salze, nachfolgend als Ausführungsbeispiel(e) genannten Verbindungen und deren Salze, Solvate und Solvate der Salze, soweit es sich bei den von Formel (I) umfassten, nachfolgend genannten Verbindungen nicht bereits um Salze, Solvate und Solvate der Salze handelt.

- 15 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in Abhängigkeit von ihrer Struktur in stereoisomeren Formen (Enantiomere, Diastereomere) existieren. Die Erfindung betrifft deshalb die Enantiomeren oder Diastereomeren und ihre jeweiligen Mischungen. Aus solchen Mischungen von Enantiomeren und/oder Diastereomeren lassen sich die stereoisomer einheitlichen Bestandteile in bekannter Weise isolieren.

Sofern die erfindungsgemäßen Verbindungen in tautomeren Formen vorkommen können, umfasst die vorliegende Erfindung sämtliche tautomere Formen.

- 20 Als Salze sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung physiologisch unbedenkliche Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen bevorzugt. Umfasst sind aber auch Salze, die für pharmazeutische Anwendungen selbst nicht geeignet sind aber beispielsweise für die Isolierung oder Reinigung der erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden können.

- 25 Physiologisch unbedenkliche Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen umfassen Säureadditionssalze von Mineralsäuren, Carbonsäuren und Sulfonsäuren, z.B. Salze der Chlorwasserstoffsäu-

re, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Toluolsulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Naphthalindisulfonsäure, Essigsäure, Trifluoressigsäure, Propionsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure, Fumarsäure, Maleinsäure und Benzoessäure.

- 5 Physiologisch unbedenkliche Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen umfassen auch Salze üblicher Basen, wie beispielhaft und vorzugsweise Alkalimetallsalze (z.B. Natrium- und Kaliumsalze), Erdalkalisalze (z.B. Calcium- und Magnesiumsalze) und Ammoniumsalze, abgeleitet von Ammoniak oder organischen Aminen mit 1 bis 16 C-Atomen, wie beispielhaft und vorzugsweise Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Ethyldiisopropylamin, Monoethanolamin, Diethanolamin, 10 Triethanolamin, Dicyclohexylamin, Dimethylaminoethanol, Prokain, Dibenzylamin, *N*-Methylmorpholin, Arginin, Lysin, Ethylendiamin und *N*-Methylpiperidin.

Als Solvate werden im Rahmen der Erfindung solche Formen der erfindungsgemäßen Verbindungen bezeichnet, welche in festem oder flüssigem Zustand durch Koordination mit Lösungsmittelmolekülen einen Komplex bilden. Hydrate sind eine spezielle Form der Solvate, bei denen die 15 Koordination mit Wasser erfolgt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung haben die Substituenten, soweit nicht anders spezifiziert, die folgende Bedeutung:

Alkyl per se und "Alk" und "Alkyl" in Alkylaminocarbonyl und Alkoxy-carbonyl stehen für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 1 bis 4, besonders 20 bevorzugt 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, beispielhaft und vorzugsweise für Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Isopropyl, *tert*-Butyl, *n*-Pentyl und *n*-Hexyl.

Alkylaminocarbonyl steht für einen Alkylaminocarbonylrest mit einem oder zwei (unabhängig voneinander gewählten) Alkylsubstituenten, beispielhaft und vorzugsweise für Methylaminocarbonyl, Ethylaminocarbonyl, *n*-Propylaminocarbonyl, Isopropylaminocarbonyl, *tert*-Butylaminocarbonyl, *n*- 25 Pentylaminocarbonyl, *n*-Hexylaminocarbonyl, *N,N*-Dimethylaminocarbonyl, *N,N*-Diethylaminocarbonyl, *N*-Ethyl-*N*-methylaminocarbonyl, *N*-Methyl-*N*-*n*-propylaminocarbonyl, *N*-Isopropyl-*N*-*n*-propylaminocarbonyl, *N-tert*-Butyl-*N*-methylaminocarbonyl, *N*-Ethyl-*N*-*n*-pentylaminocarbonyl und *N*-*n*-Hexyl-*N*-methylaminocarbonyl. C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylaminocarbonyl steht beispielsweise für einen Monoalkylaminocarbonylrest mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen oder für einen Dialkylaminocarbonylrest 30 mit jeweils 1 bis 3 Kohlenstoffatomen pro Alkylsubstituent.

Alkoxy-carbonyl steht beispielhaft und vorzugsweise für Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, n-Propoxycarbonyl, Isopropoxycarbonyl, *tert*-Butoxycarbonyl, n-Pentoxycarbonyl und n-Hexoxycarbonyl.

Ein Symbol \* an einer Bindung bedeutet die Verknüpfungsstelle im Molekül.

5 Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel (I), in welcher

R<sup>1</sup> gleich Wasserstoff oder Hydroxy ist,

R<sup>2</sup> gleich Wasserstoff oder Methyl ist,

R<sup>3</sup> gleich C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl bedeutet,

10 wobei Alkyl substituiert ist mit einem Substituenten Aminocarbonyl und einem weiteren Substituenten, wobei der Substituent ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend Aminocarbonyl und Guanidino,

oder

wobei Alkyl substituiert ist mit einem Substituenten Hydroxycarbonyl und einem weiteren Substituenten Hydroxy,

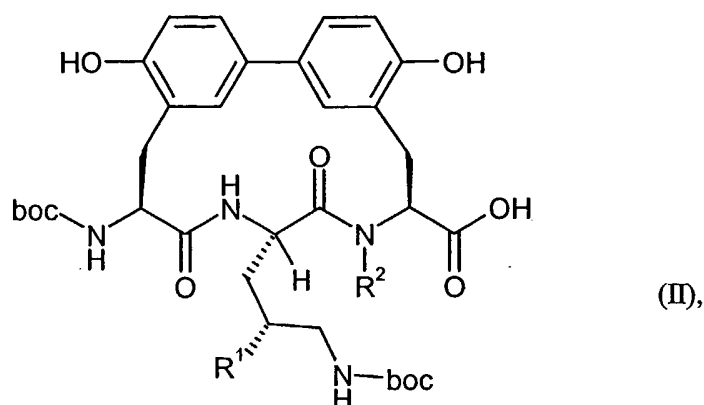
15 und

R<sup>4</sup> gleich Wasserstoff ist,

und ihre Salze, ihre Solvate und die Solvate ihrer Salze.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel (I) oder ihrer Salze, ihrer Solvate oder der Solvate ihrer Salze, wobei nach Verfahren

20 [A] Verbindungen der Formel



worin  $R^1$  und  $R^2$  die oben angegebene Bedeutung haben und boc gleich *tert*-Butoxycarbonyl ist,

in einem zweistufigen Verfahren zunächst in Gegenwart von einem oder mehreren Dehydratisierungsreagenzien mit Verbindungen der Formel

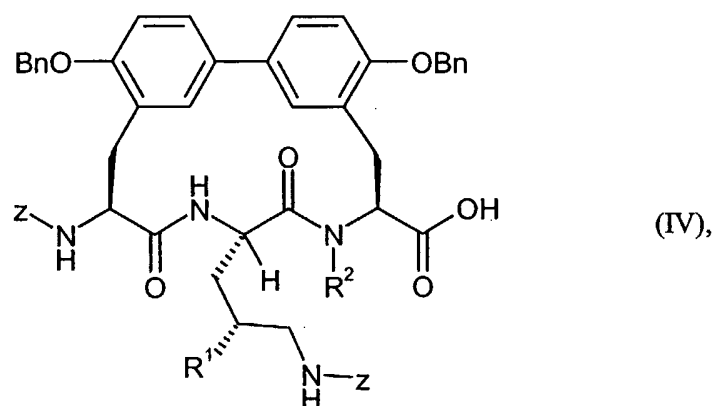


worin  $R^3$  und  $R^4$  die oben angegebene Bedeutung haben,

und anschließend mit einer Säure umgesetzt werden,

oder

[B] Verbindungen der Formel



10

worin  $R^1$  und  $R^2$  die oben angegebene Bedeutung haben und Z gleich Benzyloxycarbonyl ist,

in einem zweistufigen Verfahren zunächst in Gegenwart von einem oder mehreren Dehydratisierungsreagenzien mit Verbindungen der Formel



worin  $R^3$  und  $R^4$  die oben angegebene Bedeutung haben,

und anschließend mit einer Säure oder durch Hydrogenolyse umgesetzt werden.

Die freie Base der Salze kann zum Beispiel durch Chromatographie an einer Reversed Phase Säule mit einem Acetonitril-Wasser-Gradienten unter Zusatz einer Base erhalten werden, insbesondere  
5 durch Verwendung einer RP18 Phenomenex Luna C18(2) Säule und Diethylamin als Base.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel (I) oder ihrer Solvate nach Anspruch 1, bei dem Salze der Verbindungen oder Solvate der Salze der Verbindungen durch Chromatographie unter Zusatz einer Base in die Verbindungen überführt werden.

10 Die Hydroxygruppe an  $R^1$  ist gegebenenfalls während der Umsetzung mit Verbindungen der Formel (III) mit einer *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe geschützt, die im zweiten Reaktionsschritt abgespalten wird.

Reaktive Funktionalitäten in dem Rest  $R^3$  von Verbindungen der Formel (III) werden bereits geschützt mit in die Synthese eingebracht, bevorzugt sind säurelabile Schutzgruppen (z.B. boc). Nach  
15 erfolgter Umsetzung zu Verbindungen der Formel (I) können die Schutzgruppen durch Entschützungsreaktion abgespalten werden. Dies geschieht nach Standardverfahren der Schutzgruppenchemie. Bevorzugt sind Entschützungsreaktionen unter sauren Bedingungen oder durch Hydrogenolyse.

Die Umsetzung der ersten Stufe der Verfahren [A] und [B] erfolgt im Allgemeinen in inerten Lösungsmitteln, gegebenenfalls in Gegenwart einer Base, bevorzugt in einem Temperaturbereich von  
20 0°C bis 40°C bei Normaldruck.

Als Dehydratisierungsreagenzien eignen sich hierbei beispielsweise Carbodiimide wie z.B. *N,N'*-Diethyl-, *N,N'*-Dipropyl-, *N,N'*-Diisopropyl-, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, *N*-(3-Dimethylaminoisopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC), *N*-Cyclohexylcarbodiimid-*N'*-propyloxymethyl-Polystyrol (PS-Carbodiimid) oder Carbonylverbindungen wie Carbonyldiimidazol, oder  
25 1,2-Oxazoliumverbindungen wie 2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-*tert*-Butyl-5-methyl-isoxazolium-perchlorat, oder Acylaminoverbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, oder Propanphosphonsäureanhydrid, oder Isobutylchloroformat, oder Bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)-phosphorylchlorid oder Benzotriazolyl-oxy-tri(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat, oder  
30 *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), 2-(2-Oxo-1-(2H)-pyridyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TPTU) oder *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU), oder

1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), oder Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluoro-phosphat (BOP), oder Mischungen aus diesen, oder Mischung aus diesen zusammen mit Basen.

5 Basen sind beispielsweise Alkalicarbonat, wie z.B. Natrium- oder Kaliumcarbonat, oder -hydrogencarbonat, oder organische Basen wie Trialkylamine z.B. Triethylamin, *N*-Methylmorpholin, *N*-Methylpiperidin, 4-Dimethylaminopyridin oder Diisopropylethylamin.

Vorzugsweise wird die Kondensation mit HATU in Gegenwart einer Base, insbesondere Diisopropylethylamin, durchgeführt.

10 Inerte Lösungsmittel sind beispielsweise Halogenkohlenwasserstoffe wie Dichlormethan oder Trichlormethan, Kohlenwasserstoff wie Benzol, oder Nitromethan, Dioxan, Dimethylformamid oder Acetonitril. Ebenso ist es möglich, Gemische der Lösemittel einzusetzen. Besonders bevorzugt ist Dimethylformamid.

Die Umsetzung mit einer Säure in der zweiten Stufe der Verfahren [A] und [B] erfolgt bevorzugt in einem Temperaturbereich von 0°C bis 40°C bei Normaldruck.

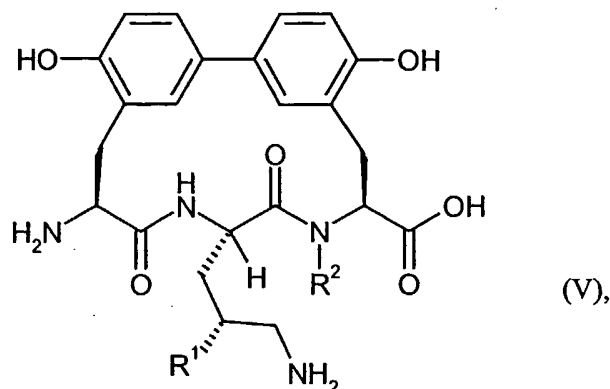
15 Als Säuren eignen sich hierbei Chlorwasserstoff in Dioxan, Bromwasserstoff in Essigsäure oder Trifluoressigsäure in Methylenchlorid.

Die Hydrogenolyse in der zweiten Stufe des Verfahrens [B] erfolgt im Allgemeinen in einem Lösungsmittel in Gegenwart von Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle, bevorzugt in einem Temperaturbereich von 0°C bis 40°C bei Normaldruck.

20 Lösungsmittel sind beispielsweise Alkohole wie Methanol, Ethanol, *n*-Propanol oder iso-Propanol, in einem Gemisch mit Wasser und Eisessig, bevorzugt ist ein Gemisch aus Ethanol, Wasser und Eisessig.

Die Verbindungen der Formel (III) sind bekannt oder können analog bekannten Verfahren hergestellt werden.

25 Die Verbindungen der Formel (II) sind bekannt oder können hergestellt werden, indem Verbindungen der Formel



worin  $R^1$  und  $R^2$  die oben angegebene Bedeutung haben,

mit Di-(*tert*-butyl)-dicarbonat in Gegenwart einer Base umgesetzt werden.

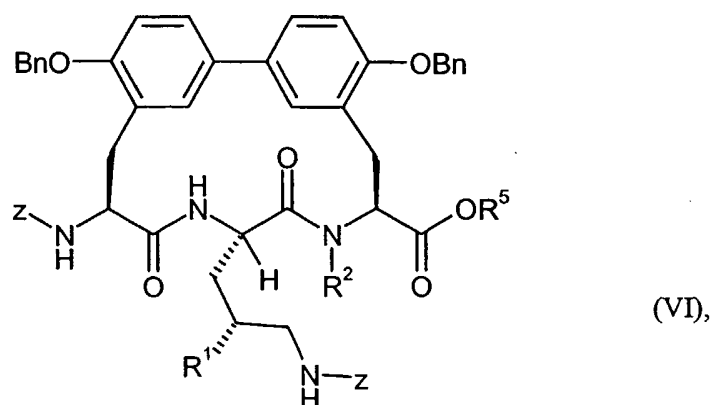
Die Umsetzung erfolgt im Allgemeinen in einem Lösungsmitteln, bevorzugt in einem Temperaturbereich von 0°C bis 40°C bei Normaldruck.

Basen sind beispielsweise Alkalihydroxide wie Natrium- oder Kaliumhydroxid, oder Alkalicarbonate wie Cäsiumcarbonat, Natrium- oder Kaliumcarbonat, oder andere Basen wie DBU, Triethylamin oder Diisopropylethylamin, bevorzugt ist Natriumhydroxid oder Natriumcarbonat.

Lösungsmittel sind beispielsweise Halogenkohlenwasserstoffe wie Methylenchlorid oder 1,2-Dichlorethan, Alkohole wie Methanol, Ethanol oder iso-Propanol, oder Wasser.

Vorzugsweise wird die Umsetzung mit Natriumhydroxid in Wasser oder Natriumcarbonat in Methanol durchgeführt.

Die Verbindungen der Formel (V) sind bekannt oder können hergestellt werden, indem Verbindungen der Formel



15

worin  $R^1$  und  $R^2$  die oben angegebene Bedeutung haben, und

R<sup>5</sup> gleich Benzyl, Methyl oder Ethyl ist,

mit einer Säure oder durch Hydrogenolyse, wie für die zweite Stufe des Verfahrens [B] beschrieben, gegebenenfalls durch anschließende Umsetzung mit einer Base zur Verseifung des Methyl- oder Ethylesters, umgesetzt werden.

- 5 Die Verseifung kann zum Beispiel erfolgen, wie bei der Umsetzung von Verbindungen der Formel (VI) zu Verbindungen der Formel (IV) beschrieben.

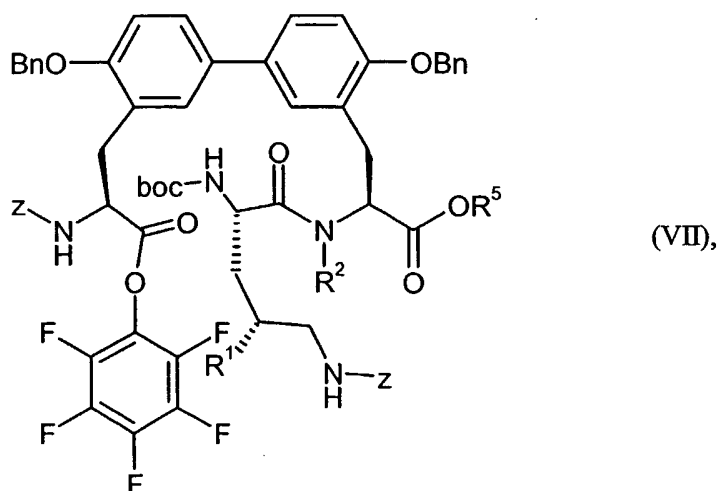
Die Verbindungen der Formel (IV) sind bekannt oder können hergestellt werden, indem in Verbindungen der Formel (VI) der Benzyl-, Methyl- oder Ethylester verseift wird.

- 10 Die Umsetzung erfolgt im Allgemeinen in einem Lösungsmittel, in Gegenwart einer Base, bevorzugt in einem Temperaturbereich von 0°C bis 40°C bei Normaldruck.

Basen sind beispielsweise Alkalihydroxide wie Lithium-, Natrium- oder Kaliumhydroxid, bevorzugt ist Lithiumhydroxid.

- 15 Lösungsmittel sind beispielsweise Halogenkohlenwasserstoffe wie Dichlormethan oder Trichlormethan, Ether wie Tetrahydrofuran oder Dioxan, oder Alkohole wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol, oder Dimethylformamid. Ebenso ist es möglich, Gemische der Lösungsmittel oder Gemische der Lösungsmittel mit Wasser einzusetzen. Besonders bevorzugt sind Tetrahydrofuran oder ein Gemisch aus Methanol und Wasser.

Die Verbindungen der Formel (VI) sind bekannt oder können hergestellt werden, indem Verbindungen der Formel



20

worin R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und R<sup>5</sup> die oben angegebene Bedeutung haben,

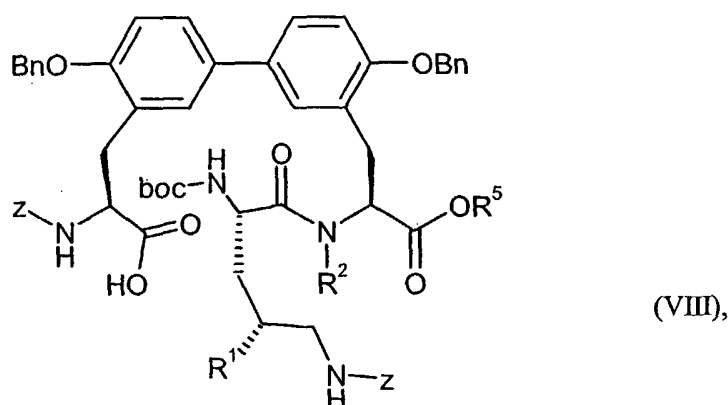
in der ersten Stufe mit Säuren, wie für die zweite Stufe der Verfahren [A] und [B] beschrieben, und in der zweiten Stufe mit Basen umgesetzt werden.

In der zweiten Stufe erfolgt die Umsetzung mit Basen im Allgemeinen in einem Lösungsmittel, bevorzugt in einem Temperaturbereich von 0°C bis 40°C bei Normaldruck.

- 5 Basen sind beispielsweise Alkalihydroxide wie Natrium- oder Kaliumhydroxid, oder Alkalicarbonate wie Cäsiumcarbonat, Natrium- oder Kaliumcarbonat, oder andere Basen wie DBU, Triethylamin oder Diisopropylethylamin, bevorzugt ist Triethylamin.

- Lösungsmittel sind beispielsweise Halogenkohlenwasserstoffe wie Chloroform, Methylenechlorid oder 1,2-Dichlorethan, oder Tetrahydrofuran, oder Gemische der Lösungsmittel, bevorzugt ist  
10 Methylenechlorid oder Tetrahydrofuran.

Die Verbindungen der Formel (VII) sind bekannt oder können hergestellt werden, indem Verbindungen der Formel

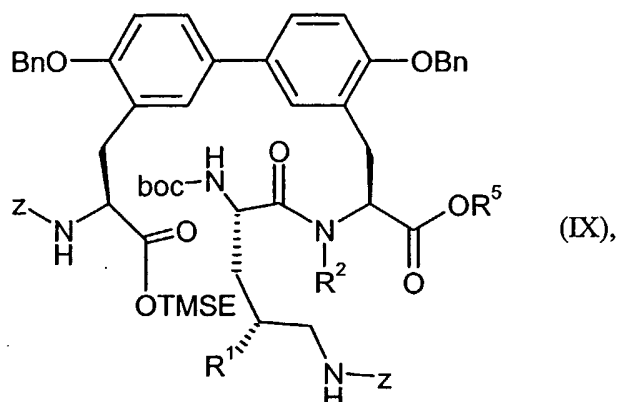


worin  $R^1$ ,  $R^2$  und  $R^5$  die oben angegebene Bedeutung haben,

- 15 mit Pentafluorphenol in Gegenwart von Dehydratisierungsreagenzien, wie für die erste Stufe der Verfahren [A] und [B] beschrieben, umgesetzt werden.

Die Umsetzung erfolgt bevorzugt mit DMAP und EDC in Dichlormethan in einem Temperaturbereich von -40°C bis 40°C bei Normaldruck.

- Die Verbindungen der Formel (VIII) sind bekannt oder können hergestellt werden, indem Verbindungen der Formel  
20



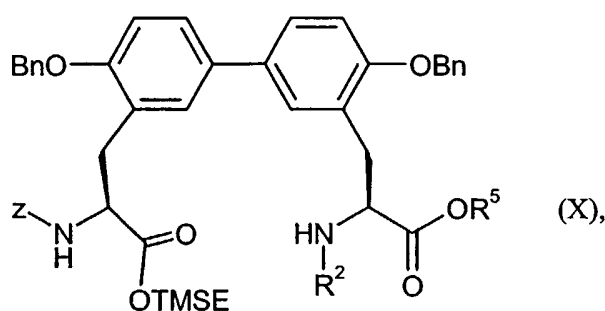
worin  $R^1$ ,  $R^2$  und  $R^5$  die oben angegebene Bedeutung haben,

mit Fluorid, insbesondere mit Tetrabutylammoniumfluorid, umgesetzt werden.

Die Umsetzung erfolgt im Allgemeinen in einem Lösungsmitteln, bevorzugt in einem Temperaturbereich von  $-10^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$  bei Normaldruck.

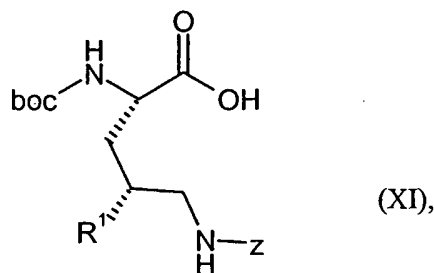
Inerte Lösungsmittel sind beispielsweise Halogenkohlenwasserstoffe wie Dichlormethan, oder Kohlenwasserstoffe wie Benzol oder Toluol, oder Ether wie Tetrahydrofuran oder Dioxan, oder Dimethylformamid. Ebenso ist es möglich, Gemische der Lösemittel einzusetzen. Bevorzugte Lösungsmittel sind Tetrahydrofuran und Dimethylformamid.

10 Die Verbindungen der Formel (IX) sind bekannt oder können hergestellt werden, indem Verbindungen der Formel



worin  $R^2$  und  $R^5$  die oben angegebene Bedeutung haben,

mit Verbindungen der Formel



worin R<sup>1</sup> die oben angegebene Bedeutung hat,

in Gegenwart von Dehydratisierungsreagenzien, wie für die erste Stufe der Verfahren [A] und [B] beschrieben, umgesetzt werden.

- 5 Die Verbindungen der Formel (X) sind bekannt oder können analog den im Beispielteil beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

Die Verbindungen der Formel (XI) sind bekannt oder können analog bekannten Verfahren hergestellt werden.

- 10 Die erfindungsgemäßen Verbindungen zeigen ein nicht vorhersehbares, wertvolles pharmakologisches und pharmakokinetisches Wirkspektrum.

Sie eignen sich daher zur Verwendung als Arzneimittel zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten bei Menschen und Tieren.

- 15 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Infektionskrankheiten, insbesondere von bakteriellen Infektionen, eingesetzt werden.

Beispielsweise können lokale und/oder systemische Erkrankungen behandelt und/oder verhindert werden, die durch die folgenden Erreger oder durch Mischungen der folgenden Erreger verursacht werden:

- 20 Gram-positive Kokken, z.B. Staphylokokken (Staph. aureus, Staph. epidermidis) und Streptokokken (Strept. agalactiae, Strept. faecalis, Strept. pneumoniae, Strept. pyogenes); gram-negative Kokken (neisseria gonorrhoeae) sowie gram-negative Stäbchen wie Enterobacteriaceen, z.B. Escherichia coli, Hämophilus influenzae, Citrobacter (Citrob. freundii, Citrob. divernis), Salmonella und Shigella; ferner Klebsiellen (Klebs. pneumoniae, Klebs. oxytocy), Enterobacter (Ent. aerogenes, Ent. agglomerans), Hafnia, Serratia (Serr. marcescens), Proteus (Pr. mirabilis, Pr. rettgeri, Pr. vulgaris), Providencia, Yersinia, sowie die Gattung Acinetobacter. Darüber hinaus umfaßt das
- 25 antibakterielle Spektrum die Gattung Pseudomonas (Ps. aeruginosa, Ps. maltophilia) sowie strikt

anaerobe Bakterien wie z.B. Bacteroides fragilis, Vertreter der Gattung Peptococcus, Peptostreptococcus sowie die Gattung Clostridium; ferner Mykoplasmen (M. pneumoniae, M. hominis, M. urealyticum) sowie Mykobakterien, z.B. Mycobacterium tuberculosis.

Die obige Aufzählung von Erregern ist lediglich beispielhaft und keineswegs beschränkend aufzufassen. Als Krankheiten, die durch die genannten Erreger oder Mischinfektionen verursacht und durch die erfindungsgemäßen topisch anwendbaren Zubereitungen verhindert, gebessert oder geheilt werden können, seien beispielsweise genannt:

Infektionskrankheiten beim Menschen wie z. B. septische Infektionen, Knochen- und Gelenkinfektionen, Hautinfektionen, postoperative Wundinfektionen, Abszesse, Phlegmone, Wundinfektionen, infizierte Verbrennungen, Brandwunden, Infektionen im Mundbereich, Infektionen nach Zahnoperationen, septische Arthritis, Mastitis, Tonsillitis, Genital-Infektionen und Augeninfektionen.

Außer beim Menschen können bakterielle Infektionen auch bei anderen Spezies behandelt werden. Beispielhaft seien genannt:

Schwein: Coli-diarrhoe, Enterotoxämie, Sepsis, Dysenterie, Salmonellose, Metritis-Mastitis-Agalaktiae-Syndrom, Mastitis;

Wiederkäuer (Rind, Schaf, Ziege): Diarrhoe, Sepsis, Bronchopneumonie, Salmonellose, Pasteurellose, Mykoplasmosen, Genitalinfektionen;

Pferd: Bronchopneumonien, Fohlenlähme, puerperale und postpuerperale Infektionen, Salmonellose;

Hund und Katze: Bronchopneumonie, Diarrhoe, Dermatitis, Otitis, Harnwegsinfekte, Prostatitis;

Geflügel (Huhn, Pute, Wachtel, Taube, Ziervögel und andere): Mycoplasmosen, E. coli-Infektionen, chronische Lungenerkrankungen, Salmonellose, Pasteurellose, Psittakose.

Ebenso können bakterielle Erkrankungen bei der Aufzucht und Haltung von Nutz- und Zierfischen behandelt werden, wobei sich das antibakterielle Spektrum über die vorher genannten Erreger hinaus auf weitere Erreger wie z.B. Pasteurella, Brucella, Campylobacter, Listeria, Erysipelothrix, Corynebakterien, Borellia, Treponema, Nocardia, Rickettsie, Yersinia, erweitert.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist der Einsatz der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen, vorzugsweise von bakteriellen Krankheiten, insbesondere von bakteriellen Infektionen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

5 Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen, unter Verwendung einer antibakteriell wirksamen Menge der erfindungsgemäßen Verbindungen.

10 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können systemisch und/oder lokal wirken. Zu diesem Zweck können sie auf geeignete Weise appliziert werden, wie z.B. oral, parenteral, pulmonal, nasal, sublingual, lingual, buccal, rectal, dermal, transdermal, conjunctival, otisch oder als Implantat bzw. Stent.

15 Für diese Applikationswege können die erfindungsgemäßen Verbindungen in geeigneten Applikationsformen verabreicht werden.

Für die orale Applikation eignen sich nach dem Stand der Technik funktionierende schnell und/oder modifiziert die erfindungsgemäßen Verbindungen abgebende Applikationsformen, die die erfindungsgemäßen Verbindungen in kristalliner und/ oder amorphisierter und/oder gelöster Form enthalten, wie z.B. Tabletten (nichtüberzogene oder überzogene Tabletten, beispielsweise mit magensaftresistenten oder sich verzögert auflösenden oder unlöslichen Überzügen, die die Freisetzung der erfindungsgemäßen Verbindung kontrollieren), in der Mundhöhle schnell zerfallende Tabletten oder Filme/Oblaten, Filme/Lyophilisate, Kapseln (beispielsweise Hart- oder Weichgelatine-kapseln), Dragees, Granulate, Pellets, Pulver, Emulsionen, Suspensionen, Aerosole oder Lösungen.

25 Die parenterale Applikation kann unter Umgehung eines Resorptionsschrittes geschehen (z.B. intravenös, intraarteriell, intrakardial, intraspinal oder intralumbal) oder unter Einschaltung einer Resorption (z.B. intramuskulär, subcutan, intracutan, percutan oder intraperitoneal). Für die parenterale Applikation eignen sich als Applikationsformen u.a. Injektions- und Infusionszubereitungen in Form von Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Lyophilisaten oder sterilen Pulvern.

30 Für die sonstigen Applikationswege eignen sich z.B. Inhalationsarzneiformen (u.a. Pulverinhalatoren, Nebulizer), Nasentropfen, -lösungen, -sprays; lingual, sublingual oder buccal zu applizierende Tabletten, Filme/Oblaten oder Kapseln, Suppositorien, Ohren- oder Augenpräparationen, Vaginal-

kapseln, wässrige Suspensionen (Lotionen, Schüttelmixturen), lipophile Suspensionen, Salben, Cremes, transdermale therapeutische Systeme (wie beispielsweise Pflaster), Milch, Pasten, Schäume, Streupuder, Implantate oder Stents.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in die angeführten Applikationsformen überführt werden. Dies kann in an sich bekannter Weise durch Mischen mit inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen geschehen. Zu diesen Hilfsstoffen zählen u.a. Trägerstoffe (beispielsweise mikrokristalline Cellulose, Laktose, Mannitol), Lösungsmittel (z.B. flüssige Polyethylenglycole), Emulgatoren und Dispergier- oder Netzmittel (beispielsweise Natriumdodecylsulfat, Polyoxysorbitanoleat), Bindemittel (beispielsweise Polyvinylpyrrolidon), synthetische und natürliche Polymere (beispielsweise Albumin), Stabilisatoren (z.B. Antioxidantien wie beispielsweise Ascorbinsäure), Farbstoffe (z.B. anorganische Pigmente wie beispielsweise Eisenoxide) und Geschmacks- und / oder Geruchskorrigentien.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, üblicherweise zusammen mit einem oder mehreren inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen enthalten, sowie deren Verwendung zu den zuvor genannten Zwecken.

Im Allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei parenteraler Applikation Mengen von etwa 5 bis 250 mg/kg Körpergewicht je 24 h zur Erzielung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen. Bei oraler Applikation beträgt die Menge etwa 5 bis 100 mg/kg Körpergewicht je 24 h.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von Körpergewicht, Applikationsweg, individuellem Verhalten gegenüber dem Wirkstoff, Art der Zubereitung und Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Applikation erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muss. Im Falle der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über den Tag zu verteilen.

Die Prozentangaben in den folgenden Tests und Beispielen sind, sofern nicht anders angegeben, Gewichtsprozent; Teile sind Gewichtsteile. Lösungsmittelverhältnisse, Verdünnungsverhältnisse und Konzentrationsangaben von flüssig/flüssig-Lösungen beziehen sich jeweils auf das Volumen.

A. Beispiele**Verwendete Abkürzungen:**

abs.	absolut
aq.	wässrig
Bn	Benzyl
boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
CDCl <sub>3</sub>	Chloroform
CH	Cyclohexan
d	dublett (im <sup>1</sup> H-NMR)
dd	dublett von dublett (im <sup>1</sup> H-NMR)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
d. Th.	der Theorie
EDC	<i>N'</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid x HCl
EE	Ethylacetat (Essigsäureethylester)
ESI	Elektrospray-Ionisation (bei MS)
ges.	gesättigt
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxy-1H-benzotriazol x H <sub>2</sub> O
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruck-, Hochleistungsflüssigchromatographie
LC-MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektroskopie
m	multipllett (im <sup>1</sup> H-NMR)
min	Minute
MS	Massenspektroskopie
NMR	Kernresonanzspektroskopie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
Pd/C	Palladium/Kohle

proz.	Prozent
q	quartett (im <sup>1</sup> H-NMR)
R <sub>f</sub>	Retentionsindex (bei DC)
RP	Reverse Phase (bei HPLC)
RT	Raumtemperatur
R <sub>t</sub>	Retentionszeit (bei HPLC)
s	singulett (im <sup>1</sup> H-NMR)
t	triplett (im <sup>1</sup> H-NMR)
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSE	2-(Trimethylsilyl)-ethyl
TPTU	2-(2-Oxo-1(2H)-pyridyl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
Z	Benzyloxycarbonyl

#### LC-MS- und HPLC-Methoden:

**Methode 1 (LC-MS):** Gerätetyp MS: Micromass ZQ; Gerätetyp HPLC: Waters Alliance 2795; Säule: Merck Chromolith SpeedROD RP-18e 50 mm x 4.6 mm; Eluent A: Wasser + 500 µl  
 5 50%ige Ameisensäure / l; Eluent B: Acetonitril + 500 µl 50%ige Ameisensäure / l; Gradient: 0.0 min 10%B → 3.0 min 95%B → 4.0 min 95%B; Ofen: 35°C; Fluss: 0.0 min 1.0 ml/min → 3.0 min 3.0 ml/min → 4.0 min 3.0 ml/min; UV-Detektion: 210 nm.

**Methode 2 (LC-MS):** Gerätetyp MS: Micromass ZQ; Gerätetyp HPLC: Waters Alliance 2795; Säule: Phenomenex Synergi 2µ Hydro-RP Mercury 20 mm x 4 mm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.5 ml  
 10 50%ige Ameisensäure, Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.5 ml 50%ige Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 90%A → 2.5 min 30%A → 3.0 min 5%A → 4.5 min 5%A; Fluss: 0.0 min 1 ml/min, 2.5 min/3.0 min/4.5 min 2 ml/min; Ofen: 50°C; UV-Detektion: 210 nm.

**Methode 3 (HPLC):** Instrument: HP 1100 mit DAD-Detektion; Säule: Kromasil RP-18, 60 mm x  
 15 2 mm, 3.5 µm; Eluent A: 5 ml Perchlorsäure/l Wasser, Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0 min 2%B, 0.5 min 2%B, 4.5 min 90%B, 15 min 90%B; Fluss: 0.75ml/min; Ofen: 30°C; UV-Detektion: 210 nm.

**Methode 4 (LC-MS):** Gerätetyp MS: Micromass ZQ; Gerätetyp HPLC: HP 1100 Series; UV DAD; Säule: Phenomenex Synergi 2µ Hydro-RP Mercury 20 mm x 4 mm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.5 ml 50%ige Ameisensäure, Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.5 ml 50%ige Ameisensäure; Gradient:

0.0 min 90%A → 2.5 min 30%A → 3.0 min 5%A → 4.5 min 5%A; Fluss: 0.0 min 1 ml/min, 2.5 min/3.0 min/4.5 min. 2 ml/min; Ofen: 50°C; UV-Detektion: 210 nm.

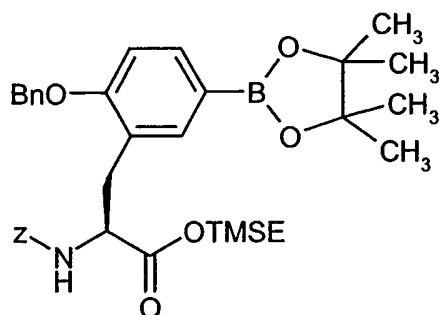
**Methode 5 (LC-MS):** Instrument: Micromass Quattro LCZ mit HPLC Agilent Serie 1100; Säule: Phenomenex Synergi 2 $\mu$  Hydro-RP Mercury 20 mm x 4 mm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.5 ml 50%ige Ameisensäure, Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.5 ml 50%ige Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 90%A → 2.5 min 30%A → 3.0 min 5%A → 4.5 min 5%A; Fluss: 0.0 min 1 ml/min, 2.5 min/3.0 min/4.5 min 2 ml/min; Ofen: 50°C; UV-Detektion: 208- 400 nm.

**Methode 6 (LC-MS):** Gerätetyp MS: Micromass ZQ; Gerätetyp HPLC: HP 1100 Series; UV DAD; Säule: Grom-Sil 120 ODS-4 HE 50 mm x 2 mm, 3.0  $\mu$ m; Eluent A: Wasser + 500  $\mu$ l 50%ige Ameisensäure / l, Eluent B: Acetonitril + 500  $\mu$ l 50%ige Ameisensäure / l; Gradient: 0.0 min 70%B → 4.5 min 90%B; Ofen: 50°C; Fluss: 0.8 ml/min; UV-Detektion: 210 nm.

**Methode 7 (HPLC):** Instrument: HP 1100 mit DAD-Detektion; Säule: Kromasil RP-18, 60 mm x 2 mm, 3.5  $\mu$ m; Eluent A: 5 ml Perchlorsäure/l Wasser, Eluent B: Acetonitril; Gradient: 0 min 2%B, 0.5 min 2%B, 4.5 min 90%B, 6.5 min 90%B; Fluss: 0.75 ml/min; Ofen: 30°C; UV-Detektion: 210 nm.

AusgangsverbindungenBeispiel 1A

2-(Trimethylsilyl)ethyl-2-(benzyloxy)-*N*-[(benzyloxy)carbonyl]-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-*L*-phenylalaninat



5

Zu einer Lösung von 2.0 g (3.17 mmol) 2(*S*)-Benzyloxycarbonylamino-3-(2-benzyloxy-5-iodophenyl)-propionsäure-(2-trimethylsilyl)-ethylester (Beispiel 11A aus WO03/106480) in 30 ml DMSO werden 0.923 g (9.5 mmol) Kaliumacetat zugegeben. Die Mischung wird deoxygeniert, indem durch die kräftig gerührte Lösung 15 min lang Argon durchgeleitet wird. Dann werden

10 0.924 g (3.64 mmol) 4,4,4',4',5,5,5',5'-Octamethyl-2,2'-bi-1,3,2-dioxaborolan und 0.116 g (0.160 mmol, 0.05 Äquivalente) Bis-(diphenylphosphino)ferrocenpalladium(II)chlorid zugegeben. Unter leichtem Argonstrom wird auf 80°C erhitzt und nach 6 h wieder abgekühlt. Die Mischung wird über Silicagel (Laufmittel: Dichlormethan) filtriert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Silicagel (Laufmittel: Cyclohexan:Ethylacetat 4:1) gereinigt.

15 Ausbeute: 1.12 g (56% d. Th.)

LC-MS (Methode 6):  $R_t = 4.50$  min.

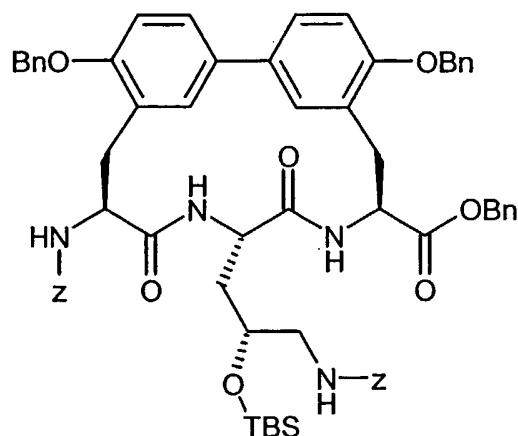
MS (EI):  $m/z = 632$   $[M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.92$  (dd, 2H), 1.31 (s, 12H), 2.95-3.95 (m, 2H), 4.11 ( $m_c$ , 2H), 4.55 (11 ( $m_c$ , 1H), 4.99 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 5.53 (d, 1H), 6.90 (d, 1H), 7.15-7.47 (m, 10H), 7.58

20 (d, 1H), 7.67 (dd, 1H).

Beispiel 2A

Benzyl-(8*S*,11*S*,14*S*)-5,17-bis(benzyloxy)-14-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-11-((2*R*)-3-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-2-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy]propyl]-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-carboxylat



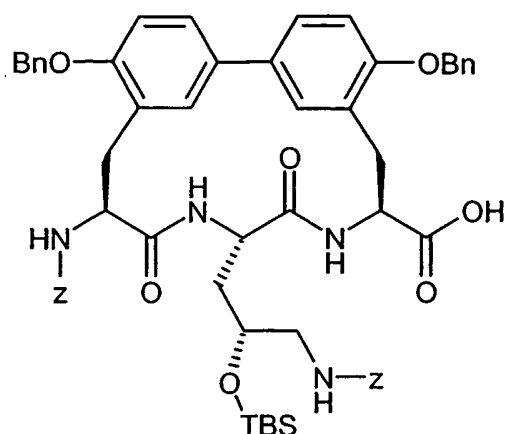
- 200 mg (0.20 mmol) 5,17-Bis-benzyloxy-14(*S*)-benzyloxycarbonylamino-11(*S*)-(3-benzyloxy-carbonylamino-2(*R*)-hydroxy-propyl)-10,13-dioxo-9,12-diaza-tricyclo-[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(19),2,4,6(21),16(20),17-hexaen-8(*S*)-carbonsäurebenzylester (Beispiel 19A aus WO03/106480)
- 5 werden in 50 ml absolutem DMF gelöst und bei 0°C mit 210 mg (0.79 mmol) Trifluormethansulfonsäure-*tert*-butyldimethylsilylester, 0.11 ml (0.79 mmol) Triethylamin und 20 mg (0.20 mmol) DMAP versetzt. Es wird 2 d bei RT gerührt. Nach Zugabe von 20 ml Methylenchlorid wäscht man die Lösung vorsichtig mit 10 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 10 ml Wasser. Die organische Phase wird zur Trockne eingeeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.
- 10 Ausbeute: 215 mg (96% d. Th.)

LC-MS (Methode 2):  $R_t = 3.43$  min.

MS (ED):  $m/z = 1125$   $[M+H]^+$

### Beispiel 3A

- 15 (8*S*,11*S*,14*S*)-5,17-Bis(benzyloxy)-14-[[benzyloxy]carbonyl]amino-11-((2*R*)-3-[[benzyloxy]carbonyl]amino)-2-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy]propyl)-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo-[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-carbonsäure



210 mg (0.19 mmol) der Verbindung aus Beispiel 2A werden in 2 ml THF gelöst und mit je 1 ml Wasser und Methanol versetzt. Nach Zugabe von 13 mg (0.56 mmol) Lithiumhydroxid wird 12 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 30 ml Wasser verdünnt und durch  
 5 Zugabe von 1N Salzsäure auf pH = 3 gestellt. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.

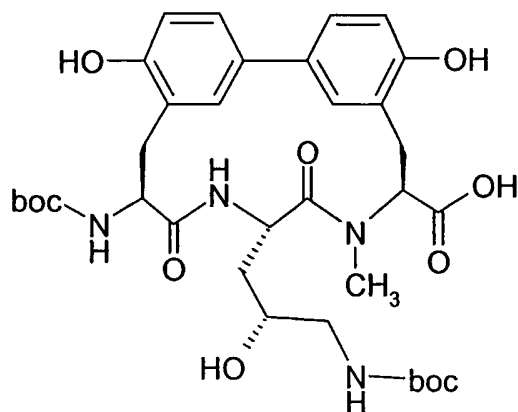
Ausbeute: 192 mg (99% d. Th.)

LC-MS (Methode 2):  $R_t = 3.24$  min.

MS (EI):  $m/z = 1135$   $[M+H]^+$

#### 10 Beispiel 4A

(8*S*,11*S*,14*S*)-14-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-11-{(2*R*)-3-[(*tert*-butoxy-carbonyl)amino]-2-hydroxypropyl}-5,17-dihydroxy-9-methyl-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-carbonsäure



90 mg (0.16 mmol) (8*S*,11*S*,14*S*)-14-Amino-11-[(2*R*)-3-amino-2-hydroxypropyl]-5,17-dihydroxy-9-methyl-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.12,6]hencosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-carbonsäure-Dihydrotrifluoracetat (Beispiel 120A aus WO03/106480) werden in 2.5 ml Wasser gelöst, mit 85.3 mg (0.8 mmol) Natriumcarbonat versetzt, im Eisbad gekühlt und mit 105.3 mg  
 5 (0.48 mmol) Di-(*tert*-butyl)-dicarbonat in 1.2 ml Methanol versetzt. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren, engt im Vakuum auf ein kleines Volumen ein und säuert mit 1*N* Salzsäure bis pH = 2 an. Der anfallende Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet.

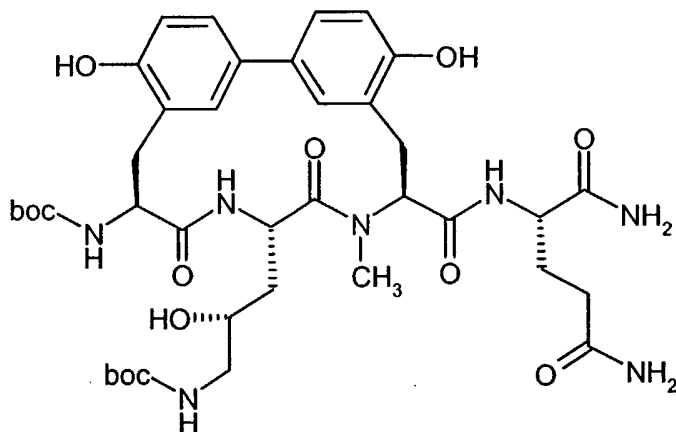
Ausbeute: 89 mg (73% d.Th.)

LC-MS (Methode 12):  $R_t = 1.80$  min.

10 MS (EI):  $m/z = 687$   $[M+H]^+$

### Beispiel 5A

*tert*-Butyl{(2*R*)-3-[(8*S*,11*S*,14*S*)-8-({[(1*S*)-4-amino-1-(aminocarbonyl)-4-oxobutyl]amino}-carbonyl)-14-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,17-dihydroxy-9-methyl-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]hencosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-11-yl]-2-hydroxypropyl}carbammat



15

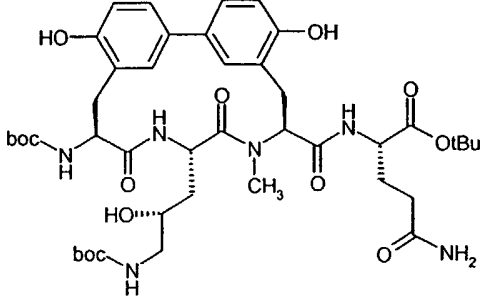
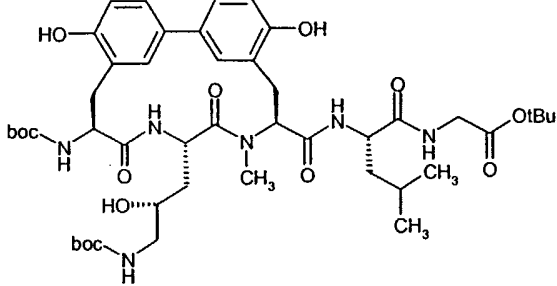
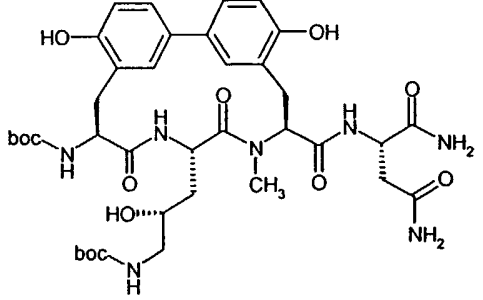
Unter Argonatmosphäre werden 20 mg (0.03 mmol) (8*S*,11*S*,14*S*)-14-[(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino]-11-[(2*R*)-3-[(*tert*-butoxy-carbonyl)amino]-2-hydroxypropyl]-5,17-dihydroxy-9-methyl-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]hencosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-carbonsäure (Beispiel 4A) und 10.58 mg (0.06 mmol) L-Glutamamid-Hydrochlorid in 1 ml DMF suspendiert,  
 20 unter Rühren im Eisbad gekühlt und mit 14.4 mg (0.04 mmol) HATU und 5.02 mg (0.04 mmol) Hünig-Base versetzt. Man lässt 30 min bei 0°C reagieren, versetzt mit weiteren 10.04 mg (0.08 mmol) Hünig-Base und lässt alles bei langsamem Temperaturanstieg (RT) über Nacht rühren. Anschließend engt man im Vakuum zur Trockne ein und trennt den Rückstand mittels HPLC (Acetonitril/Wasser).

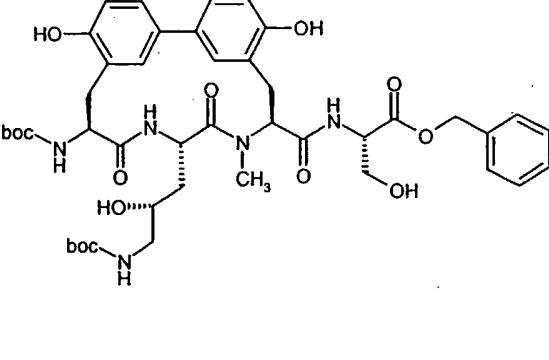
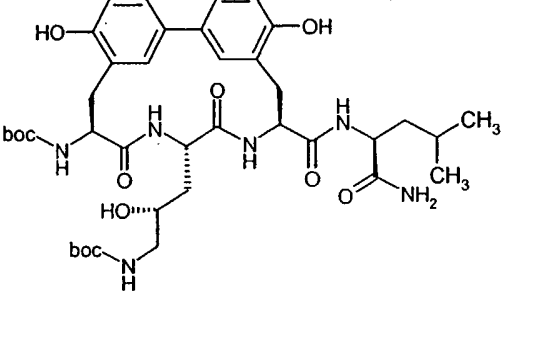
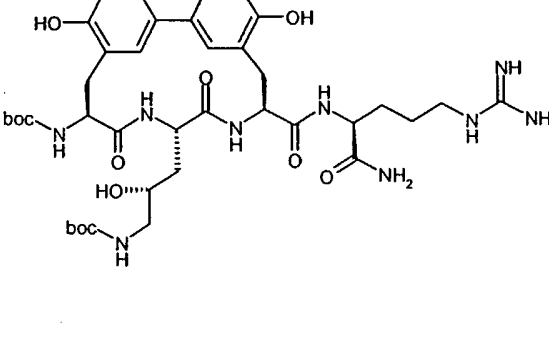
Ausbeute: 3 mg (13% d.Th.)

LC-MS (Methode 4):  $R_t = 1.90$  min.

MS (EI):  $m/z = 814$   $[M+H]^+$

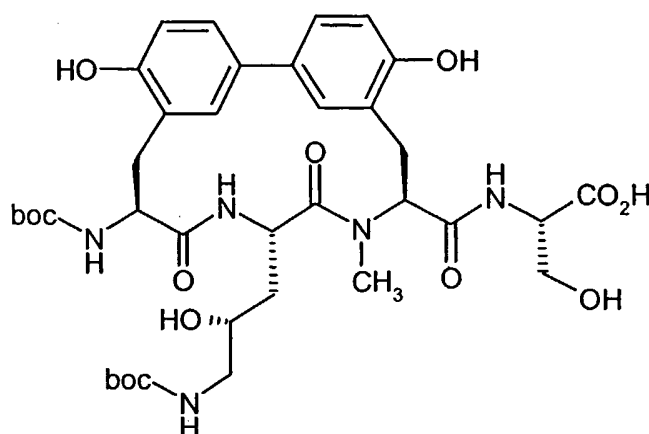
5 Analog zur Vorschrift des Beispiels 5A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 6A bis 11A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
6A		<p>LC-MS (Methode 2): <math>R_t = 1.97</math> min.</p> <p>MS (EI): <math>m/z = 871</math> <math>[M+H]^+</math></p>
7A		<p>LC-MS (Methode 5): <math>R_t = 2.49</math> min.</p> <p>MS (EI): <math>m/z = 913</math> <math>[M+H]^+</math></p>
8A		<p>LC-MS (Methode 2): <math>R_t = 1.66</math> min.</p> <p>MS (EI): <math>m/z = 800</math> <math>[M+H]^+</math></p>

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
9A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 2.36$ min. MS (EI): $m/z = 864 [M+H]^+$
10A		LC-MS (Methode 2): $R_t = 1.90$ min. MS (ESI): $m/z = 785 [M+H]^+$
11A		LC-MS (Methode 2): $R_t = 1.48$ min. MS (ESI): $m/z = 829 [M+H]^+$

**Beispiel 12A**

*N*-{[(8*S*,11*S*,14*S*)-14-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-11-{(2*R*)-3-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-2-hydroxypropyl}-5,17-dihydroxy-9-methyl-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-yl]carbonyl}-L-serin



14 mg (0.02 mmol) der Verbindung aus Beispiel 9A werden in 14 ml Eisessig/Wasser/Ethanol (4/1/1) suspendiert, mit 7 mg Pd/C (10%-ig)-Katalysator versetzt und über Nacht bei Normalbedingungen hydriert. Man filtriert den Katalysator ab und dampft das Filtrat im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz ein.

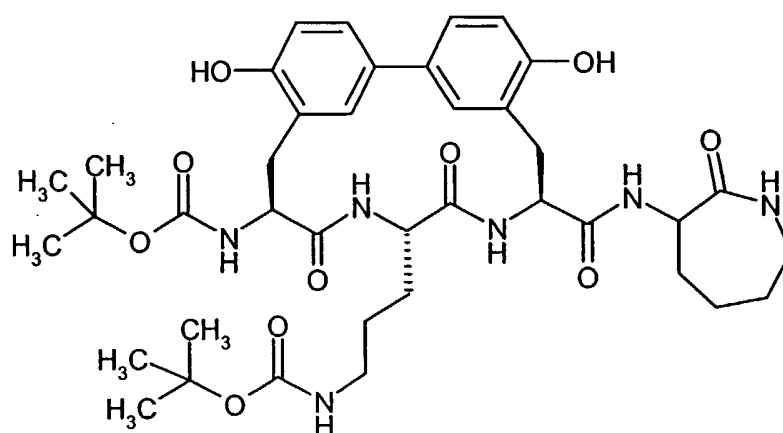
Ausbeute: 12 mg (quantitativ)

LC-MS (Methode 2):  $R_t = 1.73$  min.

MS (EI):  $m/z = 774 [M+H]^+$

### Beispiel 13A

10 *tert*-Butyl-3-[(8*S*,11*S*,14*S*)-14-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-5,17-dihydroxy-10,13-dioxo-8-[[2-oxazepan-3-yl)amino]carbonyl]-9,12-diazatricyclo-[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-11-yl]-propylcarbammat



Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 5A aus 25 mg (0.04 mmol) (8*S*,11*S*,14*S*)-14-[(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino-11-[3-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propyl]-5,17-dihydroxy-10,13-dioxo-

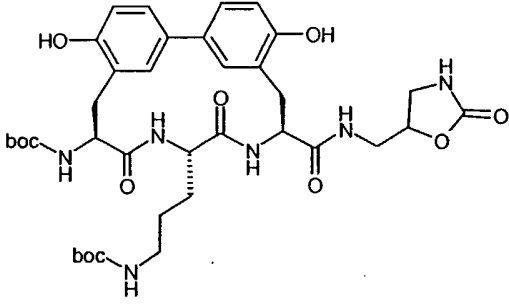
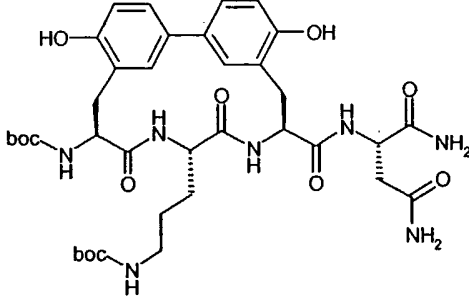
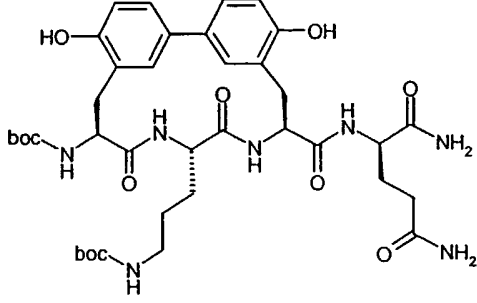
9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]-henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-carbonsäure (Beispiel 83A aus WO03/106480) und 5.86 mg (0.05 mmol) 3-Aminoazepan-2-on mit 17.39 mg (0.05 mmol) HATU und insgesamt 16 mg (0.12 mmol) Hünig-Base in 3 ml abs. DMF.

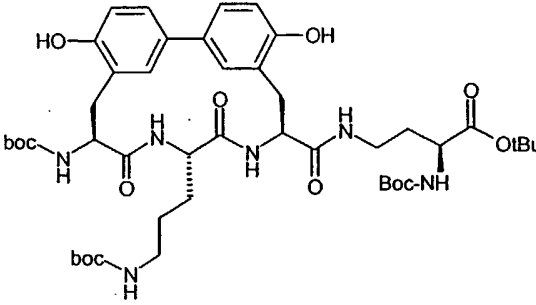
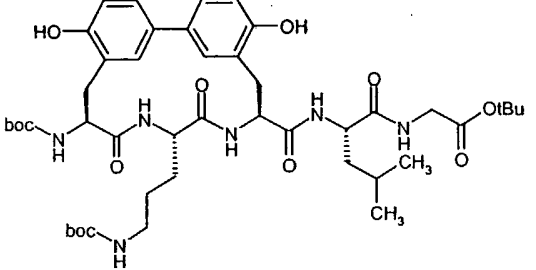
Ausbeute: 11.2 mg (38% d. Th.)

5 LC-MS (Methode 4):  $R_t = 2.64$  min.

MS (EI):  $m/z = 767$   $[M+H]^+$

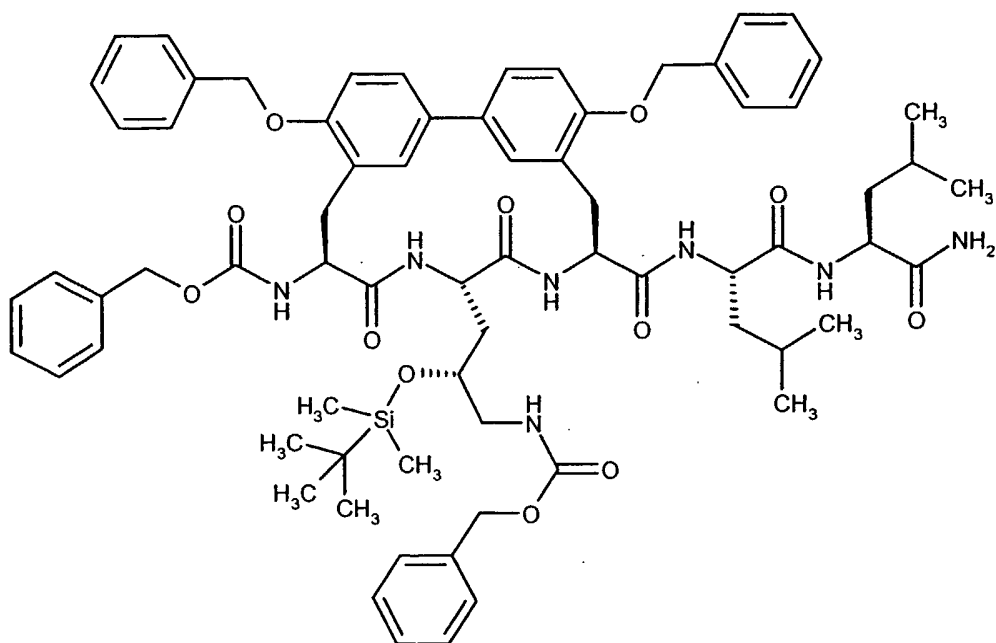
Analog zur Vorschrift des Beispiels 13A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 14A bis 18A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
14A		LC-MS (Methode 5): $R_t = 1.95$ min. MS (EI): $m/z = 755$ $[M+H]^+$
15A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 1.91$ min. MS (EI): $m/z = 770$ $[M+H]^+$
16A		LC-MS (Methode 2): $R_t = 1.68$ min. MS (EI): $m/z = 784$ $[M+H]^+$

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
17A		LC-MS (Methode 1): $R_t = 2.38$ min. MS (EI): $m/z = 913 [M+H]^+$
18A		LC-MS (Methode 1): $R_t = 2.31$ min. MS (EI): $m/z = 883 [M+H]^+$

**Beispiel 19A**

*N*-{[(8*S*,11*S*,14*S*)-5,17-Bis(benzyloxy)-14-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-11-((2*R*)-3-  
 5 {[(benzyloxy)carbonyl]amino}-2-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}propyl)-10,13-dioxo-9,12-  
 diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicoso-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-yl]carbonyl]-L-leucyl-L-  
 leucinamid



Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 5A aus 40 mg (0.039 mmol) (8S,11S,14S)-5,17-Bis(benzyloxy)-14-{{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-11-((2R)-3-{{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-2-{{*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy}propyl)-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-

5 1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-carbonsäure (Beispiel 3A) und 11.9 mg (0.043 mmol) L-Leucyl-L-leucinamid-Hydrochlorid mit 18.36 mg (0.048 mmol) HATU und insgesamt 22 mg (0.17 mmol) Hünig-Base in 2 ml abs. DMF.

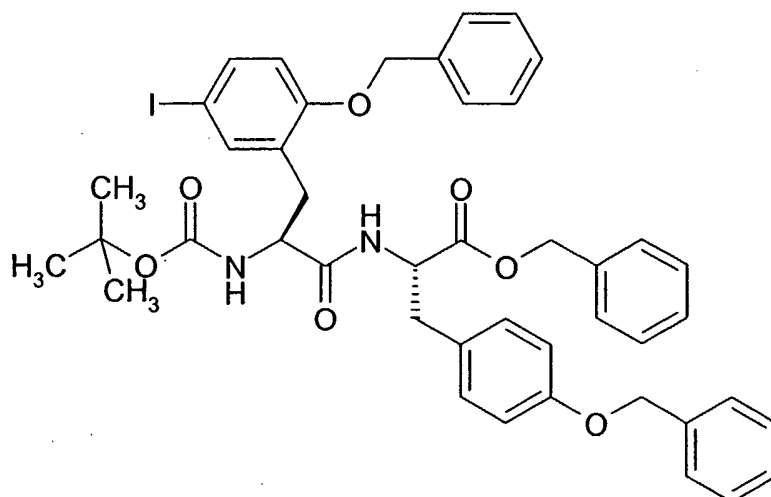
Ausbeute: 29 mg (58% d. Th.)

LC-MS (Methode 2):  $R_t = 3.35$  min.

10 MS (EI):  $m/z = 1260$   $[M+H]^+$

### **Beispiel 20A**

Benzyl-2-(benzyloxy)-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-5-iod-L-phenylalanyl-*O*-benzyl-L-tyrosinat



- Unter Argonatmosphäre werden 400 mg (0.80 mmol) 3-(2-Benzyloxy-5-iod-phenyl)-2(*S*)-*tert*-butoxycarbonylamino-propionsäure (Beispiel (-)-6A aus WO03/106480) und 400 mg (1.01 mmol) Benzyl-*O*-benzyl-L-tyrosinat-Hydrochlorid in 6 ml DMF suspendiert und mit 382 mg (1.01 mmol)
- 5 HATU und 364 mg (2.82 mmol) Hünig-Base versetzt. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Anschließend versetzt man mit 150 ml Wasser und filtriert das ausgefallene Produkt ab. Das Rohprodukt wird in 20 ml Diisopropylether ausgerührt und am Hochvakuum getrocknet.

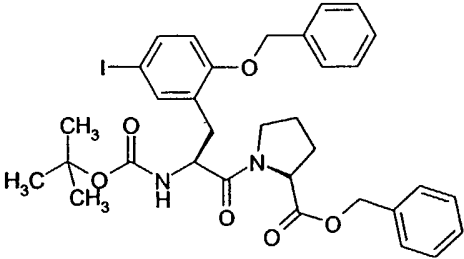
Ausbeute: 650 mg (96% d.Th.)

LC-MS (Methode 2):  $R_t = 3.30$  min.

- 10 MS (EI):  $m/z = 841$   $[M+H]^+$

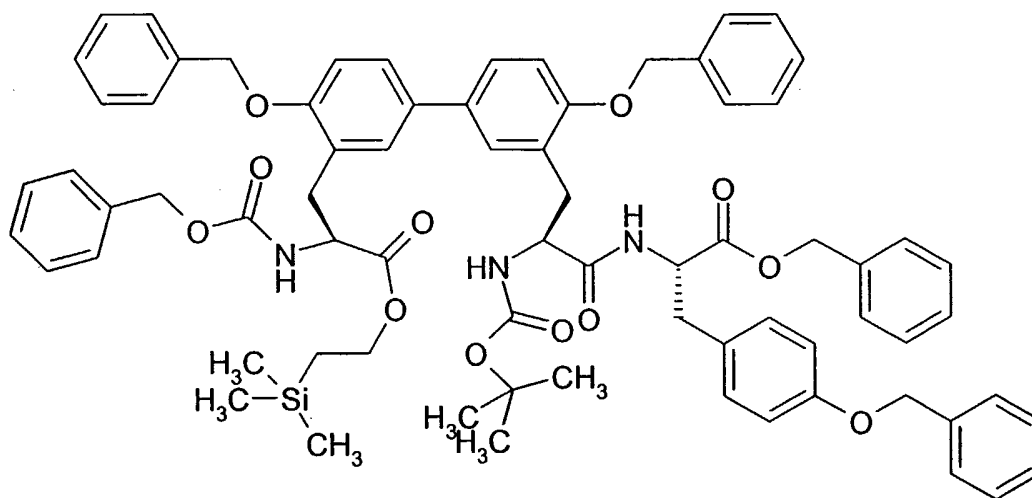
Analog zur Vorschrift des Beispiels 20A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 21A und 22A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
21A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 3.35$ min. MS (EI): $m/z = 701$ $[M+H]^+$

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
22A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 3.25$ min. MS (EI): $m/z = 685$ $[M+H]^+$

**Beispiel 23A**

2-(Trimethylsilyl)ethyl-2-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-3-(4,4'-bis(benzyloxy)-3'-{(2S)-3-((1S)-2-(benzyloxy)-1-[4-(benzyloxy)benzyl]-2-oxoethyl) amino)-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-oxopropyl} biphenyl-3-yl)propanoat



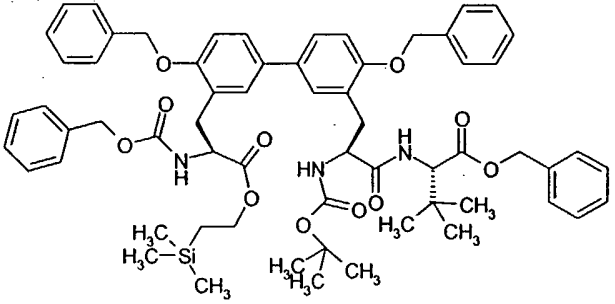
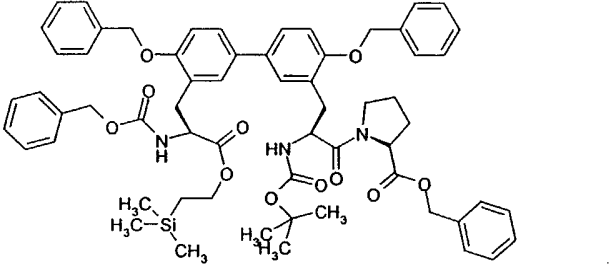
Unter Argonatmosphäre werden 446 mg (0.60 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-2-(benzyloxy)-*N*-[[[(benzyloxy)carbonyl]-5-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-*L*-phenylalaninat (Beispiel 1A) und 639 mg (0.60 mmol) Beispiel 20A in 6 ml DMSO gelöst und 30 min mit Argon gespült. Man versetzt mit 44 mg (0.06 mmol) Bis(diphenylphosphino)ferrocen-palladium(II)chlorid und 391 mg (1.20 mmol) Cäsiumcarbonat und erhitzt für 8 h bei 80°C unter einem konstanten Argon-Strom. Anschließend wird über einen Spritzenfilter filtriert und per RP-HPLC (Wasser/Acetonitril) gereinigt. Das Rohprodukt wird in Diethylether ausgerührt und am Hochvakuum getrocknet.

15 Ausbeute: 219 mg (30% d.Th.)

LC-MS (Methode 4):  $R_t = 3.69$  min.

MS (EI):  $m/z = 1218$   $[M+H]^+$

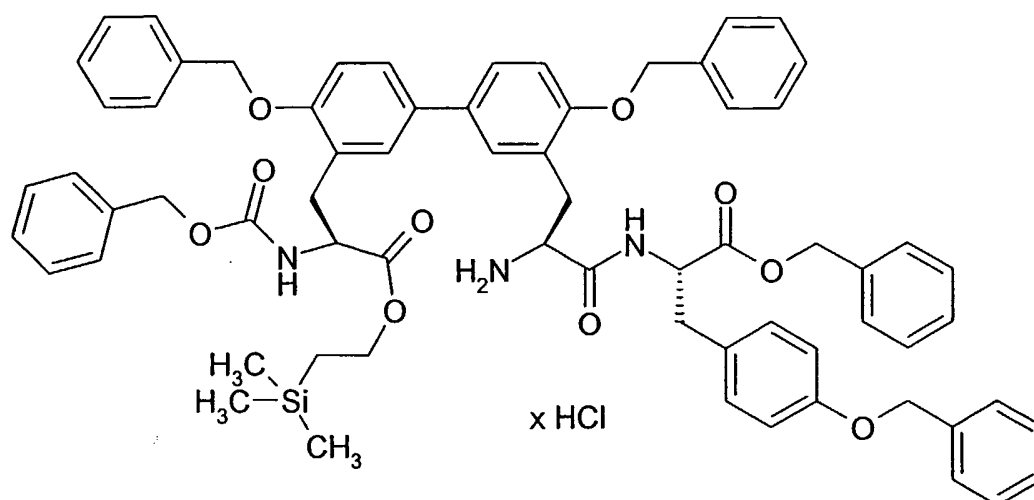
Analog zur Vorschrift des Beispiels 23A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 24A und 25A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
24A		<p>LC-MS (Methode 2): <math>R_t = 3.46</math> min.</p> <p>MS (EI): <math>m/z = 1078</math> <math>[M+H]^+</math></p>
25A		<p>LC-MS (Methode 2): <math>R_t = 3.42</math> min.</p> <p>MS (EI): <math>m/z = 1062</math> <math>[M+H]^+</math></p>

5

### **Beispiel 26A**

2-(Trimethylsilyl)ethyl-3-[3'-[(2S)-2-amino-3-({(1S)-2-(benzyloxy)-1-[4-(benzyloxy)benzyl]-2-oxoethyl}amino)-3-oxopropyl]-4,4'-bis(benzyloxy)biphenyl-3-yl]-2-{{(benzyloxy)carbonyl}-amino}propanoat Hydrochlorid



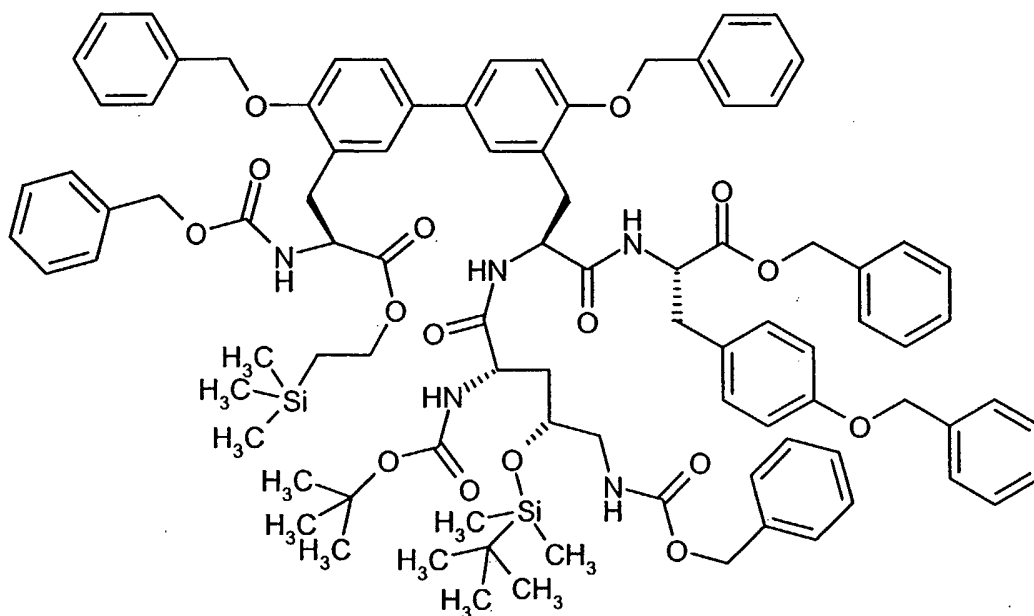
Unter Argonatmosphäre werden 163 mg (0.13 mmol) Beispiel 23A in 6 ml Dioxan/Chlorwasserstoff-Lösung (4M Lösung) gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird am Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

- 5 Analog zur Vorschrift des Beispiels 26A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 27A und 28A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
27A		LC-MS (Methode 2): $R_t = 2.90$ min. MS (EI): $m/z = 978$ $[M-HCl+H]^+$
28A		

**Beispiel 29A**

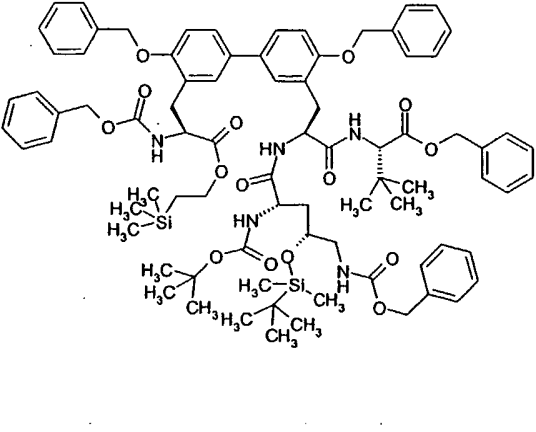
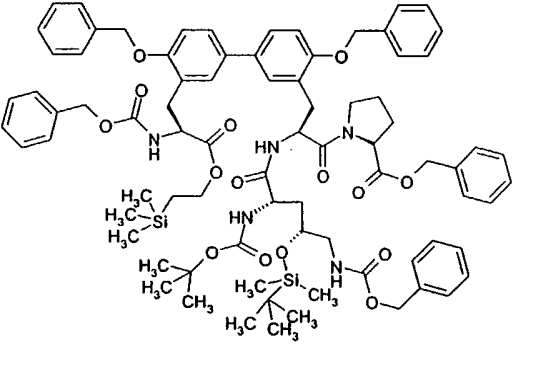
Benzyl(6R,8S,11S,14S)-14-[4-(benzyloxy)benzyl]-11-[(4,4'-bis(benzyloxy)-3'-{2-[[benzyloxy]-carbonyl]amino}-3-oxo-3-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]propyl}biphenyl-3-yl)methyl]-8-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy]-3,9,12-trioxo-1-phenyl-2-oxa-4,10,13-triazapentadecan-15-olat



Unter Argonatmosphäre werden 150 mg (0.13 mmol) Beispiel 26A und 80 mg (0.16 mmol) 5-Benzyloxycarbonylamino-2(*S*)-*tert*-butoxycarbonylamino-4(*R*)-(tert-butyl-dimethylsilylanyloxy)-pentansäure (Beispiel 14A aus WO03/106480) in 5 ml DMF gelöst und nacheinander mit 64 mg (0.17 mmol) HATU und 61 mg (0.47 mmol) Hünig-Base versetzt. Man rührt 4 d bei Raumtemp. Zur Aufarbeitung wird die Reaktionslösung direkt über RP-HPLC HPLC (Wasser/Acetonitril) gereinigt. Das so erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

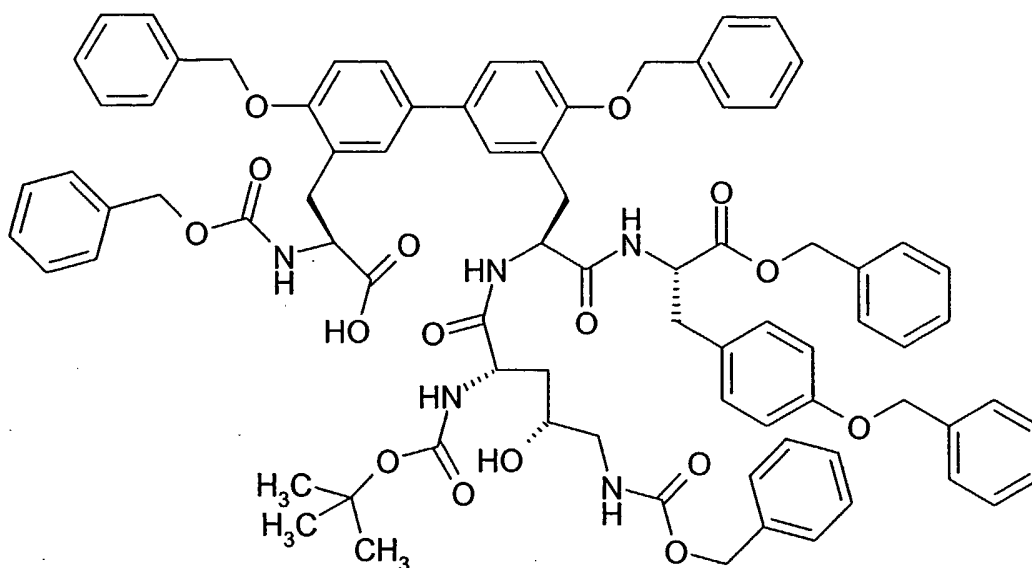
Ausbeute: 152 mg (70% d.Th.)

Analog zur Vorschrift des Beispiels 29A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 30A und 31A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
30A		LC-MS (Methode 2): $R_t = 3.85$ min. MS (EI): $m/z = 1474$ $[M+H]^+$
31A		LC-MS (Methode 2): $R_t = 3.74$ min. MS (EI): $m/z = 1440$ $[M+H]^+$

**Beispiel 32A**

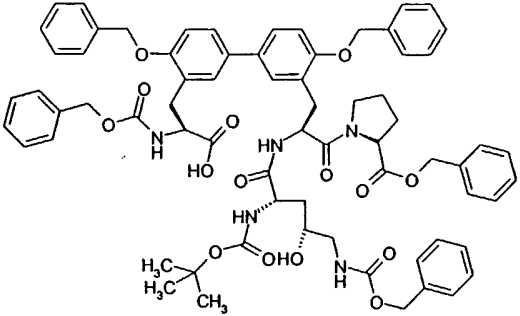
2-[[[(Benzyloxy)carbonyl]amino]-3-{4,4'-bis(benzyloxy)-3'-[(2S)-3-((1S)-2-(benzyloxy)-1-[4-(benzyloxy)benzyl]-2-oxoethyl)amino]-2-((2S,4R)-5-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-4-hydroxypentanoyl]amino)-3-oxopropyl]biphenyl-3-yl}propanäure



Unter Argonatmosphäre werden 152 mg (0.09 mmol) Beispiel 29A in 5 ml DMF gelöst und mit 0.50 ml Tetrabutylammoniumfluorid (1M Lösung) versetzt. Man rührt 5 h bei Raumtemperatur und versetzt anschließend mit 15 ml Wasser. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt, mit 100 ml  
 5 Wasser gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

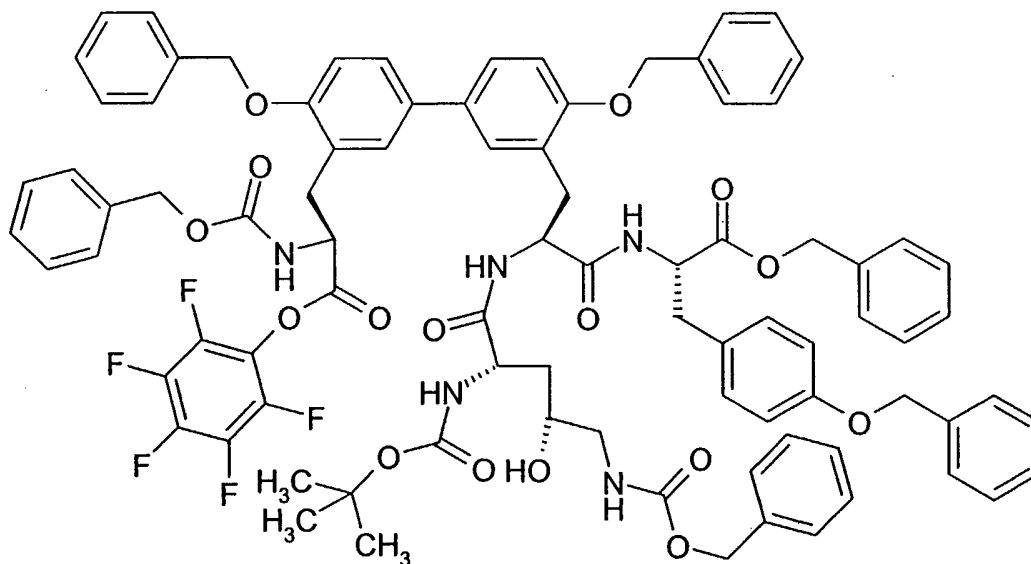
Analog zur Vorschrift des Beispiels 32A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 33A und 34A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
33A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 3.32$ min. MS (EI): $m/z = 1259 [M+H]^+$

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
34A		

**Beispiel 35A**

Benzyl(6R,8S,11S,14S)-14-[4-(benzyloxy)benzyl]-11-({4,4'-bis(benzyloxy)-3'-[2-  
 5 [(benzyloxy)carbonyl]amino]-3-oxo-3-(pentafluorophenoxy)propyl]biphenyl-3-yl)methyl)-8-  
 [(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-6-hydroxy-3,9,12-trioxo-1-phenyl-2-oxa-4,10,13-triazapentadecan-  
 15-olat



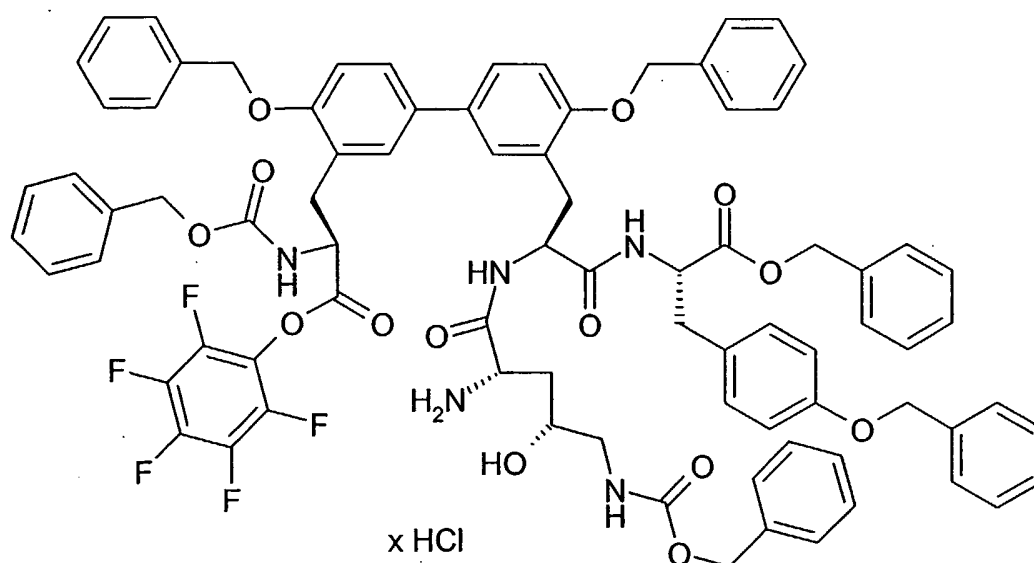
Unter Argonatmosphäre werden 131 mg (0.09 mmol) Beispiel 32A in 3 ml DMF gelöst und mit  
 87 mg (0.47 mmol) Pentafluorphenol und 2 mg DMAP versetzt. Man kühlt auf  $-25^{\circ}\text{C}$  und versetzt  
 10 mit 23 mg (0.12 mmol) EDC. Man lässt auf Raumtemperatur erwärmen und rührt über Nacht. Zur  
 Aufarbeitung wird am Hochvakuum getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere  
 Reinigung umgesetzt.

Analog zur Vorschrift des Beispiels 35A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 36A und 37A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
36A		
37A		

### Beispiel 38A

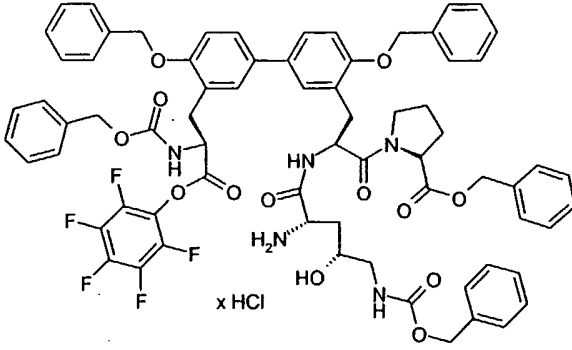
- 5 Benzyl(6R,8S,11S,14S)-8-amino-14-[4-(benzyloxy)benzyl]-11-({4,4'-bis(benzyloxy)-3'-[2-{{(benzyloxy)carbonyl}amino}-3-oxo-3-(pentafluorophenoxy)propyl]biphenyl-3-yl}methyl)-6-hydroxy-3,9,12-trioxo-1-phenyl-2-oxa-4,10,13-triazapentadecan-15-yl} Hydrochlorid



Unter Argonatmosphäre werden 141 mg (0.09 mmol) Beispiel 35A in 5 ml Dioxan/Chlorwasserstoff-Lösung (4M Lösung) gelöst. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wird am Rotationsverdampfer eingengt und zweimal mit Methylenchlorid codestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Analog zur Vorschrift des Beispiels 38A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 39A und 40A hergestellt.

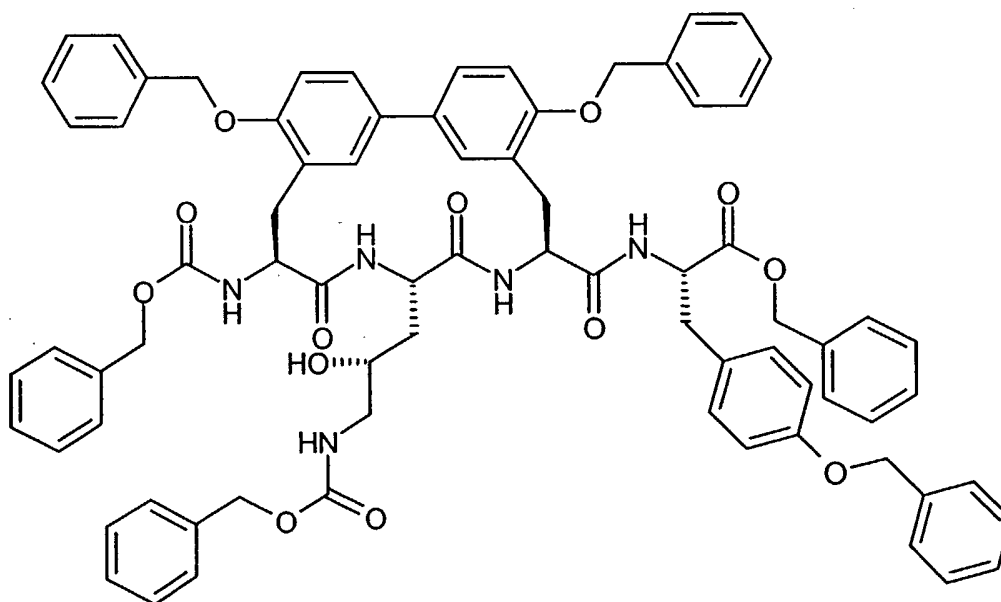
Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
39A	<p>The structure is identical to the one above, but the side chain on the right is a tert-butyl group instead of a benzyl group. The rest of the molecule, including the tetrafluorophenyl group and the various amide linkages, remains the same. It is also shown as a hydrochloride salt (x HCl).</p>	

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
40A		

**Beispiel 41A**

Benzyl-*O*-benzyl-*N*-{[(8*S*,11*S*,14*S*)-5,17-bis(benzyloxy)-14-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-11-((2*R*)-3-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-2-hydroxypropyl)-10,13-dioxo-9,12-diazatri-

5 cyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-yl]carbonyl}-*L*-tyrosinat



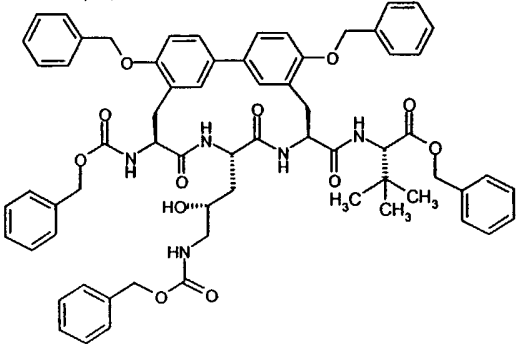
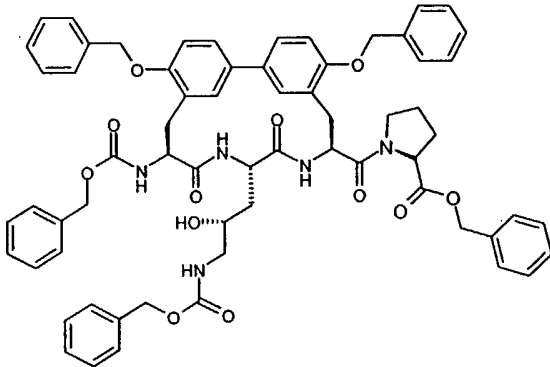
Unter Argonatmosphäre werden 141 mg (0.09 mmol) Beispiel 38A in 5 ml Dioxan/Chlorwasserstoff-Lösung (4M Lösung) gelöst. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wird am Rotationsverdampfer eingengt und zweimal mit Methylenchlorid codestilliert.

10 Ausbeute: 35 mg (31% d.Th.)

LC-MS (Methode 2):  $R_t = 3.30$  min.

MS (EI):  $m/z = 1281$   $[M+H]^+$

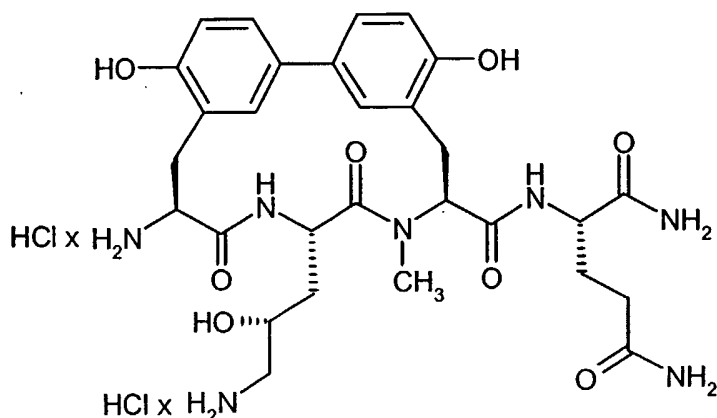
Analog zur Vorschrift des Beispiels 41A werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 42A und 43A hergestellt.

Beispiel-Nr.	Struktur	Analytische Daten
42A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 3.32$ min. MS (EI): $m/z = 1124$ $[M+H]^+$
43A		LC-MS (Methode 2): $R_t = 3.15$ min. MS (EI): $m/z = 1108$ $[M+H]^+$

**Herstellungsbeispiele****Beispiel 1**

N<sup>2</sup>-{[(8S,11S,14S)-14-Amino-11-[(2R)-3-amino-2-hydroxypropyl]-5,17-dihydroxy-9-methyl-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-yl]carbonyl}-

5 L-glutamamid-Dihydrochlorid



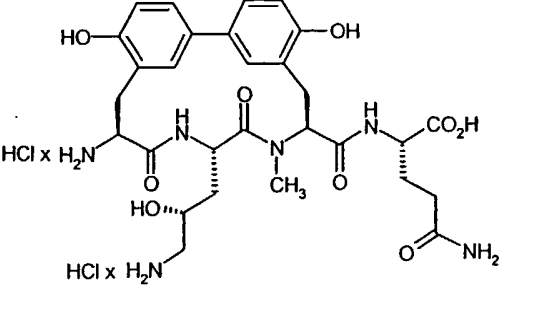
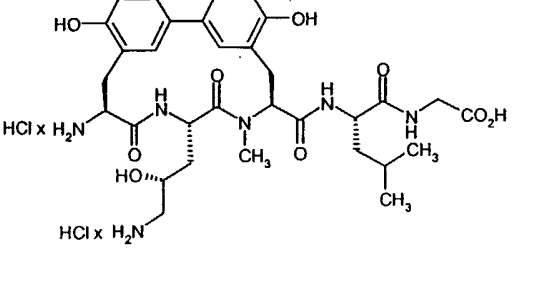
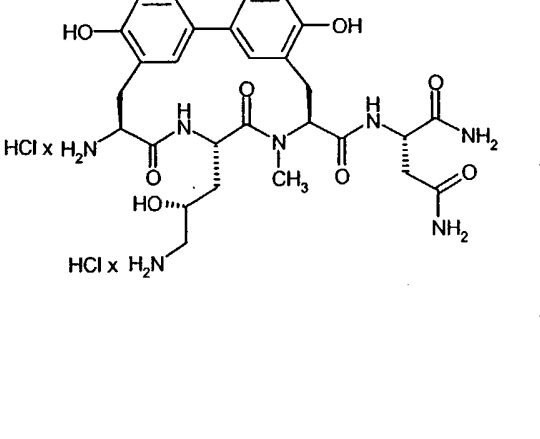
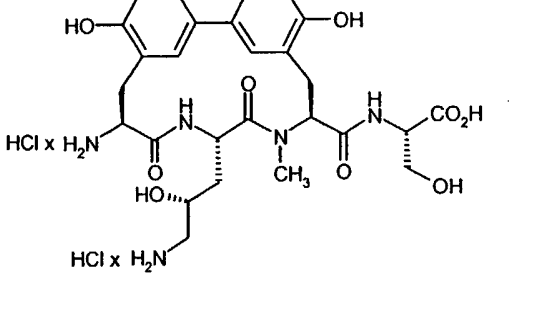
3.7 mg (0.0045 mmol) der Verbindung aus Beispiel 5A werden unter Rühren mit 1 ml 4N Dioxan/Chlorwasserstoff-Lösung übergossen und 1 h bei RT gerührt. Man dampft anschließend alles im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz ein.

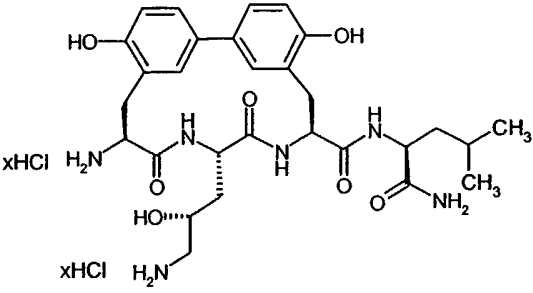
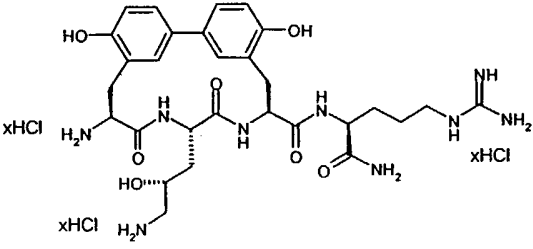
10 Ausbeute: 3 mg (96% d. Th.)

LC-MS (Methode 4): R<sub>t</sub> = 0.31 min.

MS (EI): m/z = 614 [M-2HCl+H]<sup>+</sup>

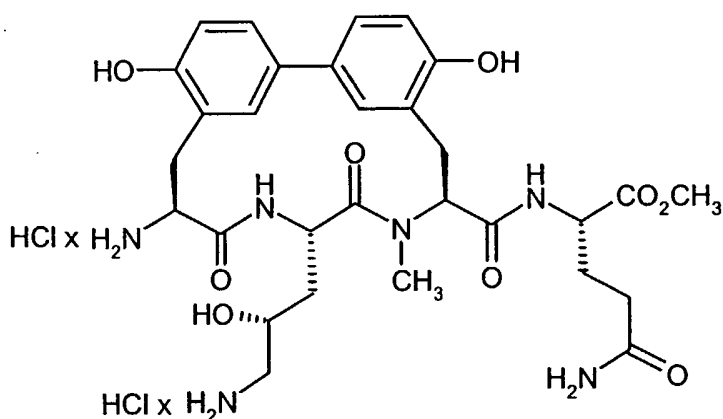
Analog zur Vorschrift des Beispiels 1 werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 2 bis 7 hergestellt.

Beispiel-Nr.	Ausgangs- verbindung	Struktur	Analytische Daten
2	Beispiel 6A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 0.31 \text{ min.}$ MS (EI): $m/z = 615$ $[M-2HCl+H]^+$
3	Beispiel 7A		LC-MS (Methode 2): $R_t = 0.93 \text{ min.}$ MS (EI): $m/z = 657$ $[M-2HCl+H]^+$
4	Beispiel 8A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 0.33 \text{ min.}$ HPLC (Methode 3): $R_t = 2.90 \text{ min.}$ MS (EI): $m/z = 600$ $[M-2HCl+H]^+$
5	Beispiel 12A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 0.34 \text{ min.}$ MS (EI): $m/z = 574$ $[M-2HCl+H]^+$

Beispiel-Nr.	Ausgangs- verbindung	Struktur	Analytische Daten
6	Beispiel 10A		LC-MS (Methode 5): $R_t = 1.00 \text{ min.}$ MS (EI): $m/z = 585$ $[M-2HCl+H]^+$
7	Beispiel 11A		LC-MS (Methode 5): $R_t = 0.24 \text{ min.}$ MS (EI): $m/z = 628$ $[M-3HCl+H]^+$

### Beispiel 8

Methyl-N<sup>2</sup>-{[(8S,11S,14S)-14-amino-11-[(2R)-3-amino-2-hydroxypropyl]-5,17-dihydroxy-9-methyl-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicos-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-yl]carbonyl}-L-glutaminat-Dihydrochlorid



6 mg der Verbindung aus Beispiel 2 werden in 2 ml Methanol suspendiert, mit 10 Tropfen 4N Dioxan/Chlorwasserstoff-Lösung versetzt und zwei Tage bei RT gerührt. Man engt alles im Vakuum ein und trennt den Rückstand mittels Dickschichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol/wässrige Ammoniak-Lösung = 70/25/7). Die das Produkt enthaltende Zone wird

abgekratzt, mit Methanol eluiert, mit Dioxan/Chlorwasserstoff-Lösung versetzt und mit Acetonitril gefällt.

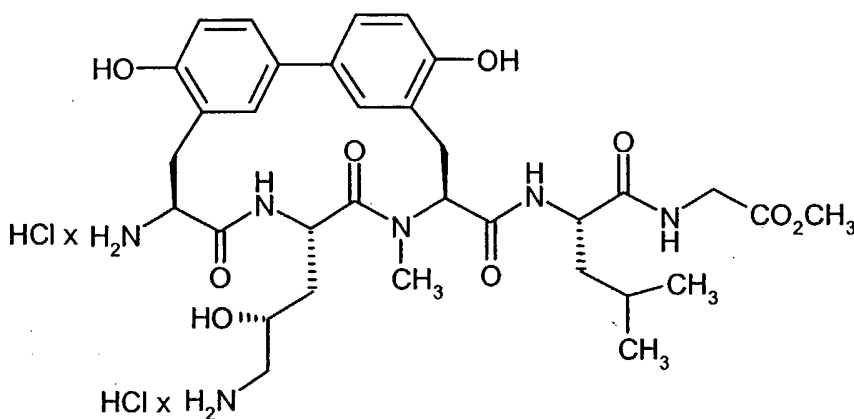
Ausbeute: 1.2 mg (21% d.Th.)

LC-MS (Methode 4):  $R_t = 0.39$  min.

5 MS (EI):  $m/z = 629$   $[M-2HCl+H]^+$

### Beispiel 9

Methyl-*N*-{[(8*S*,11*S*,14*S*)-14-amino-14-[(2*R*)-3-amino-2-hydroxypropyl]-5,17-dihydroxy-9-methyl-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-yl]carbonyl}-*L*-leucylglycinat-Dihydrochlorid



Die Herstellung erfolgt analog Beispiel 8 aus 4 mg (0.01 mmol) der Verbindung aus Beispiel 3.

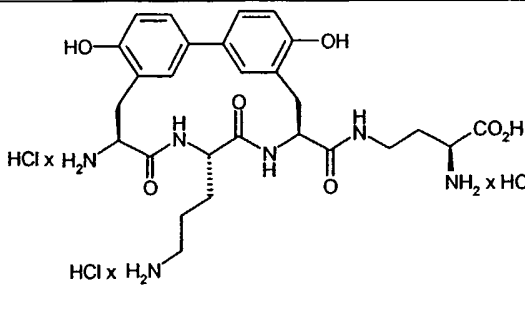
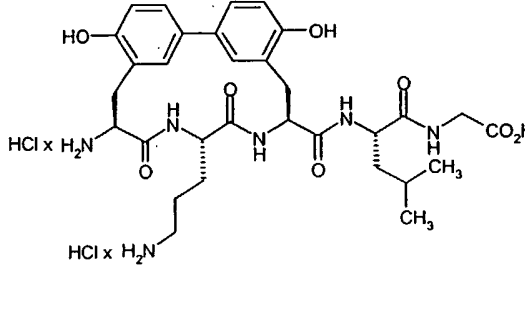
Ausbeute: 4 mg (82% d.Th.)

LC-MS (Methode 2):  $R_t = 0.96$  min.

MS (EI):  $m/z = 671$   $[M-2HCl+H]^+$

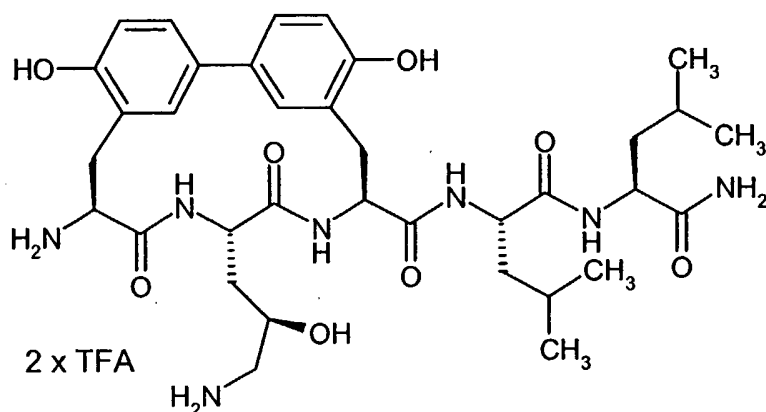
15 Die in der folgenden Tabelle aufgeführten *L*-Ornithin-Derivate (Beispiele 10 bis 15) werden analog Beispiel 1 hergestellt.

Beispiel-Nr.	Ausgangs- verbindung	Struktur	Analytische Daten
10	Beispiel 13A		LC-MS (Methode 2):  $R_t = 0.88 \text{ min.}$  MS (EI): $m/z = 567$ $[M-2HCl+H]^+$
11	Beispiel 14A		LC-MS (Methode 2):  $R_t = 0.28 \text{ min.}$  HPLC (Methode3):  $R_t = 2.90 \text{ min.}$  MS (EI): $m/z = 555$ $[M-2HCl+H]^+$
12	Beispiel 15A		LC-MS (Methode 4):  $R_t = 0.29 \text{ min.}$  HPLC (Methode 7):  $R_t = 2.94 \text{ min.}$  MS (EI): $m/z = 570$ $[M-2HCl+H]^+$
13	Beispiel 16A		LC-MS (Methode 5):  $R_t = 0.29 \text{ min.}$  MS (EI): $m/z = 584$ $[M-2HCl+H]^+$

Beispiel-Nr.	Ausgangs- verbindung	Struktur	Analytische Daten
14	Beispiel 17A		LC-MS (Methode 4): $R_t = 0.28 \text{ min.}$ MS (EI): $m/z = 557$ $[M-3HCl+H]^+$
15	Beispiel 18A		LC-MS (Methode 1): $R_t = 1.19 \text{ min.}$ MS (EI): $m/z = 627$ $[M-2HCl+H]^+$

### Beispiel 16

*N*-{[(8*S*,11*S*,14*S*)-14-Amino-11-[(2*R*)-3-amino-2-hydroxypropyl]-5,17-dihydroxy-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-yl]carbonyl}-L-leucyl-L-leucinamid-Bis(hydrotrifluoracetat)



29 mg (0.023 mmol) der Verbindung aus Beispiel 19A werden in 12 ml Eisessig/Wasser/Ethanol = 4/1/1 suspendiert, mit 8 mg Pd/C-Katalysator (10%ig) versetzt und 24 h bei RT hydriert. Der Ka-

talysator wird abfiltriert, das Filtrat wird im Vakuum eingedampft, und das Rohprodukt wird durch HPLC (Kromasil 100C18, Laufmittel Acetonitril / 0.2% wässrige TFA, Gradient) gereinigt.

Ausbeute: 2.6 mg (12% d. Th.)

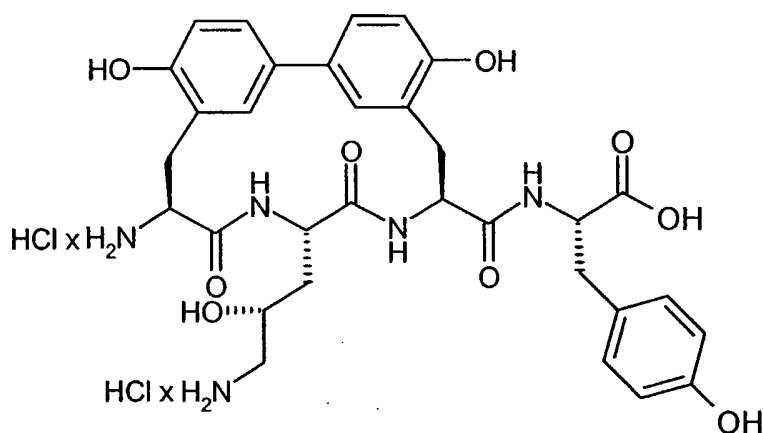
LC-MS (Methode 2):  $R_t = 1.04$  min.

5 MS (EI):  $m/z = 698$  [M-2TFA+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 0.84$  (m<sub>c</sub>, 12H), 1.25 (m<sub>c</sub>, 2H), 1.45-1.7 (m, 6H), 1.84 (m<sub>c</sub>, 1H), 1.95 (m<sub>c</sub>, 1H), 2.83 (m<sub>c</sub>, 2H), 2.92-3.22 (m, 4H), 3.5 (m<sub>c</sub>, 1H), 3.8 (m<sub>c</sub>, 1H), 4.28 (m<sub>c</sub>, 1H), 4.33-4.4 (m, 2H), 4.78 (m<sub>c</sub>, 1H), 4.87 (m<sub>c</sub>, 1H), 6.80 (d, 1H), 6.85 (d, 1H), 6.88 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.27 (d, 1H), 7.47 (d, 1H).

#### 10 Beispiel 17

*N*-{[(8S,11S,14S)-14-Amino-11-[(2R)-3-amino-2-hydroxypropyl]-5,17-dihydroxy-10,13-dioxo-9,12-diazatricyclo[14.3.1.1<sup>2,6</sup>]henicosa-1(20),2(21),3,5,16,18-hexaen-8-yl]carbonyl}-L-tyrosin-Dihydrochlorid



15 Bei Raumtemperatur werden 35 mg (0.03 mmol) Beispiel 41A in 6 ml Eisessig/Wasser/Ethanol = 4/1/1 suspendiert. Nach Zugabe von 16 mg (0.15 mmol) Pd/C-Katalysator (10%ig) wird 2 d bei Raumtemperatur unter Normaldruck hydriert. Die Reaktionslösung wird über einen Spritzenfilter filtriert und mit 560  $\mu$ g 0.1M Salzsäure versetzt. Es wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet.

20 Ausbeute: 12 mg (69% d.Th.)

LC-MS (Methode 4):  $R_t = 1.04$  min.

MS (EI):  $m/z = 636 [M-2HCl+H]^+$

Analog zur Vorschrift des Beispiels 17 werden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Beispiele 18 und 19 hergestellt.

Beispiel-Nr.	Ausgangs- verbindung	Struktur	Analytische Daten
18	Beispiel 42A		LC-MS (Methode 2):  $R_t = 0.88 \text{ min.}$  MS (EI): $m/z = 586$ $[M-2HCl+H]^+$
19	Beispiel 43A		LC-MS (Methode 2):  $R_t = 0.76 \text{ min.}$  MS (EI): $m/z = 570$ $[M-2HCl+H]^+$

**B. Bewertung der physiologischen Wirksamkeit****Verwendete Abkürzungen:**

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BHI Medium	Brain heart infusion medium
CoA	Coenzym A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MTP	Mikrotiterplatte
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NTP	Nukleotidtriphosphat
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan

Die *in vitro*-Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann in folgenden Assays gezeigt  
5 werden:

**In vitro Transkription-Translation mit *E. coli* Extrakten**

Zur Herstellung eines S30-Extraktes werden logarithmisch wachsende *Escherichia coli* MRE 600  
(M. Müller; University Freiburg) geerntet, gewaschen und wie beschrieben für den *in vitro*  
Transkriptions-Translations-Test eingesetzt (Müller, M. and Blobel, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S*  
10 *A* 1984, 81, 7421-7425).

Dem Reaktionsmix des *in vitro* Transkriptions-Translations-Tests werden zusätzlich 1 µl cAMP (11.25 mg/ml) je 50 µl Reaktionsmix zugegeben. Der Testansatz beträgt 105 µl, wobei 5 µl der zu testenden Substanz in 5%igem DMSO vorgelegt werden. Als Transkriptionsmatrize werden 1 µg/100µl Ansatz des Plasmides pBESTLuc (Promega, Deutschland) verwendet. Nach Inkubation für 60 min bei 30°C werden 50 µl Luziferinlösung (20 mM Tricine, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT pH 7.8, 270 µM CoA, 470 µM Luziferin, 530 µM ATP) zugegeben und die entstehende Biolumineszenz für 1 Minute in einem Luminometer gemessen. Als IC<sub>50</sub> wird die Konzentration eines Inhibitors angegeben, die zu einer 50%igen Inhibition der Translation von Firefly Luziferase führt.

## 10 **In vitro Transkription-Translation mit *S. aureus* Extrakten**

### **Konstruktion eines *S. aureus* Luziferase Reporterplasmids**

Zur Konstruktion eines Reporterplasmids, welches in einem *in vitro* Transkriptions-Translations-Assay aus *S. aureus* verwendet werden kann, wird das Plasmid pBESTLuc (Promega Corporation, USA) verwendet. Der in diesem Plasmid vor der Firefly Luziferase vorhandene *E. coli tac* Promoter wird gegen den *capA1* Promoter mit entsprechender Shine-Dalgarno Sequence aus *S. aureus* ausgetauscht. Dazu werden die Primer CAPFor 5'-CGGCC-AAGCTTACTCGGATCCAGAGTTTGCAAAATATACAGGGGATTATATATAATGGAAAAC AAGAAAGGAAAATAGGAGGTTTATATGGAAGACGCCA-3' und CAPRev 5'-GTCATCGTCGGGAAGACCTG-3' verwendet. Der Primer CAPFor enthält den *capA1* Promotor, die Ribosomenbindestelle und die 5'-Region des Luziferase Gens. Nach PCR unter Verwendung von pBESTLuc als Template kann ein PCR-Produkt isoliert werden, welches das Firefly Luziferase Gen mit dem fusionierten *capA1* Promotor enthält. Dieses wird nach einer Restriktion mit ClaI und HindIII in den ebenfalls mit ClaI und HindIII verdauten Vektor pBESTLuc ligiert. Das entstandene Plasmid p1a kann in *E. coli* repliziert werden und als Template im *S. aureus in vitro* Transkriptions-Translations-Test verwendet werden.

### **Herstellung von S30 Extrakten aus *S. aureus***

Sechs Liter BHI Medium werden mit einer 250 ml Übernachtkultur eines *S. aureus* Stammes inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 2-4 wachsen gelassen. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet und in 500 ml kaltem Puffer A (10 mM Tris-acetat, pH 8.0, 14 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, 1 M KCl) gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren werden die Zellen in 250 ml kaltem Puffer A mit 50 mM KCl gewaschen und die erhaltenen Pellets bei -20°C für 60 min eingefroren. Die Pellets werden in 30 bis 60 min auf Eis aufgetaut und bis zu einem Gesamtvolumen von 99 ml in Puffer B (10 mM Tris-acetat, pH 8.0, 20 mM Magnesiumacetat,

1 mM DTT, 50 mM KCl) aufgenommen. Je 1.5 ml Lysostaphin (0.8 mg/ml) in Puffer B werden in 3 vorgekühlte Zentrifugenbecher vorgelegt und mit je 33 ml der Zellsuspension vermischt. Die Proben werden für 45 bis 60 min bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, bevor 150 µl einer 0.5 M DTT Lösung zugesetzt werden. Die lysierten Zellen werden bei 30.000 x g 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wird nach Aufnahme in Puffer B unter den gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert und die gesammelten Überstände werden vereinigt. Die Überstände werden nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und zu den oberen 2/3 des Überstandes werden 0.25 Volumen Puffer C (670 mM Tris-acetat, pH 8.0, 20 mM Magnesiumacetat, 7 mM Na<sub>3</sub>-Phosphoenolpyruvat, 7 mM DTT, 5.5 mM ATP, 70 µM Aminosäuren (complete von Promega), 75 µg Pyruvatkinase (Sigma, Deutschland))/ml gegeben. Die Proben werden für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Überstände werden über Nacht bei 4°C gegen 2 l Dialysepuffer (10 mM Tris-acetat, pH 8.0, 14 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, 60 mM Kaliumacetat) mit einem Pufferwechsel in einem Dialyseschlauch mit 3500 Da Ausschluss dialysiert. Das Dialysat wird auf eine Proteinkonzentration von etwa 10 mg/ml konzentriert, indem der Dialyseschlauch mit kaltem PEG 8000 Pulver (Sigma, Deutschland) bei 4°C bedeckt wird. Die S30 Extrakte können aliquotiert bei -70°C gelagert werden.

#### **Bestimmung der IC<sub>50</sub> im *S. aureus in vitro* Transcriptions-Translations-Assay**

Die Inhibition der Proteinbiosynthese der Verbindungen kann in einem *in vitro* Transkriptions-Translations-Assay gezeigt werden. Der Assay beruht auf der zellfreien Transkription und Translation von Firefly Luziferase unter Verwendung des Reporterplasmids p1a als Template und aus *S. aureus* gewonnenen zellfreien S30 Extrakten. Die Aktivität der entstandenen Luziferase kann durch Lumineszenzmessung nachgewiesen werden.

Die Menge an einzusetzenden S30 Extrakt bzw. Plasmid p1a muss für jede Präparation erneut ausgetestet werden, um eine optimale Konzentration im Test zu gewährleisten. 3 µl der zu testenden Substanz gelöst in 5% DMSO werden in eine MTP vorgelegt. Anschließend werden 10 µl einer geeignet konzentrierten Plasmidlösung p1a zugegeben. Anschließend werden 46 µl eines Gemisches aus 23 µl Premix (500 mM Kaliumacetat, 87.5 mM Tris-acetat, pH 8.0, 67.5 mM Ammoniumacetat, 5 mM DTT, 50 µg Folsäure/ml, 87.5 mg PEG 8000/ml, 5 mM ATP, 1.25 mM je NTP, 20 µM je Aminosäure, 50 mM PEP (Na<sub>3</sub>-Salz), 2.5 mM cAMP, 250 µg je *E. coli* tRNA/ml) und 23 µl einer geeigneten Menge *S. aureus* S30 Extrakt zugegeben und vermischt. Nach Inkubation für 60 min bei 30°C werden 50 µl Luziferinlösung (20 mM Tricine, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT pH 7.8, 270 µM CoA, 470 µM Luziferin, 530 µM ATP) und die entstehende Biolumineszenz für 1 min in einem Luminometer gemessen. Als IC<sub>50</sub> wird die Konzentration eines Inhibitors angegeben, die zu einer 50%igen Inhibition der Translation von Firefly Luziferase führt.

**Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

- Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die minimale Konzentration eines Antibiotikums, mit der ein Testkeim in seinem Wachstum über 18-24 h inhibiert wird. Die Hemmstoffkonzentration kann dabei nach mikrobiologischen Standardverfahren bestimmt werden (siehe z.B. The
- 5 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-fifth edition. NCCLS document M7-A5 [ISBN 1-56238-394-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2000). Die MHK der erfindungsgemäßen Verbindungen wird im Flüssigdilutionstest im 96er-Mikrotiter-Platten-Maßstab bestimmt. Die Bakterienkeime werden in einem Minimalmedium (18.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9.3 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 17.1 mM NaCl, 0.033 µg/ml Thiaminhydrochlorid, 1.2 µg/ml Nicotinsäure, 0.003 µg/ml Biotin, 1% Glucose, 25 µg/ml von jeder proteinogenen Aminosäure mit Ausnahme von Phenylalanin; [H.-P. Kroll; unveröffentlicht]) unter Zusatz von 0.4% BH-Bouillon kultiviert (Testmedium). Im Fall von *Enterococcus faecium* L4001 wird dem Testmedium hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS; GibcoBRL, Deutschland) in einer Endkonzentration von 10% zugesetzt. Übernachtskulturen der Testkeime werden auf eine OD<sub>578</sub> von 0.001 (im Falle der Enterokokken auf 0.01) in frisches Testmedium verdünnt und 1:1 mit Verdünnungen der Testsubstanzen (Verdünnungsstufen 1:2) in Testmedium inkubiert (200 µl Endvolumen). Die Kulturen werden bei 37°C für 18-24 Stunden inkubiert; Enterokokken in Gegenwart von 5% CO<sub>2</sub>.
- 10
- 15
- 20 Die jeweils niedrigste Substanzkonzentration, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum mehr auftrat, wird als MHK definiert. Die MHK-Werte in µM einiger erfindungsgemäßer Verbindungen gegenüber einer Reihe von Testkeimen sind in der nachstehenden Tabelle beispielhaft aufgeführt. Die Verbindungen zeigen eine abgestufte antibakterielle Wirkung gegen die meisten der Testkeime.

25 **Tabelle A**

Beispiel-Nr.	MHK <i>S. aureus</i> 133	IC <sub>50</sub> <i>S. aureus</i> 133 Translation
1	0.1	0.8
11	0.4	4.9
16	1	5.9

Beispiel-Nr.	MHK <i>S. aureus</i> 133	IC <sub>50</sub> <i>S. aureus</i> 133 Trans- lation
17	0.8	5

Alle Konzentrationsangaben in  $\mu\text{M}$ .

### Systemische Infektion mit *S. aureus* 133

Die Eignung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen kann in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden. Dazu werden die Tiere im allgemeinen mit einem geeigneten virulenten Keim infiziert und anschließend mit der zu testenden Verbindung, die in einer an das jeweilige Therapiemodell angepassten Formulierung vorliegt, behandelt. Speziell kann die Eignung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen in einem Sepsismodell an Mäusen nach Infektion mit *S. aureus* demonstriert werden.

Dazu werden *S. aureus* 133 Zellen über Nacht in BH-Bouillon (Oxoid, Deutschland) angezüchtet. Die Übernachtskultur wurde 1:100 in frische BH-Bouillon verdünnt und für 3 Stunden hochgedreht. Die in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Bakterien werden abzentrifugiert und zweimal mit gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Danach wird am Photometer (Dr. Lange LP 2W) eine Zellsuspension in Kochsalzlösung mit einer Extinktion von 50 Einheiten eingestellt. Nach einem Verdünnungsschritt (1:15) wird diese Suspension 1:1 mit einer 10%-igen Mucinsuspension gemischt. Von dieser Infektionslösung wird 0.2 ml/20 g Maus i.p. appliziert. Dies entspricht einer Zellzahl von etwa  $1-2 \times 10^6$  Keimen/Maus. Die i.v.-Therapie erfolgt 30 Minuten nach der Infektion. Für den Infektionsversuch werden weibliche CFW1-Mäuse verwendet. Das Überleben der Tiere wird über 6 Tage protokolliert. Das Tiermodell ist so eingestellt, dass unbehandelte Tiere innerhalb von 24 h nach der Infektion versterben. Für die Beispielverbindung 2 konnte in diesem Modell eine therapeutische Wirkung von  $\text{ED}_{100} = 1.25 \text{ mg/kg}$  demonstriert werden.

**C. Ausführungsbeispiele für pharmazeutische Zusammensetzungen**

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können folgendermaßen in pharmazeutische Zubereitungen überführt werden:

**Intravenös applizierbare Lösung:****5 Zusammensetzung:**

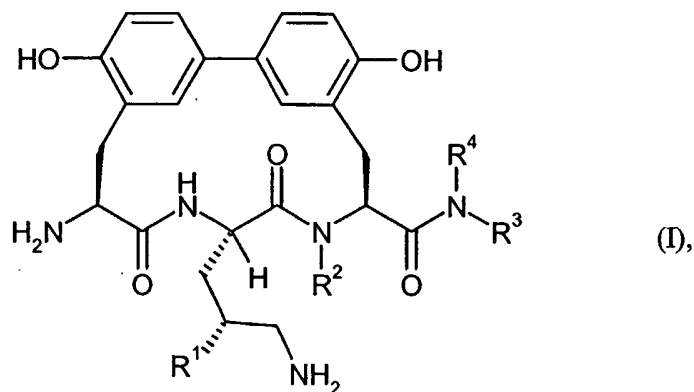
1 mg der Verbindung von Beispiel 1, 15 g Polyethylenglykol 400 und 250 g Wasser für Injektionszwecke.

**Herstellung:**

10 Die erfindungsgemäße Verbindung wird zusammen mit Polyethylenglykol 400 in dem Wasser unter Rühren gelöst. Die Lösung wird sterilfiltriert (Porendurchmesser 0.22 µm) und unter aseptischen Bedingungen in hitzesterilisierte Infusionsflaschen abgefüllt. Diese werden mit Infusionsstopfen und Bördelkappen verschlossen.

**Patentansprüche**

## 1. Verbindung der Formel



in welcher

5  $R^1$  gleich Wasserstoff oder Hydroxy ist,

$R^2$  gleich Wasserstoff oder Methyl ist,

$R^3$  gleich  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl bedeutet,

wobei Alkyl substituiert ist mit einem Substituenten, wobei der Substituent ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Hydroxycarbonyl, Aminocarbonyl,  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxycarbonyl und  $C_1$ - $C_6$ -Alkylaminocarbonyl,

10

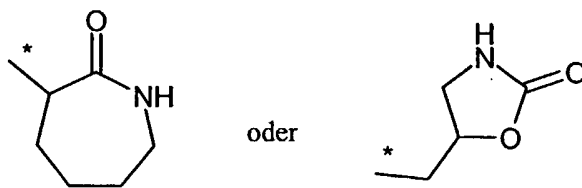
worin Alkylaminocarbonyl substituiert sein kann mit einem Substituenten, wobei der Substituent ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Hydroxycarbonyl,  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxycarbonyl und Aminocarbonyl,

und

15 wobei Alkyl substituiert sein kann mit einem oder zwei weiteren Substituenten, wobei die Substituenten unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Hydroxy, Amino, Hydroxycarbonyl,  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxycarbonyl, Aminocarbonyl, Guanidino und Hydroxy substituiertes Phenyl,

oder

20  $R^3$  gleich eine Gruppe der Formel



ist,

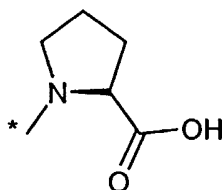
und

$R^4$  gleich Wasserstoff ist

5

oder

$R^3$  und  $R^4$  zusammen mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, eine Gruppe der Formel



bilden,

10

oder eines ihrer Salze, ihrer Solvate oder der Solvate ihrer Salze.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

$R^1$  gleich Wasserstoff oder Hydroxy ist,

$R^2$  gleich Wasserstoff oder Methyl ist,

$R^3$  gleich  $C_2$ - $C_4$ -Alkyl bedeutet,

15

wobei Alkyl substituiert ist mit einem Substituenten Aminocarbonyl und einem weiteren Substituenten, wobei der Substituent ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend Aminocarbonyl und Guanidino,

oder

wobei Alkyl substituiert ist mit einem Substituenten Hydroxycarbonyl und einem weiteren Substituenten Hydroxy,

20

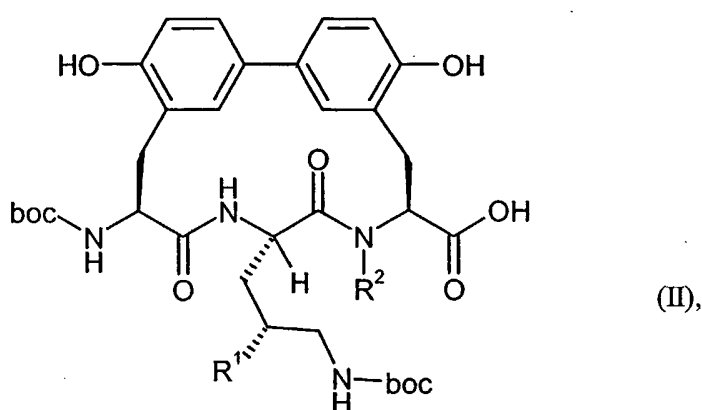
und

$R^4$  gleich Wasserstoff ist,

oder eines ihrer Salze, ihrer Solvate oder der Solvate ihrer Salze.

3. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (I) nach Anspruch 1 oder eines  
5 ihrer Salze, Solvate oder der Solvate ihrer Salze, dadurch gekennzeichnet, dass nach Ver-  
fahren

[A] eine Verbindung der Formel



10 worin  $R^1$  und  $R^2$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben und boc gleich *tert*-  
Butoxycarbonyl ist,

in einem zweistufigen Verfahren zunächst in Gegenwart von einem oder mehreren De-  
hydratisierungsreagenzien mit einer Verbindung der Formel

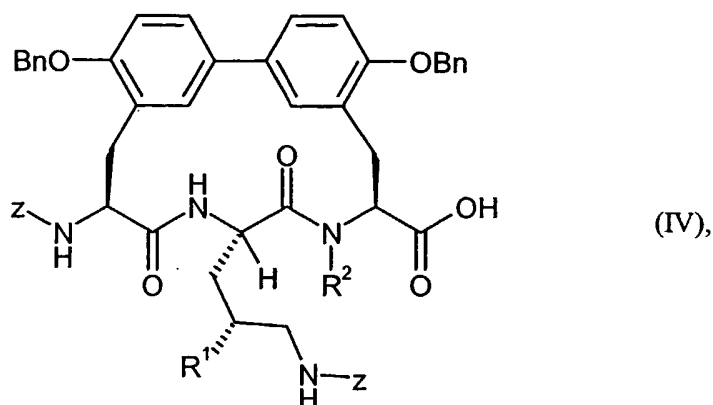


worin  $R^3$  und  $R^4$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben,

15 und anschließend mit einer Säure umgesetzt wird,

oder

[B] eine Verbindung der Formel



worin  $R^1$  und  $R^2$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben und Z gleich Benzyloxy-carbonyl ist,

in einem zweistufigen Verfahren zunächst in Gegenwart von einem oder mehreren Dehydratisierungsreagenzien mit einer Verbindung der Formel



worin  $R^3$  und  $R^4$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben,

und anschließend mit einer Säure oder durch Hydrogenolyse umgesetzt wird.

4. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel (I) nach Anspruch 1 oder eines ihrer Solvate, dadurch gekennzeichnet, dass ein Salz der Verbindung oder ein Solvat eines Salzes der Verbindung durch Chromatographie unter Zusatz einer Base in die Verbindung überführt wird.
5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.
6. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 in Kombination mit mindestens einem inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoff.
7. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.
8. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bakteriellen Erkrankungen.
9. Arzneimittel nach Anspruch 6 zur Behandlung und/oder Prophylaxe von bakteriellen Infektionen.

10. Verfahren zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen in Menschen und Tieren durch Verabreichung einer antibakteriell wirksamen Menge mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, eines Arzneimittels nach Anspruch 6 oder eines nach Anspruch 7 oder 8 erhaltenen Arzneimittels.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/003463

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K5/06 A61K38/05 A61P31/00				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K A61P				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No		
X	WO 03/106480 A (BAYER HEALTHCARE AG; LAMPE, THOMAS; ADELTE, ISABELLE; BEYER, DIETER; BR) 24 December 2003 (2003-12-24) cited in the application Beispiele 23A-30A, 32a-36A , speziell Beispiel 31a page 1, line 4 - page 1, line 7; claims -----	1-10		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
° Special categories of cited documents :				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;">                     *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                      *E* earlier document but published on or after the international filing date                      *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                      *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                      *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                 </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;">                     *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                      *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                      *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art                      *&amp;* document member of the same patent family                 </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search  <p style="text-align: center; font-weight: bold;">26 September 2005</p>	Date of mailing of the international search report  <p style="text-align: center; font-weight: bold;">07/10/2005</p>			
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  <p style="text-align: center; font-weight: bold;">Schmid, A</p>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/ EP2005/003463**

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  1. Claim 10:  
Although claim 10 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/003463

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03106480	A	24-12-2003	AU 2003245928 A1	31-12-2003
			BR 0311948 A	29-03-2005
			CA 2489454 A1	14-12-2004
			DE 10226921 A1	24-12-2003
			EP 1515983 A1	23-03-2005

---

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/003463

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C07K5/06 A61K38/05 A61P31/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTER GEBIETE**

Recherchiertes Mindestprüfstoß (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07K A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoß gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  
EPO-Internal, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/106480 A (BAYER HEALTHCARE AG; LAMPE, THOMAS; ADULT, ISABELLE; BEYER, DIETER; BR) 24. Dezember 2003 (2003-12-24) in der Anmeldung erwähnt Beispiele 23A-30A, 32a-36A, speziell Beispiel 31a Seite 1, Zeile 4 - Seite 1, Zeile 7; Ansprüche -----	1-10

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. September 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/10/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmid, A

## Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
  
Obwohl der Anspruch 10 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/003463

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03106480 A	24-12-2003	AU 2003245928 A1	31-12-2003
		BR 0311948 A	29-03-2005
		CA 2489454 A1	14-12-2004
		DE 10226921 A1	24-12-2003
		EP 1515983 A1	23-03-2005
-----			