

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) 024069

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2016.08.31

(51) Int. Cl. C07F 9/117 (2006.01)

(21) Номер заявки

201490726

(22) Дата подачи заявки

2012.09.28

### (54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИИ CLOSTRIDIUM DIFFICILE

(31) 11007935.7; 11007933.2

(32) 2011.09.29

(33) ЕР

(43) 2014.08.29

(86) PCT/EP2012/004088

(87) WO 2013/045107 2013.04.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЭТХ ЦЮРИХ (CH)

(72) Изобретатель:

Кастагнер Бастьен, Леру Жан-  
Кристофф, Иварссон Маттиас,  
Шнайдер Гисберт, Пратсинис Анна  
(CH)

(74) Представитель:

Носырева Е.Л. (RU)

(56) G. GUTTENBERG ET AL.: "Inositol Hexakisphosphate-dependent Processing of Clostridium sordellii Lethal Toxin and Clostridium novyi-Toxin", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 17, 29 April 2011 (2011-04-29), pages 14779-14786, XP055046383, SSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.200691 page 14784; figure 5

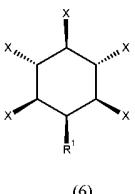
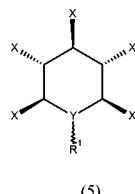
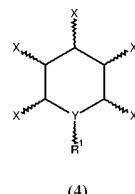
FLORIŃ I. ET AL.: "Polyphosphate-mediated protection from cellular intoxication with Clostridium difficile toxin B" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 805, no. 2, 2 October 1984 (1984-10-12), pages 31-136, XP025401706, SSN: 0167-4889, DOI: 10.1016/0167-4889(84)90159-9 [retrieved on 1984-10-12] page 131 page 133; table I

US-A1-2010048730

WO-A1-2010049921

WO-A1-2012138963

(57) Изобретение относится к фармацевтическому соединению, характеризующемуся общей формулой (4), (5) или (6)



где каждый X независимо может быть  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $\text{OPSO}_2^{2-}$  или  $\text{OSO}_3^-$ ; R<sup>1</sup> включает обеспечивающую растворимость функциональную группу, такую как полиэтиленгликоловый фрагмент и Y является CH или N. Настоящее изобретение также относится к применению указанных соединений в терапии инфекции, вызванной Clostridium difficile.

B1

024069

024069 B1

Изобретение относится к кишечным активаторам токсина *Clostridium difficile*, в частности к полифосфатным производным, полисульфатным производным или смешанным полифосфатным/сульфатным производным шестичленных циклических полиолов.

*Clostridium difficile* является одним из видов грамположительных бактерий, который вызывает сильную диарею у пациентов-людей. Инфекция *C. difficile* (CDI), как правило, поражает пациентов при лечении антибиотиками, так как бактерия способна колонизировать толстую кишку только у пациентов с истощенной бактериальной флорой. Появление устойчивых к антибиотикам штаммов *C. difficile* вызывает все более высокий уровень заболеваемости и смертности в связи с распространением новых, более вирулентных штаммов, с недавними вспышками в Северной Америке и Европе.

*C. difficile* бессимптомно колонизирует 2-5% взрослого населения. Бактерии формируют споры, которые трудно нейтрализовать с помощью обычных способов дезинфекции. Как результат, инфекции *C. difficile* являются общей причиной длительной госпитализации; патоген считается ведущей причиной госпитальной диареи в США.

Современной предпочтительной терапией является пероральное применение метронидазола или в случае неудачи первого варианта терапии - ванкомицина. Так как клинические симптомы CDI вызываются двумя токсичными белками, секретируемыми *C. difficile* в толстой кишке, а не присутствием непосредственно самой бактерии, в последнее время были предприняты усилия, нацеленные на эти токсины (например, с использованием полимерных связующих), но они также потерпели неудачу в клинических испытаниях.

Энтеротоксин (токсин A, TcdA) и цитотоксин (токсин B, TcdB) *C. difficile* являются основными факторами, обуславливающими появление симптомов заболевания (для обзора биологии токсинов см. Voth and Ballard, Clinical Microbiology Reviews 2005, 18, 247-263). Вкратце, оба токсина состоят из четырех доменов: первый домен, являющийся посредником в процессе прикрепления токсина к клеткам; второй, способствующий перемещению в цитозоль; третий домен, вызывающий расщепление токсичного домена в результате автопротеолиза, и, наконец, токсичный домен или собственно "боеголовка", который обуславливает физиологические эффекты токсина в пораженной клетке.

Reineke et al. (Nature 2007, 446, 415) определили мио-инозитолгексакисфосфат (IP6) как естественный триггер автопроцессинга TcdA/TcdB в цитозоле клетки. Egerer et al. (PLoS Pathog. 2010, 6, e1000942) и Shen et al. (Nat. Struct. Mol. Biol. 2011, 18, 364) предложили нацелить IP6-индуцированный механизм автопроцессинга в качестве средства терапевтического вмешательства на опосредованную токсином патогенность.

Kreimeyer et al. предложили фармацевтическое применение IP6 для вмешательства в CDI (Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2011, 383, 253). Однако этот подход не возможен, так как наличие высоких концентраций кальция в толстом кишечнике осаждает IP6 и предотвращает его активность.

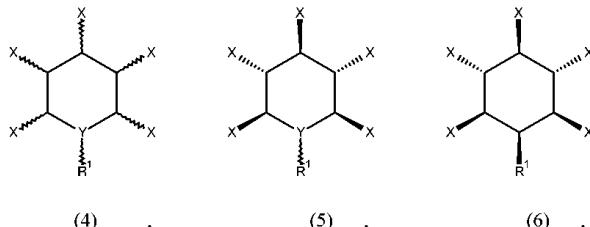
Таким образом, целью настоящего изобретения является создание усовершенствованных вариантов лечения пациентов, страдающих CDI. Эту цель достигают за счет отдельных объектов независимых пунктов формулы изобретения.

## Определения

Полимер из данной группы мономеров представляет собой гомополимер (составленный из нескольких одинаковых мономеров); сополимер из данного набора мономеров представляет собой гетерополимер, образованный по меньшей мере двумя из группы.

Настоящее изобретение основано на новой конструкции низкомолекулярных аналогов IP6, которые представлены в виде перорального терапевтического средства для индукции расщепления токсина в просвете толстой кишки, тем самым отщепляя боеголовку до того, как она достигает своего пункта назначения, и делая его безвредным. Так как сам по себе IP6 не может быть использован для этих целей, поскольку он не растворяется при высоких концентрациях кальция, обнаруживаемых в просвете толстой кишки, настоящее изобретение относится к новым аналогам IP6 с повышенной растворимостью.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложено фармацевтическое соединение, характеризующееся общей формулой (4), (5) или (6)



где  $R_1$  выбран из группы, включающей

где К<sub>1</sub> выбран из группы  
полиэтиленгликоль.

#### **ПОЛИЭТИЛЕН ПОЛИГЛИЦЕРИН**

каждый X независимо выбран из  $\text{OPO}_4^{2-}$ ,  $\text{OPSO}_4^{2-}$  или  $\text{OSC}_2^-$  и Y является CH или N

каждый X независимо выбран из OFO<sub>3</sub><sup>-</sup>, OFSO<sub>2</sub><sup>-</sup> или OSC<sub>3</sub><sup>-</sup> и Y является СН или Н.  
Обеспечивающая растворимость функциональная группа R<sup>1</sup> обеспечивает растворимость молекулы

в водном растворе в присутствии 10 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Молекула согласно настоящему изобретению имеет более высокую растворимость, чем IP6 в концентрациях кальция выше 1 ммоль/л; в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления растворимость молекулы по настоящему изобретению превышает 10 ммоль/л.

В некоторых вариантах осуществления указанный полиэтиленгликоль описан формулой  $(\text{R}^3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-)$ , при этом  $\text{R}^3$  является водородом, метилом или этилом и  $n$  имеет значение от 3 до 200. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение от 3 до 20. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение от 10 до 30. В некоторых вариантах осуществления  $n$  имеет значение от 9 до 45. В некоторых вариантах осуществления указанный полиэтиленгликоль является разветвленным полиэтиленгликолем.

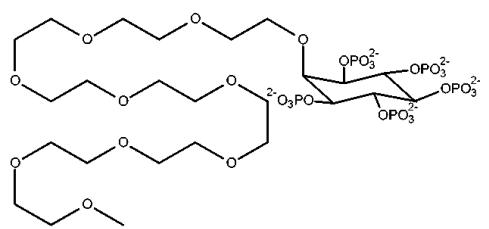
В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^1$  является полиглицерином, описанным формулой  $((\text{R}^3-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CHON}-\text{CH}_2\text{O})_n-)$ , при этом  $\text{R}^3$  является водородом, метилом или этилом, и  $n$  имеет значение от 3 до 200. В некоторых альтернативах этих вариантов осуществления  $n$  имеет значение от 3 до 20. В некоторых альтернативах этих вариантов осуществления  $n$  имеет значение от 10 до 30. В некоторых альтернативах этих вариантов осуществления  $n$  имеет значение от 9 до 45.

В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^1$  является разветвленным полиглицерином, описанным формулой  $(\text{R}^3-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CHOR}^5-\text{CH}_2\text{O})_n-)$ , при этом  $\text{R}^5$  является водородом или цепью линейного глицерина, описанной формулой  $(\text{R}^3-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CHON}-\text{CH}_2\text{O})_n-)$ , а  $\text{R}^3$  является водородом, метилом или этилом.

В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^1$  является гиперразветвленным полиглицерином, описанным формулой  $(\text{R}^3-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CHOR}^5-\text{CH}_2\text{O})_n-)$ , при этом  $\text{R}^5$  является водородом или глицериновой цепью, описанной формулой  $(\text{R}^3-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CHOR}^6-\text{CH}_2\text{O})_n-)$ , при этом  $\text{R}^6$  является водородом или глицериновой цепью, описанной формулой  $(\text{R}^3-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CHOR}^7-\text{CH}_2\text{O})_n-)$ , при этом  $\text{R}^7$  является водородом или цепью линейного глицерина, описанной формулой  $(\text{R}-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CHON}-\text{CH}_2\text{O})_n-)$ , и при этом  $\text{R}^3$  является водородом, метилом или этилом.

Гиперразветвленный глицерин и способы его синтеза описаны в Oudshorn et al., Biomaterials (2006), 27, 5471-5479; Wilms et al., Acc. Chem. Res. (2010) 43, 129-41, и источниках, указанных там же.

В одном варианте осуществления (6) включает поли(этиленгликоль) PEG400 в качестве обеспечивающей растворимость функциональной группы, при этом  $\text{R}^1$  является  $\text{CH}_3(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_9-\text{O}-$ ,

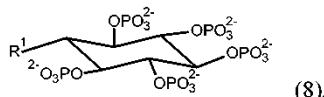


(7),

мио-инозитолпентакисфосфат-2-PEG(400) (7) является PEG<sub>400</sub>-аналогом мио-инозитолгексакисфосфата. Было доказано, что (7) характеризуется улучшенной способностью расщеплять TcdB CPD в присутствии кальция.

Другой вариант осуществления относится к PEG<sub>2000</sub>-аналогу для (7), т.е. PEG с примерно 45 этиленгликоловыми мономерами.

Другой вариант осуществления относится к аналогу цилилоинозитолгексакисфосфата, описанного формулой (8)

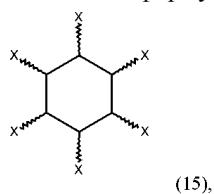


(8),

где  $\text{R}^1$  имеет то же самое значение, которое описано выше. В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению может быть описано формулой (8), а  $\text{R}^1$  является полиэтиленгликоловым фрагментом.

Обеспечивающая растворимость функциональная группа, полиэтиленгликоловая (PEG) цепь, показанная здесь в качестве неограничивающего примера, прикреплена к молекуле, чтобы сделать ее растворимой в просвете толстой кишки, при концентрациях кальция, указанных в данном контексте.

В соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения предложено фармацевтическое соединение, которое характеризуется представленной общей формулой (15)

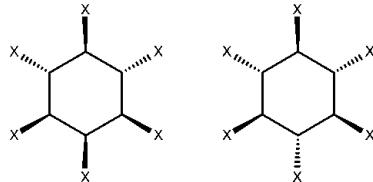


(15),

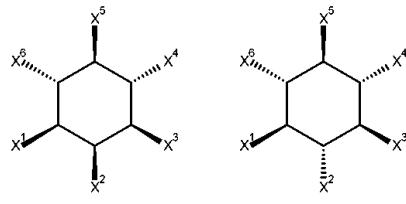
где каждый X независимо выбран из  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $\text{OPSO}_2^{2-}$ , or  $\text{OSO}_3^-$ , при условии, что не все X являются  $\text{OPO}_3^{2-}$  и не все X являются  $\text{OSO}_3^-$ .

В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения предложено соединение, характеризующееся в предыдущем абзаце формулой (15), для применения в качестве лекарственного препарата, в частности для применения в профилактике или терапии инфекций, вызванных *Clostridium difficile*.

В некоторых вариантах осуществления соединение в соответствии с этим вторым аспектом настоящего изобретения характеризуется общей формулой (15a) или (15b), где X имеет описанные выше значения,

(15a) (*мио*),(15b) (*сцило*).

В некоторых вариантах осуществления соединение в соответствии с этим вторым аспектом настоящего изобретения характеризуется общей формулой (16a) или (16b)



(16a) ,

(16b) ,

где

- $X^2$  является  $\text{OSO}_3^-$ , и  $X^1, X^3, X^4, X^5$  и  $X^6$  независимо выбраны из  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $\text{OPSO}_2^{2-}$  или  $\text{OSO}_3^-$ ,
- $X^1, X^3$  и  $X^5$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ , а  $X^2, X^4$  и  $X^6$  являются  $\text{OSO}_3^-$  (соединение 16a-b или 16b-b),
- $X^1, X^3$  и  $X^5$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , а  $X^2, X^4$  и  $X^6$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$  (соединение 16a-c или 16b-c),
- $X^4, X^5$  и  $X^6$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , а  $X^1, X^2$  и  $X^3$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$  (соединение 16a-d или 16b-d),
- $X^4, X^5$  и  $X^6$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ , а  $X^1, X^2$  и  $X^3$  являются  $\text{OSO}_3^-$  (соединение 16a-e или 16b-e),
- $X^2$  и  $X^5$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ , а  $X^1, X^3, X^4$  и  $X^6$  являются  $\text{OSO}_3^-$  (соединение 16a-f или 16b-f),
- $X^2$  и  $X^5$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , а  $X^1, X^3, X^4$  и  $X^6$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$  (соединение 16a-g или 16b-g),
- $X^2$  и  $X^3$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ , а  $X^1, X^4, X^5$  и  $X^6$  являются  $\text{OSO}_3^-$  (соединение 16a-h или 16b-h), или
- $X^2$  и  $X^3$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , а  $X^1, X^4, X^5$  и  $X^6$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$  (соединение 16a-i или 16b-i).

Соединения, определенные выше, могут быть синтезированы в соответствии со стандартными способами. Синтез соединения 16a-b описан в примерах настоящего изобретения.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено соединение по любому из вышеуказанных аспектов настоящего изобретения в самом широком данном определении, или как указано в любом из вариантов осуществления, для применения в качестве лекарственного препарата.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено соединение по любому из вышеуказанных аспектов настоящего изобретения в самом широком данном определении, или как определено в любом из вариантов осуществления, для применения при лечении и профилактике инфекции *C. difficile*.

Соединение согласно настоящему изобретению может быть дано пациенту с уже поставленным диагнозом CDI или пациенту, который предположительно страдает от CDI. Альтернативно, соединение можно применять в качестве профилактического средства для пациентов, которые подвержены риску заражения инфекцией, таких как пациенты, проходящие лечение антибиотиками в стационарных условиях. Соединения согласно настоящему изобретению просто синтезировать, они устойчивы к распаду в желудочно-кишечном тракте и вряд ли будут всасываться в кровяной поток, таким образом, избегая возможных побочных эффектов. Соединения согласно настоящему изобретению не нуждаются в проникновении в мембранны млекопитающих или бактерий для того, чтобы быть активными, что делает их более эффективными *in vivo*. Кроме того, маловероятно, что соединения согласно настоящему изобретению оказывают селективное давление на бактерии и, следовательно, избегают проблем, связанных с устойчивостью.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения в способе для профилактики или лечения инфекции *C. difficile*, содержащая соединение в соответствии с любым из вышеописанных аспектов настоящего изобретения.

Предпочтительные фармацевтические композиции содержат от примерно 1 до примерно 95% ак-

тивного ингредиента, предпочтительно от примерно 20 до примерно 90% активного ингредиента.

Фармацевтическая композиция по указанным выше аспектам настоящего изобретения может быть введена отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами. Комбинированная терапия может принимать форму комбинированных препаратов из соединения настоящего изобретения и одного или нескольких других антибиотиков. Введение может быть поочередным; альтернативно, лекарственные средства могут быть даны независимо друг от друга или в виде комбинированного препарата.

Согласно предпочтительному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит соединение по настоящему изобретению согласно любому из вышеупомянутых аспектов настоящего изобретения и дополнительно метронидазол, ванкомицин и/или фидаксомицин.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена лекарственная форма, включающая в себя соединение согласно любому из вышеупомянутых аспектов настоящего изобретения. Предпочтителен пероральный состав, в частности, таблетка, сироп, раствор, капсула или порошок.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления такая лекарственная форма дополнительно содержит обладающие антибиотической активностью соединение, такое как (в качестве неограничивающего примера) метронидазол, ванкомицин или фидаксомицин.

Согласно еще с одним аспектом настоящего изобретения предложена схема лечения для профилактики и лечения CDI, включающая введение соединения согласно настоящему изобретению. Введение может быть осуществлено любым из описанных в данном документе способов.

Также, в объем настоящего изобретения подпадает способ профилактики или лечения CDI, включающий введение соединения согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Аналогично, предложено соединение согласно настоящему изобретению для получения лекарственного препарата для профилактики и лечения CDI. Лекарственные препараты согласно настоящему изобретению получают методами, известными в данной области, в частности с помощью традиционных способов смешивания, покрытия, гранулирования, растворения или лиофилизации.

Везде, где существуют альтернативы для отдельных элементов, таких как R<sup>1</sup>, X, Y и т.д. изложенных в настоящем документе в качестве "вариантов осуществления", следует понимать, что такие альтернативы могут быть легко скомбинированы для формирования отдельных вариантов осуществления всей представленной молекулы как таковой или для применения в способе или согласно медицинским показаниям, указанным в данном документе.

#### **Краткое описание фигур**

На фиг. 1 показана концентрационная зависимость расщепления домена цистeinовой протеазы TcdB в присутствии соединения-активатора (7) (незаштрихованные круги) или IP6 in vitro (1A), и соответствующие кинетики (1B) в 10 mM Ca<sup>+</sup>.

На фиг. 2 показана концентрационная зависимость расщепления домена цистeinовой протеазы TcdB в присутствии соединения-активатора (7) (незаштрихованные круги), его PEG2000-аналога (незаштрихованные треугольники), и его метильного аналога (черные квадраты).

На фиг. 3 показан синтез соединения 7.

На фиг. 4 показана концентрационная зависимость расщепления домена цистeinовой протеазы TcdB в присутствии 10 mM Ca<sup>2+</sup> для IS6 (незаштрихованные круги) и IP6 (черные квадраты).

На фиг. 5 показан синтез соединения (16a-b).

На фиг. 6 показана концентрационная зависимость расщепления домена цистeinовой протеазы TcdB в присутствии 10 mM Ca<sup>2+</sup> для соединения-активатора (16a-b).

#### **Примеры**

1. Синтез соединения (7).

Синтез протекал согласно последовательности, изображенной на фиг. 3.

Соединение B. К суспензии гидрида натрия (4,3 ммоль, 103,7 мг) в 10 мл диметилформамида (DMF) по каплям добавляли раствор соединения A [Martin, S. F. et al., J. Org. Chem. 1994, 59, 4805] (2,16 ммоль, 1363 мг) в DMF (10 мл). По завершении добавления смесь перемешивали 30 мин при комнатной температуре с последующим добавлением MeO-PEG-OTs (при этом OTs представляет собой толуолсульфонат) (3,2 ммоль, 1,64 г в 10 мл DMF). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи, затем ее гасили водой (5 мл). Смесь экстрагировали дихлорметаном (DCM). Растворитель выпаривали и остаток хроматографировали на силикагеле шестью порциями по 100 мл этилацетатексана в соотношениях 20:80; 30:70; 40:60; 60:40; 80:20; 100:0. В результате хроматография происходило разделение на фракции продукта с различными размерами PEG, включая соединение B со средним значением в 9 PEG-звеньев.  
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц; CDCl<sub>3</sub>): δ 7,29-7,13 (m, 25H), 4,83 (d, J=10,8 Гц, 2H), 4,79 (s, 2H), 4,74 (d, J=10,8 Гц, 2H), 4,63 (d, J=11,7 Гц, 2H), 4,59 (d, J=11,6 Гц, 2H), 3,97-3,88 (m, 5H), 3,64-3,42 (m, 31H), 3,38 (t, J=9,2 Гц, 1H), 3,29-3,25 (m, 5H).

Соединение C. Соединение B растворяли в смеси тетрагидрофурана (THF, 4 мл), метанола (7 мл) и воды (3 мл) с последующим добавлением избытка 10%-го палладия на древесном угле. Смесь помещали в водородную атмосферу и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем реакционную смесь продували азотом, фильтровали и выпаривали растворитель. Сырую смесь очищали на кар-

тридже для обращено-фазовой хроматографии (Sep-Pak, Waters, 1 г, C18, кат. № WAT 036905) путем элюирования 10 мл воды. Все фракции (1,5 мл) лиофилизировали и анализировали с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц; D<sub>2</sub>O):  $\delta$  3,96-3,94 (m, 2H), 3,89 (t, J=2,8 Гц, 1H), 3,78-3,69 (m, 28H), 3,69-3,60 (m, 5H), 3,56 (dd, J=10,0, 2,8 Гц, 2H), 3,40 (s, 3H), 3,25 (t, J=9,2 Гц, 1H).

Соединение D. Соединение C (0,2 ммоль, 119 мг) суспендировали в тетразоле (3,630 ммоль, 8,1 мл, 0,45 М в CH<sub>3</sub>CN) и DCM (10 мл), затем добавляли N,N-диэтил-1,5-дигидро-2,4,3-бензодиоксаfosфепин-3-амин (1,8 ммоль, 434 мг) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем смесь охлаждали до -10°C и добавляли раствор мета-хлорпероксибензойной кислоты (mCPBA, предварительной просушкой над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,8 ммоль, 1189 мг) в DCM (2 мл). Смесь оставляли перемешивать при -10°C в течение дополнительных 10 мин, а затем доводили до комнатной температуры и перемешивали в течение 1-го ч. Смесь промывали разбавленным сульфитом натрия и экстрагировали с помощью DCM. Органические слои сушили с помощью Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток хроматографировали на силикагеле с градиентом 1-5% метанола в DCM.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,41-7,27 (m, 18H), 7,21 (dd, J=6,9, 1,7 Гц, 2H), 5,59-5,51 (m, 6H), 5,44 (t, J=14,2 Гц, 2H), 5,37-5,29 (m, 6H), 5,25-4,95 (m, 10H), 4,74 (ddd, J=9,9, 7,6, 2,1 Гц, 2H), 4,61 (t, J=2,2 Гц, 1H), 4,03 (t, J=4,9 Гц, 2H), 3,68-3,50 (m, 22H), 3,48 (dd, J=6,1, 4,0 Гц, 2H), 3,40-3,34 (m, 7H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  135,78, 135,72, 135,4, 135,14, 134,99, 129,38, 129,27, 129,26, 129,22, 129,14, 129,11, 128,96, 128,95, 77,6, 76,05, 76,01, 73,8, 71,9, 70,67, 70,60, 70,57, 70,54, 70,53, 70,49, 70,38, 70,34, 70,29, 69,46, 69,39, 69,33, 69,24, 69,16, 69,01, 68,95, 59,0.

Соединение (7). Соединение D растворяли в смеси THF (1 мл), метанола (1,5 мл) и воды (2 мл), с последующим добавлением избытка 10%-го палладия на древесном угле. Смесь помещали под водородную атмосферу и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем смесь продували азотом, фильтровали и концентрировали. Соединение доводили до pH 7 добавлением разбавленного водного NaOH (170 мкл, 0,1 М). Остаток очищали на колонке с сефадексом (PD-10, GE Healthcare, Sephadex G-25 M, кат. № 17-0851-01) путем элюирования 10 мл воды. Все фракции (1,5 мл) лиофилизировали и анализировали с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР. Фракции, содержащие продукт, дополнительно очищали на картридже для обратно-фазовой хроматографии (Sep-Pak, Waters, 1 г, C18, кат. № WAT 036905) путем элюирования 10 мл воды. Все фракции (1,5 мл) лиофилизировали и анализировали с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР-анализа.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц; D<sub>2</sub>O):  $\delta$  4,44 (q, J=9,4 Гц, 2H), 4,20 (s, 1H), 4,16-4,10 (m, 3H), 4,06 (t, J=4,7 Гц, 2H), 3,83-3,63 (m, 26H), 3,40 (s, 3H).  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц; D<sub>2</sub>O):  $\delta$  1,5, 1,2, 0,8.

### 2. Определение EC<sub>50</sub> в присутствии 10 мМ Ca<sup>2+</sup>.

Подлежащее тестированию соединение добавляли к рекомбинантному His-меченному домену цистеиновой протеазы токсина B C. difficile с SEQ ID 1 в присутствии 10 мМ Ca<sup>2+</sup> в 100 мМ Tris, pH 7,4 и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Расщепленные фрагменты белка разделяли с помощью SDS-PAGE и визуализировали с помощью окрашивания Кумасси. Степень расщепления количественно оценивали по интенсивностям бэндов белка с помощью программного обеспечения ImageJ. Сигналы нормализовали по результатам расщепления положительных и отрицательных контролей.

Результаты этого анализа для IP6 и соединения (7) показаны на фиг. 1А. Исходя из результатов, видно, что 50% расщепления фрагмента токсина достигали при схожих концентрациях IP6 и (7). Активность IP6 почти полностью исчезала при 100 мКМ, тогда как (7) сохраняло остаточную активность. PEG-цепь (7) вероятно обеспечивала молекуле более широкий интервал растворимости.

### 3. Сравнение кинетик расщепления.

Подлежащее тестированию соединение добавляли к His-меченному домену цистеиновой протеазы токсина B C. difficile (с той же последовательностью, которая приведена выше) в присутствии 10 мМ Ca<sup>2+</sup> в 100 мМ Tris pH 7,4 и инкубировали 24 ч при 37°C, при этом забирали аликовты через равные промежутки времени. Расщепленные фрагменты белка разделяли, визуализировали и анализировали как указано выше. Результаты этого анализа для IP6 и соединения (7) показаны на фиг. 1В. Исходя из результатов, видно, что степень расщепления через 4 ч была в 5 раз выше, чем с IP6.

### 4. Синтез соединения (16a-b).

Соединение F. Раствор 2,4,6-три-O-(4-метоксибензил)-мио-инозитола (E) [D. Lampe, C. Liu, B. V. L. Potter, J. Med Chem. 1994, 37, 907] (0,541 г, 1 ммоль, 1 экв.) в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл, 0,05 м) в атмосфере азота обрабатывали тетразолом в ацетонитриле 0,45 м (20,0 мл, 9,0 ммоль, 9 экв.) и о-ксилилен-N,N-диэтилфосфорамидом (6 ммоль, 1,44 г, 6 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 дня. Раствор mCPBA (12 ммоль, 2,07 г, 12 экв.), высущенный над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, добавляли при -10°C и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение дополнительных 45 мин. Затем смесь разбавляли в EtOAc, промывали насыщенным раствором водного NaHCO<sub>3</sub> и солевым раствором. Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали in vacuo. Очистка флем-хроматографией (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH постепенно от 0 до 4%, трижды) давала 2,4,6-три-O-(4-метоксибензил)-1,3,5-три-O-(о-ксилиленфосфо)мио-инозитол (F) в виде белого твердого вещества (98%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7,28-7,36 (12H, m), 7,19-7,22 (2H, m), 7,12-7,17 (4H, m), 6,86 (2H, d, J=8,5 Гц), 6,71 (4H, d, J=8,5 Гц), 5,25 (1H, d, J=13,6 Гц), 5,21 (1H, d, J=13,6 Гц), 5,15 (1H, d, J=13,7 Гц),

5,11 (1H, d,  $J=13,7$  Гц), 4,91-5,08 (8H, m), 4,83-4,89 (4H, m), 4,69-4,61 (3H, m), 4,57 (1H, q,  $J=9,2$  Hz), 4,38 (2H, ddd,  $J=2,4, 8,1, 9,5$  Гц), 4,10 (2H, t,  $J=9,5$  Гц), 3,78 (3H, s), 3,72 (6H, s);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 159,3, 159,1, 135,4, 135,3, 135,2, 130,8, 130,3, 129,7, 129,6, 129,2, 129,13, 129,12, 129,0, 128,9, 128,6, 113,74, 113,57, 80,6 (d,  $J_{\text{cp}} 6,0$  Гц), 78,1 (dd,  $J_{\text{cp}} 6,9, 3,2$  Гц), 77,6, 77,1 (m), 76,0, 74,9, 68,8, 68,70, 68,68, 68,62, 68,34, 68,28, 55,4, 55,3;  $^{31}\text{P}$  ЯМР (160 МГц,  $^1\text{H}$ -не связано,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 1,10,-1,32.

Соединение G. Соединение F (97 мг, 0,089 ммоль) растворяли в 1 мл дихлорметана. Добавляли 6 мл смеси 5:1 трифторуксусной кислоты и воды. Перемешивали 25 мин и затем разбавляли 10 мл толуола и концентрировали под вакуумом. Полученный остаток растирали с гексаном и дихлорметаном и затем сушили под сильным вакуумом. Получали 68 мг неочищенного соединения G, которое непосредственно использовали на следующем этапе.

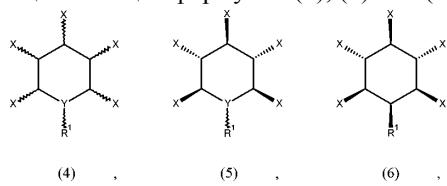
Соединение H. Соединение G (39 мг, 0,054 ммоль) растворяли в 3 мл DMF и добавляли  $\text{SO}_3\cdot\text{Et}_3\text{N}$  (195 мг, 1,07 ммоль). Раствор перемешивали в течение ночи при 50°C и концентрировали на роторном испарителе. Остаток растворяли в 6 мл воды, фильтровали и загружали на три картриджа Vac 6cc, 1 г tC18 Sep-Pak (Waters). Колонки элюировали градиентом 0-40% MeOH/H<sub>2</sub>O. Получали 32 мг H.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц; MeOD):  $\delta$  7,45-7,40 (m, 4H), 7,39-7,33 (m, 4H), 7,28-7,24 (m, 2H), 7,21-7,19 (m, 2H), 5,69-5,60 (m, 4H), 5,47 (dd,  $J=13,2, 10,4$  Гц, 2H), 5,41 (t,  $J=2,9$  Гц, 2H), 5,40-5,35 (m, 2H), 5,20-5,16 (m, 1H), 5,11-4,97 (m, 5H), 4,90-4,81 (m, 2H), 3,24 (q,  $J=7,3$  Гц, 17H), 1,32 (t,  $J=7,3$  Гц, 25H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц; MeOD/ $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  131,6, 131,2, 125,26, 125,21, 125,09, 124,93, 124,87, 124,78, 70,25, 70,22, 70,19, 69,95, 69,90, 65,18, 65,11, 65,07, 65,00, 64,85, 64,78, 42,4, 4,2;  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц; MeOD/ $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -7,8, -8,9.

Соединение PSPSPS ((16a)b): соединение H (32 мг) растворяли в 3 мл H<sub>2</sub>O. Добавляли небольшую порцию Pd на активированном угле (10%), смесь помещали под H<sub>2</sub>-атмосферу и перемешивали 4 ч. Затем смесь продували с помощью N<sub>2</sub> и добавляли каплю NH<sub>4</sub>OH. Смесь фильтровали через целит и испаряли на роторном испарителе. Остаток растворяли в 1 мл воды, загружали на картридж Vac 6cc 1 г tC18 Sep-Pak (Waters) и элюировали водой. Элюированные фракции лиофилизировали и анализировали с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР. Получали 16 мг PSPSPS-2Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>xNH<sub>4</sub><sup>+</sup>.  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц; D<sub>2</sub>O):  $\delta$  4,93-4,78 (m, 3H), 4,55-4,39 (m, 3H), 3,13 (q,  $J=7,3$  Гц, 14H), 1,21 (t,  $J=7,3$  Гц, 21H).  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц; D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -0,3, -0,7.

Расщепление, индуцированное соединением PSPSPS ((16a-b), определяли в присутствии кальция как описано в примере 2, и результаты показаны на фиг. 7. Расщепление, индуцированное этим производным, составляло 50% при концентрации 20 мкМ, что намного эффективнее, чем для IP6 (601 мкМ). Из этого результата видно, что присутствие нескольких сульфатных групп усиливало активность соединения в присутствии кальция.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, характеризующееся общей формулой (4), (5) или (6)

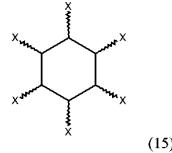


где  $R^1$  выбран из группы, включающей полиэтиленгликоль, полиглицерин,

каждый X независимо выбран из  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $\text{OPSO}_2^{2-}$  или  $\text{OSO}_3^-$  и Y является CH или N.

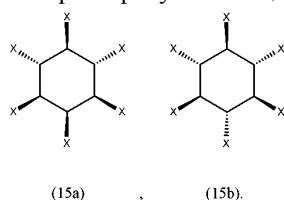
2. Мио-инозитолпентакисфосфат-2-PEG(400) (7).

3. Соединение, описываемое общей формулой (15)

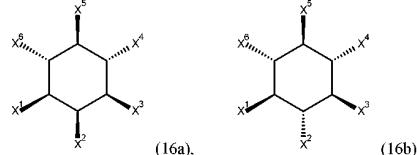


где каждый X независимо выбран из  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $\text{OPSO}_2^{2-}$  или  $\text{OSO}_3^-$ , при условии, что не все X являются  $\text{OPO}_3^{2-}$  и не все X являются  $\text{OSO}_3^-$ .

4. Соединение по п.3, где соединение характеризуется общей формулой (15a) или (15b)



5. Соединение по любому из предыдущих пп.3 или 4, характеризующееся формулой (16а) или (16б)

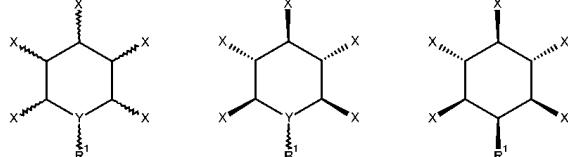


где

- a)  $X^2$  является  $\text{OSO}_3^-$ , а каждый из  $X^1, X^3, X^4, X^5$  и  $X^6$  независимо выбран из  $\text{OPO}_3^{2-}, \text{OPSO}_2^{2-}$  или  $\text{OSO}_3^-$ ,

  - b)  $X^1, X^3$  и  $X^5$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ , а  $X^2, X^4$  и  $X^6$  являются  $\text{OSO}_3^-$ ,
  - c)  $X^1, X^3$  и  $X^5$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , а  $X^2, X^4$  и  $X^6$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,
  - d)  $X^4, X^5$  и  $X^6$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , а  $X^1, X^2$  и  $X^3$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,
  - e)  $X^4, X^5$  и  $X^6$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ , а  $X^1, X^2$  и  $X^3$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , или
  - f)  $X^2$  и  $X^5$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ , а  $X^1, X^3, X^4$  и  $X^6$  являются  $\text{OSO}_3^-$ ,
  - g)  $X^2$  и  $X^5$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , а  $X^1, X^3, X^4$  и  $X^6$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,
  - h)  $X^2$  и  $X^3$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ , а  $X^1, X^4, X^5$  и  $X^6$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , или
  - i)  $X^2$  и  $X^3$  являются  $\text{OSO}_3^-$ , а  $X^1, X^4, X^5$  и  $X^6$  являются  $\text{OPO}_3^{2-}$ .

## 6. Применение соединения, описываемого общей формулой (4), (5) или (6)



где

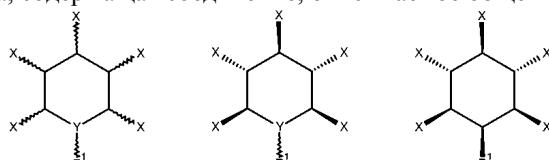
$R^1$  выбран из группы, включающей

ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ.

полиглицерин,

каждый X независимо выбран из  $\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $\text{OPSO}_2^{2-}$  или  $\text{OSO}_3^-$  и Y является CH или N; или соединения по любому из предыдущих пп.3-5 в качестве лекарственного препарата для профилактики или терапии инфекции *C. difficile*

7 Декарственная форма содержащая соединение, описываемое общей формулой (4), (5) или (6)



где  $B^1$  выбран из группы, включающей

где К выбран из группы

### **ПОЛИЭТИЛЕН ПОЛИГЛИДЕРИН**

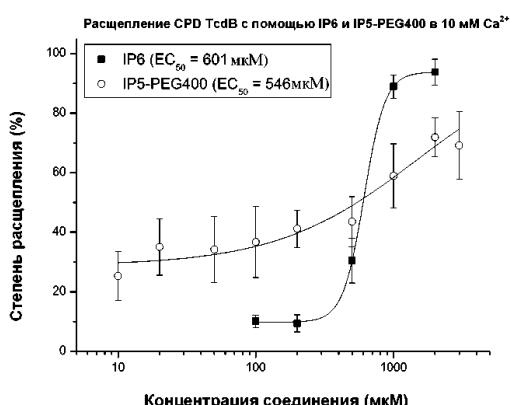
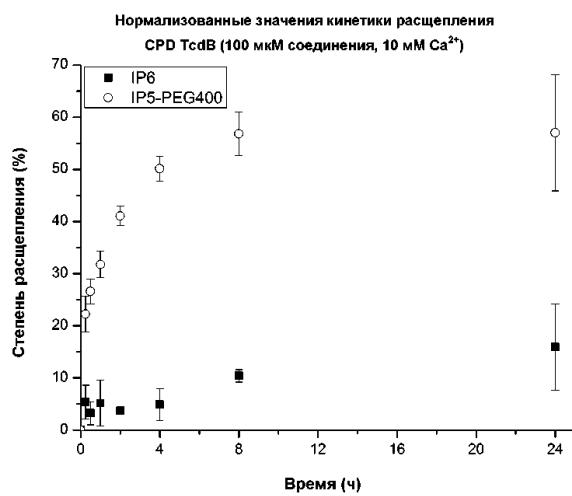
каждый X независимо выбран из  $\text{OPO}_4^{2-}$ ,  $\text{OPSO}_4^{2-}$  или  $\text{OSO}_4^{2-}$  и Y является СН или N

каждый  $X$  независимо выбран из  $\text{OF}_3^-$ ,  $\text{OF}_2\text{O}_2^-$  или  $\text{O}_2\text{O}_3^-$  и  $\text{I}$  или содержащая соединение по любому из предыдущих пп 3-5.

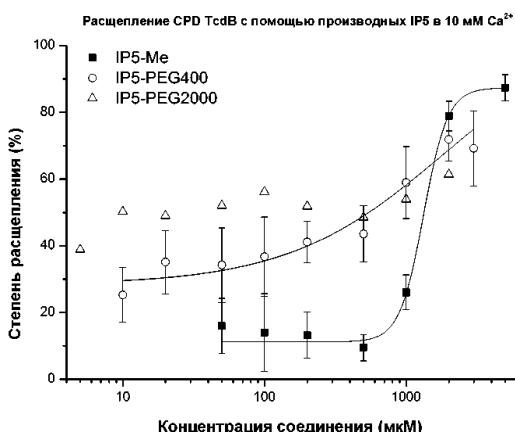
или содержащая соединение по любому из предыдущих пп.3-5.

9. Лекарственная форма по п.8, отличающаяся тем, что антибиотиком является метронидазол, ванкомицин или фидаксомицин.

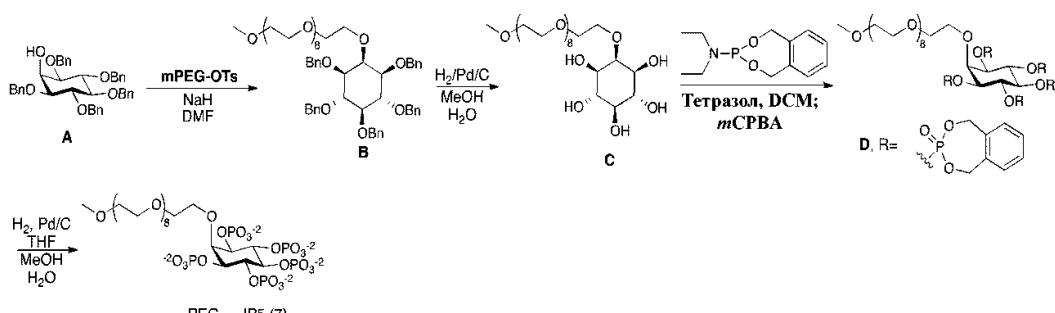
10. Лекарственная форма по любому из пп.7-9 в виде таблетки, капсулы, раствора, порошка или сиропа.

**A****B**

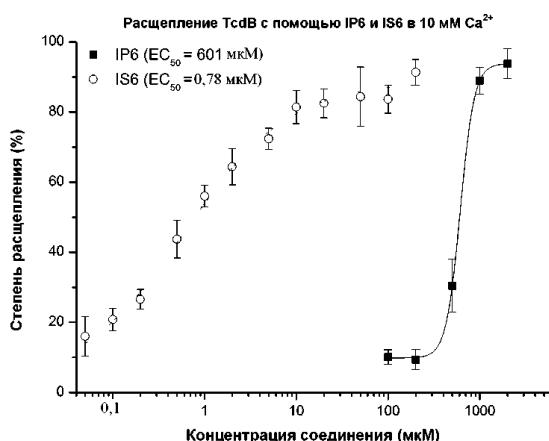
Фиг. 1



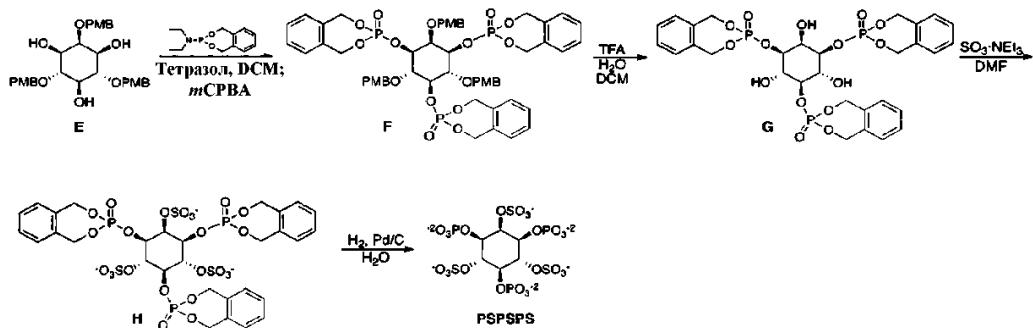
Фиг. 2



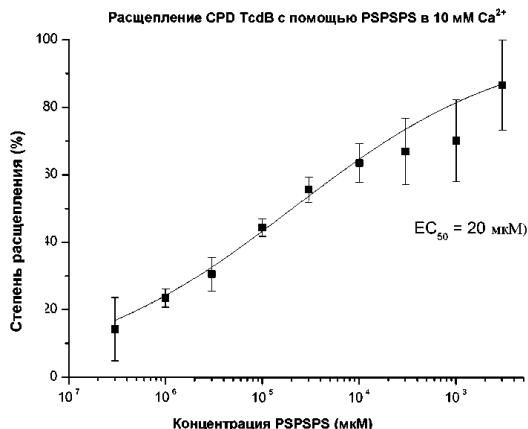
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПО  
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2