



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013029485-0 B1



(22) Data do Depósito: 16/05/2012

(45) Data de Concessão: 24/11/2020

(54) Título: REGULAÇÃO DE LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME

(51) Int.Cl.: C07D 501/24; C07D 501/20; C07D 503/14; A61P 31/04; A61K 31/545; (...).

(30) Prioridade Unionista: 16/05/2011 AU 2011901872.

(73) Titular(es): NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED; UNIVERSITY OF WOLLONGONG.

(72) Inventor(es): NICOLAS BARRAUD; BHARAT GANGADHAR KARDAK; MICHAEL JOHN KELSO; STAFFAN KJELLEBERG; SCOTT RICE.

(86) Pedido PCT: PCT AU2012000542 de 16/05/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/155203 de 22/11/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 14/11/2013

(57) Resumo: REGULAÇÃO DE LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME. A presente invenção refere-se em geral a métodos e compostos para regular a liberação de óxido nítrico na proximidade de micro-organismos formadores de biofilme para regular a morte celular programada nos micro-organismos e, assim, promover a dispersão de micro-organismo de biofilmes e/ou inibir a formação ou desenvolvimento de biofilme. Mais particularmente, a invenção refere-se ao uso de com postos para fornecer controle espacial e temporal sobre a liberação de óxido nítrico.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
“REGULAÇÃO DE LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME”.

Campo da Invenção

[01] A presente invenção refere-se em geral a métodos e compostos para regular a liberação de óxido nítrico na proximidade de micro-organismos formadores de biofilme para regular a morte celular programada nos micro-organismos e assim promover a dispersão de micro-organismo de biofilmes e/ou inibir a formação ou desenvolvimento de biofilme. Mais particularmente, a invenção refere-se ao uso de compostos para fornecer controle espacial e temporal sobre a liberação de óxido nítrico.

Antecedentes da Invenção

[02] Os biofilmes são formas de proliferação microbiana tridimensional que compreendem comunidades microbianas e a matriz extracelular que produzem. Os biofilmes são ubíquos em natureza, formando-se em qualquer superfície ou em qualquer interface em que água ou um fluido adequado esteja disponível ou em suspensão, por exemplo, como flocos ou grânulos.

[03] Os biofilmes são agentes etiológicos de inúmeras doenças e estão associados a uma variedade de infecções crônicas em humanos, formando-se em uma variedade de superfícies dentro do corpo, por exemplo, em superfícies no

trato respiratório e pulmões (associado à fibrose cística e doença de legionário), em superfícies do ouvido (associado à otite média) e em superfícies do coração e válvulas do coração (associado à endocardite bacteriana). Os biofilmes oferecem proteção aumentada aos micro-organismos habitantes, por exemplo, na forma de resistência substancialmente aumentada aos antibióticos em comparação a células planctônicas e resistência à fagocitose, o que torna os biofilmes muito difíceis de erradicar e explica a severidade e alto nível de persistência de biofilmes e a morbidade associada às infecções produzidas por biofilmes. No caso de fibrose cística, por exemplo, uma causa principal de infecções respiratórias são os biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *P. aeruginosa* na superfície dos pulmões em pessoas que sofrem de fibrose cística que conferem um grau maior de resistência aos antibióticos e resistência às defesas imunológicas do hospedeiro. Conseqüentemente, a causa principal de infecções pulmonares crônicas e, por sua vez, de morbidade e mortalidade, em pessoas que sofrem de fibrose cística é *P. aeruginosa* associada a biofilme.

[04] Os biofilmes também se formam facilmente em equipamento médico, tal como cateteres e cânulas e em dispositivos médicos implantáveis, incluindo stents e lentes de contato. De fato, muitos pacientes de cateterismo

a longo prazo adquirem infecções causadas por bactérias formadoras de biofilme e, de modo mais geral, os biofilmes são respostáveis por uma gama de infecções adquiridas em hospital, adicionando um custo consideráveis aos sistemas de saúde.

[05] A partir de uma perspectiva de saúde pública, os biofilmes são reservatórios importantes de patógenos em sistemas de água, tal como água potável, reservatórios, tubos e dutos de condicionamento de ar. Os biofilmes também causam um dano industrial significativo, causando, por exemplo, incrustação e corrosão em processos de fluido, tal como sistemas de distribuição e tratamento de água, sistemas de fabricação de papel e polpa, sistemas de troca de calor e torres de resfriamento e contribuindo para a acidificação de óleo em tubulações e reservatórios.

[06] Os biofilmes são essencialmente comunidades microbianas multicelulares, a formação e desenvolvimento dos quais são dependentes de vários traços multicelulares dos organismos membro, tal como sinalização de célula a célula. Os sistemas de sinalização extracelular, tal como percepção de quórum, são usados pela bactéria para avaliar a densidade celular e iniciar alterações na expressão celular e fenótipos quando concentrações suficientes de moléculas sinalizadoras são encontradas. Isso está associado à expressão genética diferencial, levando à

indução de, por exemplo, fatores de virulência e/ou mecanismos de defesa e com a diferenciação celular de modo que as células associadas ao biofilme tornem-se altamente diferenciadas das células planctônicas.

[07] Conforme as células dentro dos biofilmes diferenciam-se e os biofilmes amadurecem, taxas metabólicas reduzidas, a expressão celular de mecanismos de defesa e a capacidade reduzida de agentes antimicrobianos de penetrar o biofilme resultam em resistência antimicrobiana aumentada e tornam os biofilmes particularmente difíceis de erradicar. As estratégias de controle de biofilme atuais tipicamente alvejam os estágios precoces de desenvolvimento de biofilme e envolvem o uso de agentes antimicrobianos tóxicos. No entanto, tais agentes tóxicos podem apresentar seus próprios problemas a jusante, por exemplo, quando usados industrialmente devido a sua liberação no ambiente. As estratégias melhoras para controle de biofilme são claramente exigidas.

[08] Os estudos de *P. aeruginosa*, assim como outras bactérias formadoras de biofilme de modelo, biofilmes orais de espécies misturadas e biofilmes granulares de espécies misturadas em processos de tratamento de água residual mostraram que a morte celular programada induz o desprendimento e dispersão de células dos biofilmes (consulte, por exemplo, Hope et al., 2002 e Webb et al,

2003) e é um recurso geral do desenvolvimento de biofilme. Os inventores da presente invenção revelaram previamente que a morte celular programada em biofilmes está ligada à acumulação de espécies de nitrogênio e oxigênio reativos (RONS) dentro de organismos formadores de biofilme e que a morte celular programada e dispersão de células de um biofilme em células planctônicas pode ser induzida com o uso de concentrações baixas e não tóxicas de geradores ou doadores de óxido nítrico (consulte a WO 2006/125262 copendente, a revelação da qual é incorporada ao presente a título de referência em sua totalidade).

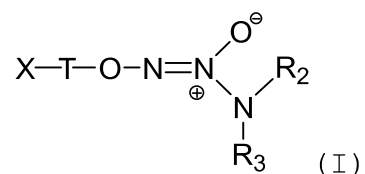
[09] A exploração dessa revelação oferece a possibilidade de tecnologias inovadoras para a remoção de biofilmes em uma faixa ampla de ambientes e ambientações, incluindo processamento médico, industrial e bioprocessamento por exposição dos biofilmes a óxido nítrico para induzir a dispersão de células. No entanto, em algumas ambientações, particularmente em aplicações médicas e saúde humana, a liberação descontrolada e difusa de óxido nítrico pode estar associada a efeitos colaterais e níveis de toxicidade inaceitáveis. Melhorar a estabilidade de doadores de óxido nítrico em solução também impõe um desafio. Dessa forma, há uma necessidade pelo desenvolvimento de mecanismos eficazes para regular, espacial e/ou temporalmente, a liberação de óxido nítrico

de modo que essa liberação possa estar localizada na proximidade de um biofilme para assim minimizar efeitos colaterais e toxicidade em outras localizações.

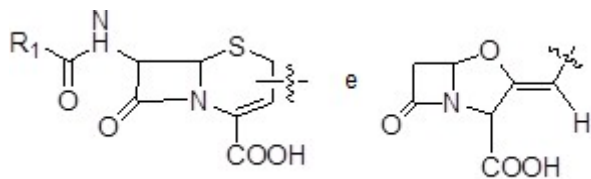
[010] Agora são fornecidos no presente documento compostos, métodos e composições para regular a liberação de óxido nítrico de modo temporal e espacial e, por sua vez, fornecendo mecanismos inovadores para promover a dispersão de células de biofilmes e regular o desenvolvimento de biofilme.

Sumário da Invenção

[011] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um composto de fórmula (I) ou um sal do mesmo:

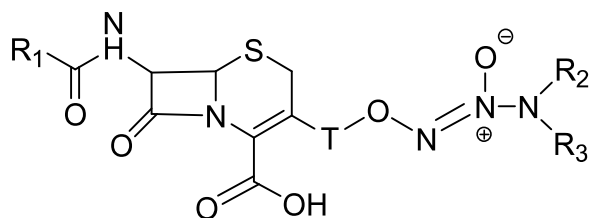


em que T é uma ligação ou um ligante, R₂ e R₃ são resíduos orgânicos e X é selecionado do grupo que consiste em:



em que R₁ é um resíduo orgânico.

[012] Em uma modalidade, o composto de fórmula (I) tem a seguinte estrutura:



em que R_1 , R_2 , R_3 e T são conforme definidos acima.

[013] T pode ser um ligante que é um hidrocarboneto bivalente que tem entre 1 e 6 átomos de carbono, por exemplo, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ ou $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. Em uma modalidade T é CH_2 .

[014] R_1 pode ser um substituinte que corresponde a um substituinte ligado ao grupo 7-NHC(O)- de um antibiótico de cefalosporina.

[015] Em uma modalidade, R_1 é Y-arila ou Y-heteroarila e Y é um hidrocarboneto bivalente que tem entre 1 e 4 átomos de carbono. O grupo arila pode ser selecionado dentre: fenila, bifenila, naftila, antracênila e fenantrenila e o grupo heteroarila pode ser um anel com 5 ou 6 membros em que entre 1 e 4 átomos de carbono são substituídos por átomos de nitrogênio e/ou enxofre.

[016] O grupo heteroarila pode ser selecionado dentre: tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila e pirrolila.

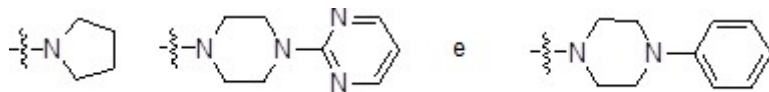
[017] Em uma modalidade, R_1 é selecionado do grupo que consiste em: $-\text{CH}_2$ -fenila, $-\text{CH}_2$ -tienila e $-\text{CH}_2$ -tetrazolila.

[018] R_2 e R_3 podem ser independentemente selecionados

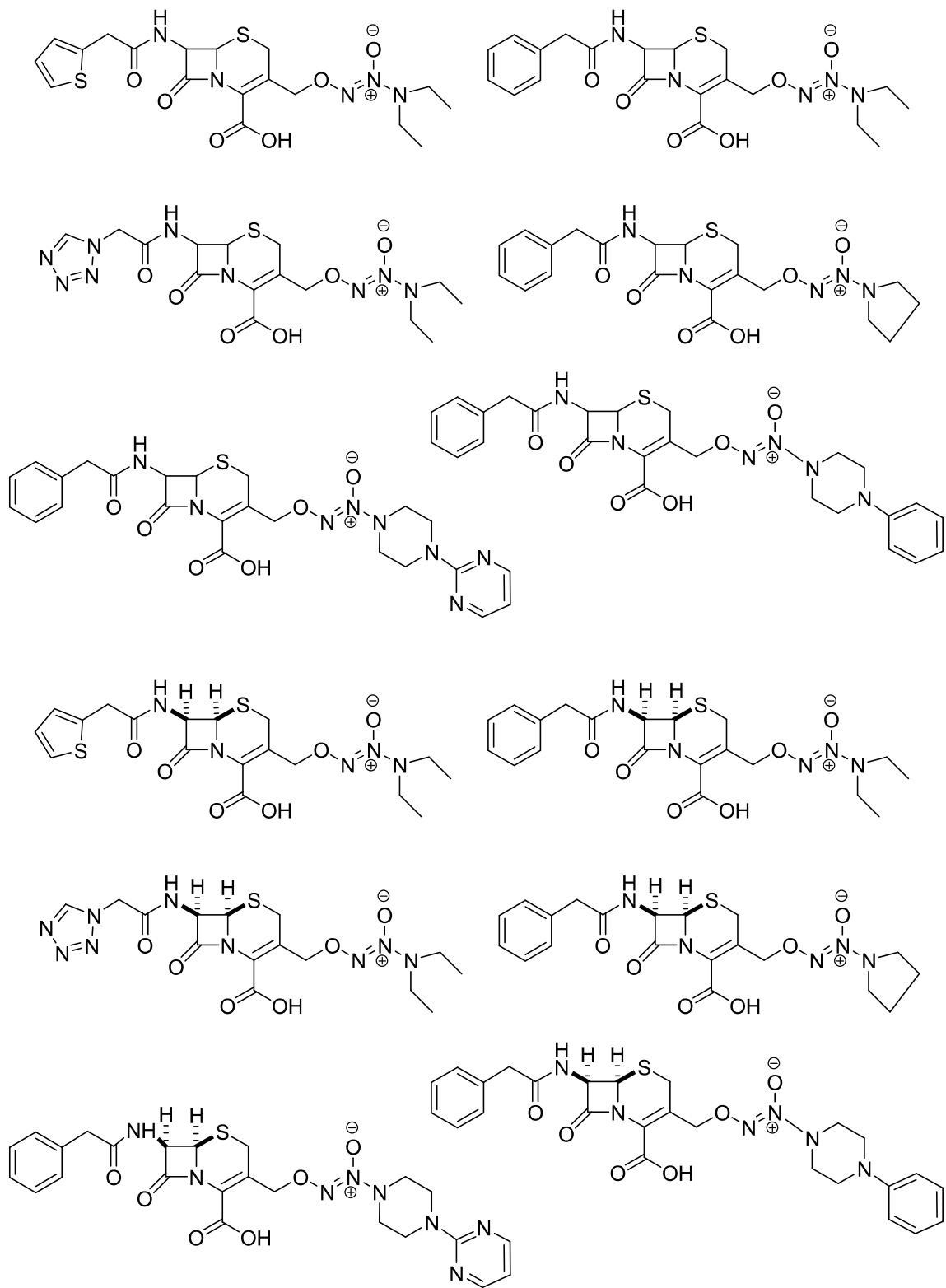
do grupo que consiste em: alquila C₁-C₁₀ ou alternativamente R₂ e R₃ juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados podem formar um anel com 5 ou 6 membros que pode opcionalmente conter entre 1 e 3 átomos de nitrogênio adicionais e que podem ser opcionalmente substituídos por um grupo arila ou heteroarila.

[019] Em uma modalidade alternativa, R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₆ ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5 ou 6 membros saturado que pode opcionalmente conter 1 átomo de nitrogênio adicional e que podem ser opcionalmente substituídos por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila e fenila.

[020] Em outra modalidade, R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₆ ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam uma estrutura selecionada do grupo que consiste em:



[021] Em uma modalidade, o composto de fórmula (I) tem uma estrutura selecionada do grupo que consiste em:



[022] Os compostos de fórmula (I) podem compreender ainda um composto antibiótico que é ligado por meio do

substituente R_2 e/ou R_3 . O antibiótico pode ser, por exemplo, ciprofloxacina ou N-desmetil levofloxacina.

[023]Em um segundo aspecto, a invenção fornece uma composição para promover a dispersão de micro-organismos de um biofilme ou inibir a formação e/ou desenvolvimento de biofilmes, em que a composição compreende um composto de acordo com o primeiro aspecto.

[024]A composição compreende ainda um ou mais antibióticos ou agentes antimicrobianos adicionais. Em modalidades exemplificativas, o um ou mais antibióticos adicionais podem ser selecionados dentre ceftazidima, tobramicina e ciprofloxacina.

[025]Em um terceiro aspecto, a invenção fornece um método para promover a dispersão de micro-organismos de um biofilme, em que o método compreende expor o biofilme a uma quantidade eficaz de um composto do primeiro aspecto ou uma composição do segundo aspecto.

[026]Em um quarto aspecto, a invenção fornece um método para inibir a formação e/ou desenvolvimento de biofilme, em que o método compreende expor os micro-organismos formadores de biofilme a uma quantidade eficaz de um composto do primeiro aspecto ou uma composição do segundo aspecto.

[027]Em concordância com o quarto aspecto, o composto, ou composição que compreende o mesmo, pode ser revestido,

impregnado ou de outro modo colocado em contato com uma superfície ou interface suscetível à formação de biofilme. Em uma modalidade, a superfície pode ser uma superfície de um dispositivo médico implantável, prótese ou equipamento médico ou cirúrgico.

[028]Em concordância com os métodos do terceiro e quarto aspectos, os micro-organismos que contêm biofilme ou que formam biofilme tipicamente expressam uma β -lactamase ou uma transpeptidase. A β -lactamase pode ser codificada de modo cromossômico ou extracromossômico e a expressão pode ser constitutiva ou induzível. Em modalidades particulares, a β -lactamase é uma penicilinase. O biofilme ou micro-organismos formadores de biofilme pode ser exposto a um antibiótico de β -lactama antes ou concomitante à exposição ao composto ou composição. O antibiótico de β -lactama pode induzir a produção de β -lactamase extracelular nos ditos micro-organismos formadores de biofilme. O antibiótico de β -lactama pode ser fornecido em uma concentração subinibitória, bacteriostática ou bactericida. Em modalidades particulares, o antibiótico de β -lactama é imipenem.

[029]Em modalidades particulares do terceiro e quarto aspectos, o biofilme pode estar em uma superfície corporal de um indivíduo, interno ou externo ao indivíduo, e a exposição do biofilme ou micro-organismos formadores de

biofilme ao composto ou composição pode ser por meio de administração do composto ou composição ao indivíduo. A administração pode ser por meio de qualquer via adequada dependendo da natureza e localização do biofilme ou micro-organismos formadores de biofilme.

[030]Os métodos para promover a dispersão ou prevenir a formação de biofilmes podem compreender a indução de eventos de diferenciação em micro-organismos dentro de biofilmes que levam à dispersão ou podem compreender o impedimento da indução de eventos de diferenciação em micro-organismos que levam à formação de biofilme. Alternativa ou adicionalmente, os métodos podem compreender aumentar a sensibilidade de um micro-organismo aos agentes antimicrobianos.

[031]Em concordância com os aspectos e modalidades acima, o biofilme pode estar associado à superfície ou suspenso. O biofilme suspenso pode ser na forma de flocos ou grânulos.

[032]Tipicamente, em concordância com os aspectos e modalidades acima, o biofilme ou micro-organismos formadores de biofilme são expostos a uma quantidade eficaz de um composto ou composição conforme definido aqui de modo que a concentração do doador de óxido nítrico ou óxido nítrico liberado e assim exposto ao biofilme ou micro-organismos não seja tóxica ao ambiente ou ao indivíduo em

que o biofilme ou micro-organismos são encontrados. Por exemplo, a concentração de óxido nítrico pode estar na faixa de nanomolar, micromolar ou milimolar. A concentração de óxido nítrico pode ser, por exemplo, de cerca de 1 nM a cerca de 500 μ M.

[033]Os micro-organismos presentes no biofilme podem ser de uma única espécie ou de múltiplas espécies. Os micro-organismos dentro do biofilme ou que podem formar um biofilme podem compreender uma ou mais espécies selecionadas dentre, por exemplo, *Pseudomonas* spp., *Pseudoalieromonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Shigella* spp., *Mycobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Legionella* spp., *Haemophilus* spp., *Bacillus* spp., *Desulfovibrio* spp., *Shewanella* spp., *Geobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Aeromonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Micrococcus* spp., *Burkholderia* spp., *Serratia* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp. e *Vibrio* spp. Em modalidades particulares, o micro-organismo pode ser *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Burkholderia cenocepacia*, *Serratia marcescens*, *Fusobacterium nucleatum* ou *Vibrio cholerae*.

[034]Em modalidades particulares, o biofilme está sobre ou dentro do corpo de um indivíduo e pode estar

associado a uma doença ou distúrbio sofrido pelo indivíduo. A doença ou distúrbio pode ser, por exemplo, fibrose cística, endocardite bacteriana, otite média, doença de legionário, tuberculose ou pedra nos rins.

[035] Dessa forma, em um quinto aspecto é fornecido um método para tratar ou prevenir uma infecção, doença ou distúrbio associado a biofilme em um indivíduo em que a infecção é causada por um micro-organismo que pode formar um biofilme, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um composto do primeiro aspecto ou uma composição do segundo aspecto.

[036] A presente invenção também fornece o uso de um composto do primeiro aspecto para a fabricação de uma composição para uso da promoção de dispersão de micro-organismos de um biofilme ou para inibir a formação ou desenvolvimento de um biofilme.

[037] A presente invenção também fornece o uso de um composto do primeiro aspecto para a fabricação de um medicamento para tratar ou impedir uma infecção, doença ou distúrbio associado a biofilme em um indivíduo em que a infecção é causada por um micro-organismo que pode formar um biofilme.

Breve Descrição dos Desenhos

[038] As modalidades da invenção são descritas no presente documento, a título de exemplo não limitante

apenas, com referência aos seguintes desenhos.

[039] **Figura 1.** Caracterização amperométrica de liberação de óxido nítrico de ácidos livres de cefalosporin-3'-diazeniodiolato (Compostos **14** a **19**). As setas indicam a adição do seguinte a um conecptáculo de reação que contém 10 ml de tampão Tris a pH 7,0: **(a)** 10 μ l de cefalosporin-3'-diazeniodiolato a 100 mM, **(b)** 10 μ l de penicilinase a 1 U/ μ l, **(c)** 20 μ l de penicilinase a 1 U/ μ l, **(d)** 80 μ l de sequestrante de radical livre PTIO a 10 mM.

[040] **Figura 2.** Caracterização amperométrica de liberação de óxido nítrico do Composto **15**. (a) Liberação de óxido nítrico na presença de penicilinase em pH variável. As setas indicam a adição do seguinte a um conecptáculo de reação que contém 10 ml de tampão Tris a pH 9,0 (linha espessa), 7,0 (linha tracejada) ou 5,0 (linha pontilhada): (i) 10 μ l de Composto **15** a 150 mM, (ii) 5 μ l de penicilinase a 0,1 U/ μ l, (iii) 10 μ l de penicilinase a 0,1 U/ μ l, (iv) 80 μ l de sequestrante de radical livre PTIO a 10 mM. (b) Liberação de óxido nítrico na presença de extratos celulares de *P. aeruginosa* que expressa β -lactamase (linha espessa) ou *E. coli* que expressa não β -lactamase (linha pontilhada). As setas indicam a adição do seguinte a um conceptáculo de reação que contém 10 ml de tampão Tris a pH 7,0: (i) 10 μ l de Composto **15** a 150 mM, (ii) 100 μ l de extrato celular, (iii) 200 μ l de extrato celular, (iv)

PTIO. O óxido nítrico foi indetectável na presença de penicilinase (1 U/ml) ou uma cefalosporina cefalotina que libera óxido não nítrico representativa (150 μ M) ou sozinha ou de misturas de cefalotina/penicilinase (dados não mostrados). Os dados são representativos de pelo menos três experimentos independentes. (c) Liberação de óxido nítrico na presença de sobrenadantes de culturas de *P. aeruginosa* proliferadas por 5 horas na ausência de antibiótico então tratadas por 1 hora com imipenem indutor de β -lactamase extracelular a 0,5 μ g/ml (linha espessa) ou ampicilina a 100 μ g/ml (linha pontilhada). As setas indicam a adição do seguinte a um conceptáculo de reação que contém 10 ml de tampão Tris a pH 7,0: (i) 10 μ l de Composto **15** a 150 mM, (ii) 500 μ l de sobrenadante, (iii) 500 μ l de sobrenadante, (iv) PTIO. A adição de 500 μ l de ampicilina a 100 μ g/ml aos conceptáculos com sobrenadante de células tratadas com imipenem não inibiu a liberação de óxido nítrico de Composto **15**. (dados não mostrados).

[041] **Figura 3.** O Composto **21** induz uma resposta genética dependente de óxido nítrico em uma cepa repórter NSGFP de *P. aeruginosa*. As células NSGFP proliferadas com ou sem ampicilina subinibitória (50 μ g/ml) foram expostas ao nitroprussiato de sódio doador de óxido nítrico espontâneo (150 μ M), composto **21** (150 μ M), composto **21** (150 μ M) mais penicilinase (0,2 U/ml), uma cefalosporina

cefalotina que libera óxido não nítrico representativa (150 μ M) ou penicilinase (0,2 U/ml) ou deixado não tratado.

[042] **Figura 4.** O Composto **21** (denotado como "DEA-CP" na figura) induz a dispersão rápida em biofilmes de *P. aeruginosa*. A exposição de biofilmes preestabelecidos ao Composto **21** por 10 minutos induz uma diminuição concomitante na biomassa do in biofilme (barras cinza escuro) e aumento na biomassa planctônica (barras cinza claro). As barras de erro representam o erro padrão; n = 6.

[043] **Figura 5.** O Composto **21** (denotado como "DEA-CP" na figura) induz a dispersão rápida em biofilmes de *P. aeruginosa* de uma maneira dependente de dose (A). Os biofilmes de *P. aeruginosa* CF isolam as cepas proliferadas por 24 horas também dispersam após a exposição ao Composto **21** por 10 minutos (barras cinza claro) em comparação aos biofilmes que foram deixados sem tratamento (barras cinza escuro) (B). As barras de erro representam o erro padrão, n = 2.

[044] **Figura 6.** Dispersão dependente de dose de biofilmes de *P. aeruginosa* por compostos **21 (a)** e **23 (b)**. Os biofilmes de *P. aeruginosa* foram proliferados em placas de microtitulação com agitação a 37 °C e pré-tratados com imipenem (0,5 μ g/ml) por 1 hora antes da exposição a várias concentrações de compostos por 15 minutos. A massa de biofilme remanescente foi quantificada por manchamento de

violeta cristal.

[045] **Figura 7.** Mediante a reação com β -lactamase, o Composto **21** induz uma resposta de dispersão rápida em biofilmes de *P. aeruginosa*. (A) Os biofilmes foram quantificados por manchamento de violeta cristal. (B) Gravuras de biofilmes manchados com violeta cristal. (C) As células planctônicas foram quantificadas por medição de OD₆₀₀ do sobrenadante. As barras de erro indicam erros padrão (n = 2). Nesses experimentos, a dispersão de biofilme é suportada pelo aumento nas leituras de OD planctônico que correspondem às diminuições em manchamento de violeta cristal de biofilmes.

[046] **Figura 8.** O composto **21** induz a dispersão rápida (10 minutos após o tratamento) em biofilmes de várias bactérias Gram-negativas: (A) *Escherichia coli*, (B) *Vibrio cholerae*, (C) *Serratia marcescens*; e bactérias Gram-positivas: (D) *Staphylococcus aureus*.

[047] **Figura 9.** O composto **21** induz a dispersão de biofilmes de *P. aeruginosa* PA01 proliferados em microfermentadores de vidro sob condições de fluxo contínuo. Após proliferação por 24 horas, as medições de OD₆₀₀ do efluente de biofilme mostraram um aumento substancial nas células liberadas após a adição de composto **21**, enquanto a quantidade de células liberadas de biofilmes não tratados permaneceu inalterada. A seta indica a adição

de composto. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

[048] **Figura 10.** Inibição de proliferação planctônica por cefalotina, DEA e Composto **21** (denotado como "DEA-CP" na figura) em *P. aeruginosa* do tipo selvagem. O gráfico mostra apenas dados para concentrações a 4 mM e 16 mM; concentrações menores não tiveram efeito e concentrações maiores inibiram completamente a proliferação para todos os 3 compostos. As barras de erro indicam o erro padrão; n = 2.

[049] **Figura 11.** Efeito de tratamentos combinados de Composto **21** (denotado como "DEA-CP" na figura), um antibiótico em viabilidade de biofilme de *P. aeruginosa* e células planctônicas. Os biofilmes preestabelecidos proliferados em poços de placas de microtitulação foram expostos, na presença ou ausência de Composto **21**, a ceftazidima ou deixados sem tratamento. Após tratamentos de 1 hora (A, B) ou 2 horas (C, D), os sobrenadantes foram coletados e CFU planctônico foram reenumerados (B, D); as bactérias de biofilme foram suspensas novamente em tampão e CFU de enumerado (A, C). As barras de erro indicam o erro padrão; n = 2.

[050] **Descrição Detalhada**

[051] Os artigos "um" e "um" são usados no presente documento para referirem-se a um ou mais de um (isto é, a

pelo menos um) do objeto gramaticam do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento.

[052]No contexto deste relatório descritivo, o termo "cerca de" é entendido como referência a uma faixa de números que um versado na técnica poderia considerar equivalente ao valor citado no contexto de atingir a mesma função ou resultado.

[053]Por todo este relatório descritivo e nas reivindicações que seguem, a não ser que o contexto exija de outro modo, a palavra "compreender" e variações tais como "compreende" e "que compreende" será entendida para implicar a inclusão de um número inteiro determinado ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas.

[054]Conforme usado no presente documento, o termo "agente antimicrobiano" refere-se a qualquer agente que, sozinho ou em combinação com outro agente tal como um antibiótico, pode matar ou inibir a proliferação de uma ou mais espécies de micro-organismos.

[055]Conforme usado no presente documento, o termo "biofilme" refere-se a qualquer comunidade microbiana confinada em matriz, tridimensional, que exhibe características multicelulares. Dessa forma, conforme usado

no presente documento, o termo biofilme inclui biofilmes associados à superfície assim como biofilmes em suspensão, tal como flocos e grânulos. Os biofilmes podem compreender uma única espécie microbiana ou podem ser complexos de espécies misturadas e podem incluir bactérias assim como fungos, algas, protozoários ou outros micro-organismos.

[056]O termo "micro-organismo formador de biofilme" refere-se a qualquer micro-organismo que pode formar biofilmes, sejam biofilmes de espécie única ou de espécies misturadas.

[057]Conforme usado no presente documento, o termo "dispersão", como tal, refere-se a um biofilme e micro-organismos que produzem um biofilme significa o processo de destacamento e separação de células e um retorno a um comportamento ou fenótipo planctônico das células em dispersão.

[058]Conforme usado no presente documento, o termo "quantidade eficaz" inclui dentro de seu significado uma quantidade suficiente, mas não tóxica, de um agente para fornecer o efeito desejado. A quantidade exata exigida variará de indivíduo para indivíduo dependendo de fatores tais como a espécie de micro-organismos que é tratada, a extensão, severidade e/ou idade do biofilme que é tratado, se o biofilme está associado à superfície ou suspenso, o(s) agente(s) particular(s) que é(são) administrado(s) e o modo

de administração e assim por diante. Assim, não é possível especificar uma "quantidade eficaz" exata. No entanto, para qualquer dado caso, uma "quantidade eficaz" apropriada pode ser determinada por um versado na técnica com o uso de apenas experimentação de rotina.

[059] Conforme usado no presente documento, o termo "expor" significa em geral colocar em contato com. Tipicamente, a exposição direta refere-se à administração do agente ao micro-organismo ou biofilme a ser tratado ou colocar de outro modo o micro-organismo ou biofilme em contato com o próprio agente. Tipicamente, a exposição indireta refere-se à administração de um precursor do agente ativo ou um composto ou molécula que pode gerar, seja sozinho ou em reação com outros compostos ou moléculas, o agente ativo ao micro-organismo ou biofilme ou colocar de outro modo o micro-organismo ou biofilme em contato com o mesmo. Assim, um micro-organismo ou biofilme pode ser exposto ao composto ou composição conforme definido no presente documento de modo direto ou indireto. Ademais, um micro-organismo ou biofilme pode ser exposto a óxido nítrico liberado de um composto de modo direto ou indireto. No contexto da presente revelação, "expor" indiretamente um biofilme ou micro-organismos a um composto ou composição conforme definido no presente documento também inclui a administração do composto ou composição a

um indivíduo em ou sobre o qual o biofilme ou micro-organismos encontram-se. Assim, na presente revelação, os termos "expor", "administrar" e "entregar" e variações dos mesmos podem, em alguns contextos, ser usados de modo intercambiável.

[060]O termo "inibir" e variações dos mesmos, tais como "inibição" e "inibe", conforme usado no presente documento em relação aos biofilmes, significa inibição completa ou parcial de formação e/ou desenvolvimento de biofilme e também inclui dentro de seu escopo a reversão do desenvolvimento de biofilme ou processos associados à formação e/ou desenvolvimento de biofilme. Ademais, a inibição pode ser permanente ou temporária. A inibição pode ser, em uma extensão (em magnitude e/ou espacialmente), e/ou por um tempo, suficiente para produzir o efeito desejado. A inibição pode ser impedimento, retardamento, redução ou de outro modo obstáculo à formação ou desenvolvimento de biofilme. Tal inibição pode ser em magnitude e/ou ser temporal ou espacial em natureza. Ademais, tal inibição pode ser direta ou indireta. Por inibição indireta quer-se dizer que o agente pode afetar a expressão ou atividade de moléculas que, por sua vez, regulam a formação ou desenvolvimento de biofilme.

[061]Conforme usado no presente documento, o termo "morte celular programada" significa um evento de

desenvolvimento dentro de um biofilme que ocorre em estágios definidos e causa autólise, diferenciação celular e o desenvolvimento de subpopulações de células com fenótipos específicos.

[062] Similarmente, o termo "promover" e variações do mesmo, tal como "promoção" e "promove", conforme usado no presente documento, no contexto de promoção da dispersão de micro-organismos de um biofilme, também promoção completa ou parcial de dispersão, que pode ser permanente ou temporária, em uma extensão (em magnitude e/ou espacialmente), e/ou por um tempo, suficiente para produzir o efeito desejado. Tal promoção pode ser direta ou indireta.

[063] Conforme usado no presente documento, o termo "superfície" inclui tanto superfícies biológicas quanto superfícies não biológicas. As superfícies biológicas tipicamente incluem superfícies tanto internas (tal como órgãos, tecidos, células, ossos e membranas) quanto externas (tal como pele, cabelo, apêndices epidérmicos, sementes, folhagem vegetal) a um organismo. As superfícies biológicas também incluem outras superfícies naturais tal como madeira ou fibra. Uma superfície não biológica pode ser qualquer superfície artificial de qualquer composição que suporta o estabelecimento e o desenvolvimento de um biofilme. Tais superfícies podem estar presentes em usinas

e equipamentos industriais e incluem equipamento médico e cirúrgico e dispositivos médicos, tanto implantáveis quanto não implantáveis. Ademais, para os propósitos da presente revelação, uma superfície pode ser porosa (tal como uma membrana) ou não porosa e pode ser rígida ou flexível.

[064]Conforme usado no presente documento, os termos "tratar", "tratamento", "impedir" e "impedimento" referrem-se a qualquer e todos os usos que remediam uma condição ou sistemas, impedem o estabelecimento de uma condição ou doença ou de outro modo impedem, atrasam, retardam ou invertem a progressão de uma condição ou doença ou outros sintomas indesejáveis de qualquer forma, seja qual for. Assim, os termos "tratar" e "impedir" e similares devem ser considerados em seu contexto mais amplo. Por exemplo, o tratamento não implica necessariamente que um paciente é tratado até a recuperação total.

[065]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquila C₁-C₂₀" é entendido incluindo grupos de hidrocarboneto saturado monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 1 a 20 átomos de carbono, tal como metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutyla, secbutyla, butyla terciária, pentyla, hexyla, heptyla, octyla, nonyla, decyla, undecyla, dodecyla e similares.

[066]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquila C₁-C₁₀" é entendido incluindo grupos de

hidrocarboneto saturado monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 1 a 10 átomos de carbono, tal como metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, secbutila, butila terciária, pentila, hexila, heptila, octila e similares.

[067]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquila C₁-C₆" é entendido incluindo grupos de hidrocarboneto saturado monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 1 a 6 átomos de carbono, tal como metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila e similares.

[068]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquenila C₂-C₂₀" é entendido incluindo radicais de hidrocarboneto monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 2 a 20 átomos de carbono e pelo menos uma libação dupla de carbono-carbono, tal como vinila, propenila, 2-metil-2-propenila, butenila, pentenila, hexenila, heptenila, undecenila e similares.

[069]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquenila C₂-C₁₀" é entendido incluindo radicais de hidrocarboneto monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 2 a 10 átomos de carbono e pelo menos uma libação dupla de carbono-carbono, tal como vinila, propenila, 2-metil-2-propenila, butenila, pentenila e similares.

[070]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquenila C₂-C₆" é entendido incluindo radicais de hidrocarboneto monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 2 a 6 átomos de carbono e pelo menos uma libação dupla de carbono-carbono, tal como vinila, propenila, 2-metil-2-propenila e similares.

[071]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquinila C₂-C₂₀" é entendido incluindo radicais de hidrocarboneto monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 2 a 20 átomos de carbono e pelo menos uma libação tripla de carbono-carbono, tal como etinila, propinila, butinila, pentinila, hexinila, undecinila e similares.

[072]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquinila C₂-C₁₀" é entendido incluindo radicais de hidrocarboneto monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 2 a 10 átomos de carbono e pelo menos uma libação tripla de carbono-carbono, tal como etinila, propinila, butinila, pentinila, hexinila e similares.

[073]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquinila C₂-C₆" é entendido incluindo radicais de hidrocarboneto monovalente de cadeia normal e cadeia ramificada que tem 2 a 6 átomos de carbono e pelo menos uma libação tripla de carbono-carbono, tal como etinila, propinila, butinila e similares.

[074]No contexto deste relatório descritivo, o termo "arila" é entendido incluindo radicais aromáticos monovalentes que têm entre 6 e 30 átomos de carbono, por exemplo, fenila, bifenila, naftila, antracênila, fenantrenila e similares.

[075]No contexto deste relatório descritivo, o termo "heteroarila" é entendido incluindo radicais aromáticos monovalentes que têm entre 4 e 25 átomos, em que 1 a 6, ou 1 a 5, ou 1 a 4, ou 1 a 3, ou 1 ou 2 átomos são heteroátomos selecionados dentre nitrogênio, oxigênio e enxofre, por exemplo, furanila, quinazolinila, quinolinila, isoquinolinila, indolila, isoindolila, benzopiranila, benzooxazolila, benzimidazolila, pirazolila, tetrazolila, oxazolila, oxadiazolila, isoxazolila, tiadiazolila, quinolizínila, piranila, isotiazolila, tiazolila, tienila, imidazolila, pirazinila, piridazinila, pirimidinila, isotiazolila, piridila, triazolila, benzotienila, pirrolila, benzotiazolila, quinoxalinila, naftiridinila, pteridinila, carbazolila, azepinila, acridinila, benzisotiazolila, benzoxazolila, benzisoxazolila, benzofurila, purinila, benzimidazolila, triazinila e similares.

[076]No contexto deste relatório descritivo, os termos "halo" e "halogênio" podem ser usados de modo intercambiável e são entendidos incluindo flúor, cloro,

bromo e iodo.

[077]No contexto deste relatório descritivo, o termo "cicloalquila C₃-C₇" é entendido incluindo grupos de alquila cíclica que têm entre 3 e 7 átomos de carbono, por exemplo, ciclobutila, ciclohexila e similares.

[078]No contexto deste relatório descritivo, o termo "cicloalquila C₅-C₇" é entendido incluindo grupos de alquila cíclica que têm entre 5 e 7 átomos de carbono, por exemplo, ciclopentila e similares.

[079]No contexto deste relatório descritivo, o termo "cicloalquenila C₃-C₇" é entendido incluindo grupos de hidrocarboneto cíclico que têm entre 3 e 7 átomos de carbono e pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono, por exemplo, ciclopropenila, ciclopentenila, ciclohexenila e similares.

[080]No contexto deste relatório descritivo, o termo "alquileno C₁-C₃" é entendido incluindo radicais de hidrocarboneto bivalente que têm entre 1 e 3 átomos de carbono, por exemplo, metileno e etileno.

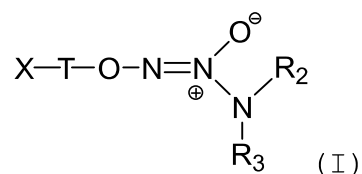
[081] β -lactamases são enzimas produzidas por bactérias na defesa contra antibióticos de β -lactama. Muitos microorganismos formadores de biofilme tal como *Pseudomonas aeruginosa* podem produzir β -lactamases e produzem grandes quantidades de enzimas durante a formação de biofilme e dentro de biofilmes, auxiliando a tonar os antibióticos de

β -lactama ineficazes na erradicação de biofilmes. Conforme descrito e exemplificado no presente documento, os presentes inventores revelaram agora que o acoplamento de um antibiótico de β -lactama ou o núcleo que contém anel de β -lactama de um antibiótico de β -lactama ou agente antimicrobiano a um composto doador de óxido nítrico possibilita a entrega alvejada de concentrações eficazes de óxido nítrico e o controle espacial e temporal sobre a liberação de óxido nítrico mediante a exposição a biofilmes e micro-organismos formadores de biofilme para promover a dispersão de micro-organismos dos biofilmes. Conforme exemplificado no presente documento, os compostos conjugados da presente revelação são estáveis em solução e efetivamente tornam óxido nítrico disponível aos micro-organismos em biofilmes, tendo demonstrado induzir a dispersão rápida de biofilmes de *P. aeruginosa* após apenas 10 minutos de exposição em concentrações na faixa de micromolar.

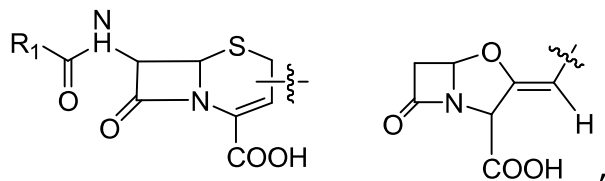
[082] Dessa forma, são fornecidos no presente documento compostos conjugados, composições que compreendem os mesmos e usos dos mesmos, em que os conjugados compreendem um antibiótico de β -lactama ou agente antimicrobiano que contém anel de β -lactama ou um derivado do mesmo, em complexo com um composto doador de óxido nítrico. Tais conjugados são estáveis em solução e atuais como pró-

fármacos de óxido nítrico que possibilitar a entrega de concentrações não tóxicas baixas de óxido nítrico a sítios desejados para promover a dispersão de micro-organismos de biofilmes e inibir a formação e/ou desenvolvimento de biofilmes.

[083]Em um aspecto, a presente invenção fornece um composto da fórmula (I) ou um sal do mesmo:

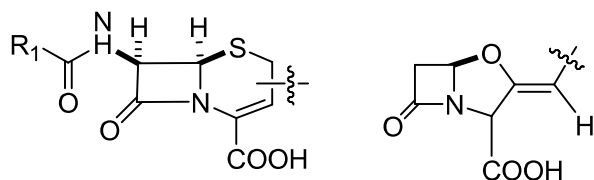


em que T é uma ligação ou um ligante, R₂ e R₃ são resíduos orgânicos e X é selecionado do grupo que consiste em:



em que R₁ é um resíduo orgânico.

[084]Os compostos de fórmula (I) podem ter um ou mais centros quirais. A presente invenção inclui todos os enantiômeros e diastereoisômeros, assim como misturas dos mesmos em quaisquer proporções. A invenção também se estende a enantiômeros isolados ou pares de enantiômeros. Nas modalidades da invenção, X é selecionado do grupo que consiste em:



[085]Estão também dentro do escopo dos compostos de fórmula (I) sais, incluindo sais farmacologicamente aceitáveis. Os sais dos compostos de fórmula (I) podem ser preparados por métodos convencionais conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, sais de adição de base podem se preparados por reação dos compostos de fórmula (I) com uma base adequada. Os exemplos de tais sais incluem sais de metal alcalino, tal como lítio, potássio e sódio, e sais de metal alcalino terroso, tal como cálcio, magnésio e bário. Os sais básicos adicionais incluem, mas sem limitações, sais de amônio, cobre, ferro, manganês e zinco. Os sais de adição de ácido podem se preparados por reação dos compostos de fórmula (I) com ácidos orgânicos ou inorgânicos. Os exemplos de tais sais incluem sais HCl, HBr e HI, sais de outros ácidos minerais tal como sulfato, nitrato, fosfato e similares, alquila e monoarilsulfonatos tal como etanosulfonato, toluenosulfonato e benzeno sulfonato e sais de outros ácidos orgânicos, tal como acetato, trifluoroacetato, tartrato, maleato, citrato, benzoato, ascorbato e similares. Os compostos de fórmula (I) podem ser também quaternizados por reação com compostos tal como haletos de alquila C₁-C₄, por exemplo, haletos de

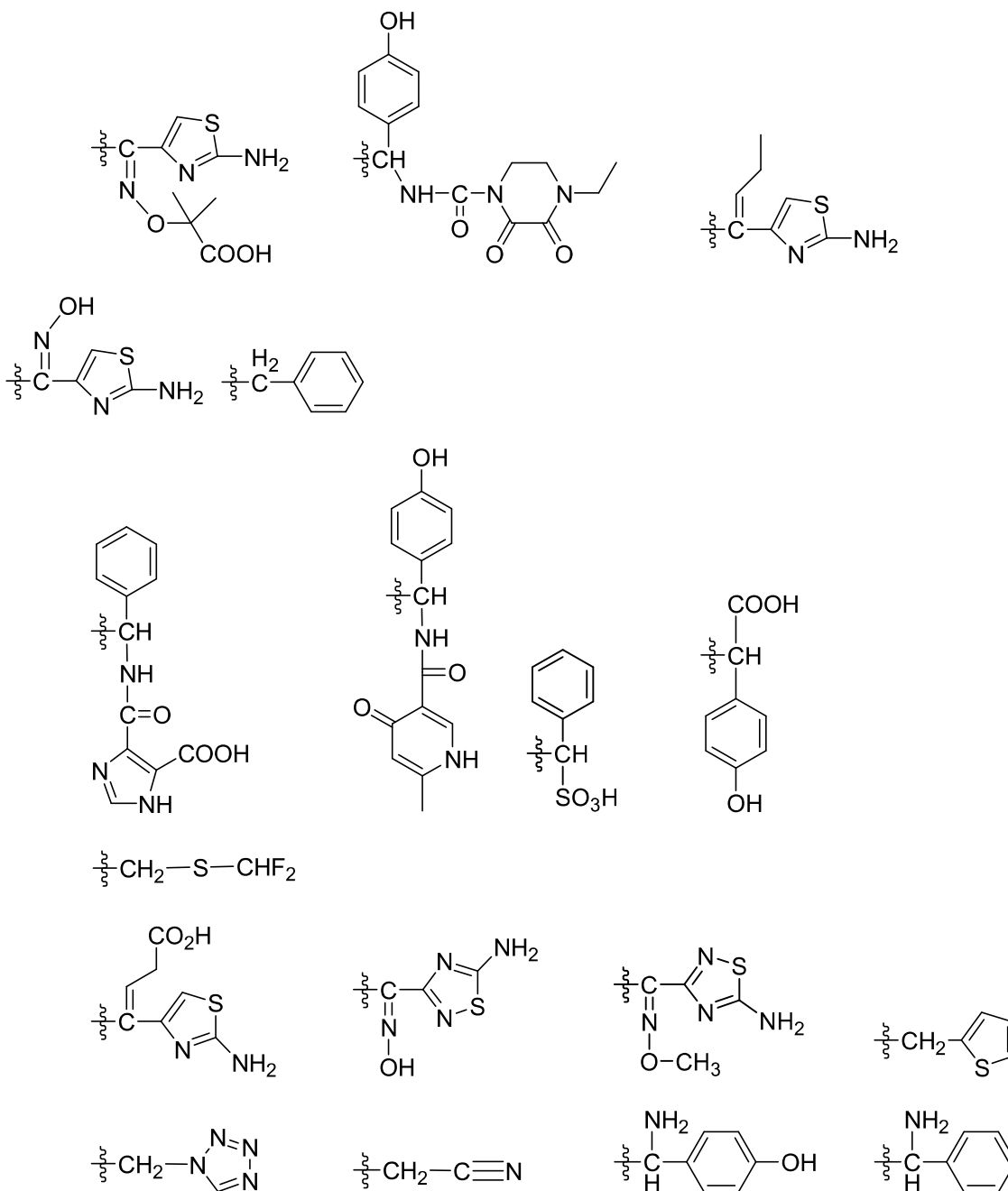
metila, etila, isopropila e butila.

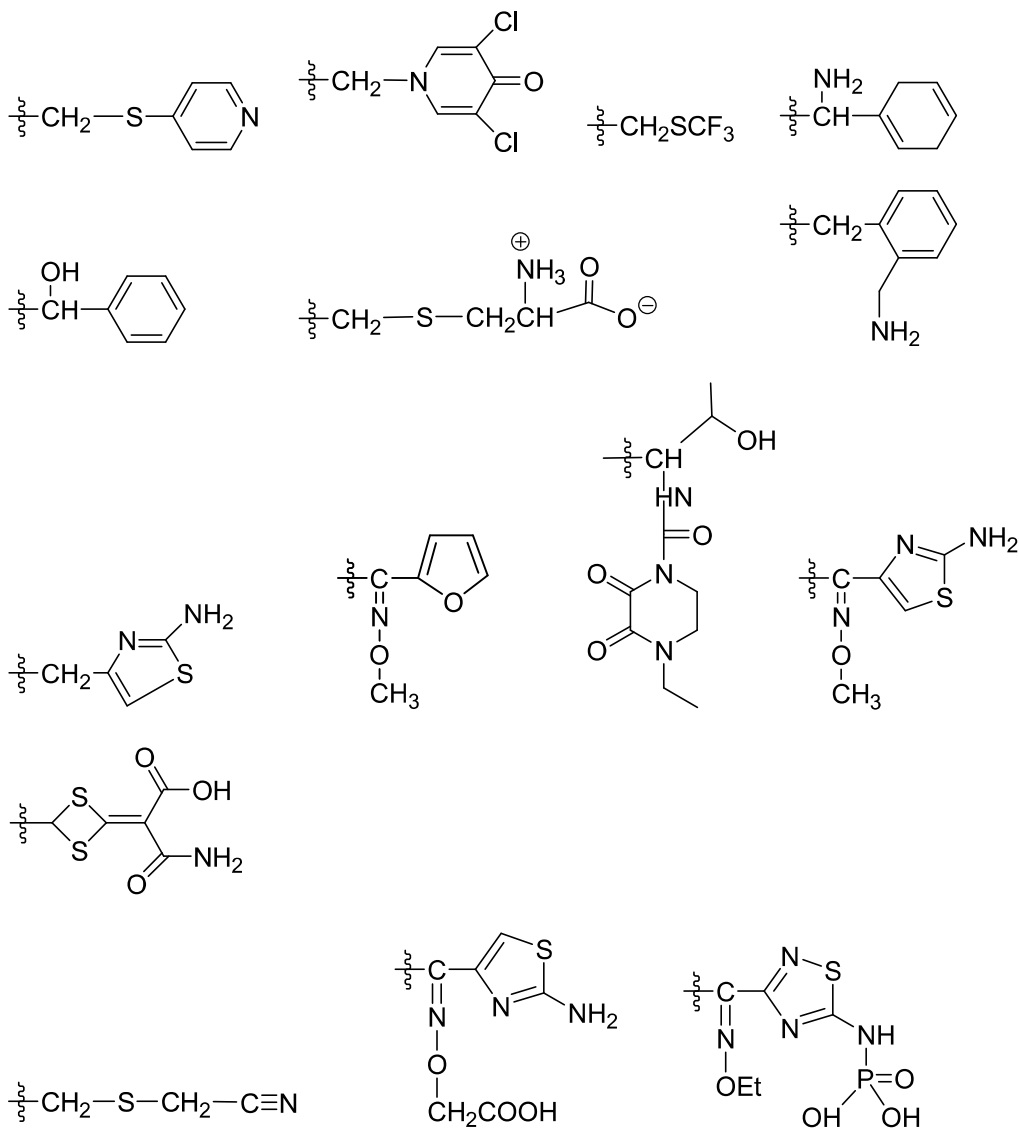
[086]T pode ser um ligante bivalente que tem entre 1 e 20 átomos de carbono. Em uma modalidade, T é um ligante de hidrocarboneto bivalente que tem entre 1 e 20 átomos de carbono, 1 e 15 átomos de carbono, ou entre 1 e 10 átomos de carbono. Em outra modalidade, T é selecionado do grupo que consiste em: $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

[087]R₁ pode ser um substituinte que corresponde a um substituinte ligado ao grupo 7-NHC(O)- de um antibiótico de cefalosporina. Por exemplo, R₁ pode ser um substituinte que corresponde a um substituinte ligado ao grupo 7-NHC(O)- de qualquer um dos seguintes: cefmatileno, cefaloram, cefazolina, cefacetila, cefadroxila, cefalexina, cefaloglicina, cefalonium, cefaloridina, cefalotina, cefapirina, cefatrizina, cefazedona, cefazaflur, cefradina, cefroxidina, ceftezol, cefaclor, cefamandol, cefminox, cefonicid, ceforanida, cefotiam, cefprozil, cefbuperazona, cefuroxima, cefuzonam, cefamicina, cefotetan, cefmetazol, flomoxef, cefixima, ceftriaxona, ceftazidina, cefoperazona, cefcapeno, cefdaloxima, cefdinir, cefditoran, cefetamet, cefmenoxima, cefodizima, cefotaxima, cefpimizol, cefpirimida, cefpodoxima, cefsulodina, cefteram, ceftibuteno, ceftioleno, ceftizoxima, latamoxef, cefepina, cefozopram, cefpiroma, cefquinoma, ceftobiprol, ceftarolina

fossamil e ceftiofur. Deve-se perceber que R₁ pode ser um substituinte que corresponde a um substituinte ligado ao grupo 7-NHC(O)- de qualquer antibiótico de cefalosporina clinicamente útil.

[088] Em uma modalidade, R₁ é selecionado do grupo que consiste em:





[089] Os grupos citados acima correspondem aos substituintes ligados ao grupo 7-NHC(O)- dos antibióticos de cefalosporina específicos citados acima.

[090] Em uma modalidade alternativa, R_1 é da fórmula -Y-arila, em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem entre 1 e 6 átomos de carbono. Em uma modalidade, Y é um hidrocarboneto de cadeia normal ou cadeia ramificada que tem entre 1 e 4 átomos de carbono e a arila é fenila ou naftila.

[091]Em outra modalidade, R_1 é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 4 átomos de carbono e arila e heteroarila são opcionalmente substituídas.

[092]Em uma modalidade adicional, R_1 é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 4 átomos de carbono e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila, naftila, antracênica e fenantrenila e o grupo heteroarila pode ser um anel com 5 ou 6 membros em que entre 1 e 4 átomos de carbono são substituídos por átomos de nitrogênio e/ou enxofre e em que os grupos arila e heteroarila podem ser opcionalmente substituídos por um ou mais substituintes selecionados dentre: alquila C_{1-6} , halo, amino, hidroxila, metóxi e etóxi.

[093]Em uma modalidade adicional, R_1 é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 4 átomos de carbono e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila, naftila, antracênica e fenantrenila e o grupo heteroarila pode ser uma anel com 5 ou 6 membros em que entre 1 e 4 átomos de carbono são substituídos por átomos de nitrogênio e/ou enxofre.

[094]Em uma modalidade adicional, R_1 é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 3 átomos de carbono e o grupo arila é selecionado

dentre: fenila, bifenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila, tiazolila, isotiazolila e pirrolila.

[095]Em uma modalidade adicional, R_1 é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 2 átomos de carbono e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila, tiazolila, isotiazolila e pirrolila.

[096]Em uma modalidade adicional, R_1 é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é $-CH_2-$ e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila, tiazolila, isotiazolila e pirrolila.

[097]Em uma modalidade, R_1 é selecionado do grupo que consiste em: $-CH_2$ -fenila, $-CH_2$ -tienila e $-CH_2$ -tetrazolila.

[098] R_2 e R_3 podem ser independentemente selecionados dentre: hidrogênio, cicloalquila C_3-C_7 , cicloalquenila C_3-C_7 , $(CH_2)_pOC(O)PhOC(O)C_1-C_6$ alquila, $(CH_2)_pOC(O)APhC_1-C_6$ alquila, C_1-C_{20} de cadeia normal ou ramificada, alquenila C_2-C_{20} de cadeia normal ou ramificada, alquinila C_2-C_{20} de cadeia normal ou ramificada, em que as cadeias alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente interrompidas por um ou mais grupos/heteroátomos selecionados dentre O, S, NH, NH_2^+ e em que os grupos

alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente substituídos por um ou mais substituintes selecionados do grupo que consiste em: halogênio, ciano, COOH, $(\text{CH}_2)_p\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{-C}_6\text{alquenila}$, SO_3H , $\text{SO}_2\text{halogênio}$, SO_2NH_2 , NH_2 , NH_3^+ , OH, SH, $\text{OC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $\text{OC}_2\text{-C}_6\text{alquenila}$, $\text{OC}_2\text{-C}_6\text{alquinila}$, arila e heteroarila ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 4, 5, 6, 7 ou 8 membros que pode opcionalmente conter 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 átomos de nitrogênio adicionais e pode ser saturado, insaturado ou parcialmente insaturado e em que o anel com 4, 5, 6, 7 ou 8 membros pode ser opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados do grupo que consiste em: $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_3\text{alquileno-naftil-OC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_3\text{alquileno-Ph-C}(\text{O})\text{-Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OCH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{OPhNO}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{OPhNH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{Chalogênio}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{CH}_3$, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_6\text{alquilenoCOOC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_3\text{alquilenoPhC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O-pirrolidinil-2,5-diona}$, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_3\text{alquilenoPhC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{(CH}_2)_p\text{OC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{halogênio}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{Ph}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{SH}$, $-\text{SO}_2\text{naftil-NC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{ONC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{PhOAc}$, $-\text{C}(\text{O})\text{(CH}_2)_p\text{NHC}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{M}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$, $-(\text{CH}_2)_p\text{CH}(\text{OH})\text{CHOH}$, halogênio, ciano, $-\text{COOH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{-C}_6\text{alquenila}$,

-C(O)OC₂-C₆alquinila, -C(O)SC₁-C₆alquila, -C(O)SC₂-C₆alquenila,

-C(O)SC₂-C₆alquinila, -C(O)C₁-C₆alquila, SO₃H, SO₂halogênio, SO₂fenila, SO₂NH₂, SO₂NR₄R₅, SO₂PhNHCOC₁-C₆alquila, NH₂, OH, SH, OC₁-C₆alquila, OC₂-C₆alquenila, OC₂-C₆alquinila, arila e heteroarila e em que A é um radical de hidrocarboneto bivalente que tem entre 1 e 4 átomos de carbono, p é um número entre 0 e 4, R₄ e R₅ independentemente representam alquila C₁-C₆ e M é piridila, pirimidinila, pirazinila, fenila ou triazinila.

[099] Em uma modalidade alternativa, R₂ e R₃ podem ser independentemente selecionados dentre: hidrogênio, cicloalquila C₅-C₇, (CH₂)_pOC(O)PhOC(O)C₁-C₆alquila, (CH₂)_pOC(O)APhC₁-C₆alquila, alquila C₁-C₁₀ de cadeia normal ou ramificada, alquenila C₂-C₁₀ de cadeia normal ou ramificada e alquinila C₂-C₁₀ de cadeia normal ou ramificada, em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente interrompidas por entre um e três grupos/heteroátomos selecionados dentre O, S, NH e NH₂⁺, e em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente substituídas por entre um e seis substituintes selecionados do grupo que consiste em: halogênio, fenila, etóxi, metóxi, propóxi, COOH, (CH₂)_pCOOC₁-C₄alquila, NH₂, NH₃⁺, OH e SH e em que A é um radical de hidrocarboneto bivalente que tem entre 1 ou 2

átomos de carbono e p é 0, 1 ou 2.

[0100] Em outra modalidade, R_2 e R_3 podem ser independentemente selecionados dentre: hidrogênio, cicloalquila C_5-C_7 , alquila C_1-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, alquenila C_2-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, alquinila C_2-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente interrompidas por entre um e três grupos selecionados dentre O, NH e NH_2^+ e em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente substituídas por entre um e quatro substituintes selecionados do grupo que consiste em: halogênio, fenila, metóxi, COOH, $CH_2COOC_1-C_4$ alquila, NH_2 e NH_3^+ .

[0101] Já em outra modalidade, R_2 e R_3 podem ser independentemente selecionados dentre: hidrogênio, ciclohexila, alquila C_1-C_{10} de cadeia normal ou ramificada ou alquenila C_2-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, em que as cadeias de alquila ou alquenila podem ser opcionalmente interrompidas por um ou dois grupos selecionados dentre NH e NH_2^+ e em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente substituídas por entre um e três substituintes selecionados do grupo que consiste em: fenila, metóxi, COOH, NH_2 e NH_3^+ .

[0102] Em ainda uma modalidade adicional, R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um

anel com 4, 5, 6 ou 7 membros que podem conter opcionalmente 1, 2, 3, 4 ou 5 átomos de nitrogênio adicionais e podem ser saturado, insaturado ou parcialmente insaturado e em que o anel com 4, 5, 6 ou 7 membros pode ser opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados do grupo que consiste em: SO_2NMe_2 , SO_3H , $\text{SO}_2\text{halogênio}$, SO_2NH_2 , $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{Me}$, $-\text{C}(\text{O})\text{piridila}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NMe}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NEt}_2$, fenila, naftila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, triazinila, pirrolidinila, imidazolila, alquila $\text{C}_1\text{-C}_6$, alquenila $\text{C}_2\text{-C}_6$, alquinila $\text{C}_2\text{-C}_6$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{-C}_6\text{alquenila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{-C}_6\text{alquinila}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{Ph}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{SH}$, halogênio, $\text{SO}_2\text{PhNHCOC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$, NH_2 , SH , $\text{OC}_1\text{-C}_6\text{alquila}$ e em que p é um número entre 0 e 2,

[0103] Em outra modalidade, R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5, 6 ou 7 membros que podem conter opcionalmente 1, 2 ou 3 átomos de nitrogênio adicionais e podem ser saturado, insaturado ou parcialmente insaturado e em que o anel com 5, 6 ou 7 membros pode ser opcionalmente substituído por entre um e quatro substituintes selecionados do grupo que consiste em: SO_2NMe_2 , SO_2NH_2 , $-\text{COO}(\text{CH}_2)_p\text{Ph}$, $-\text{C}(\text{O})\text{Me}$, $-\text{C}(\text{O})\text{piridila}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NMe}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NEt}_2$, fenila, piridinila, pirimidinila, pirazinila,

triazinila, pirrolidinila, imidazolila, alquila C₁-C₆, alquenila C₂-C₆, alquinila C₂-C₆, -C(O)OC₁-C₆alquila, -C(O)OC₂-C₆alquenila, -C(O)OC₂-C₆alquinila, -C(O)O(CH₂)_pPh, (CH₂)_pSH, halogênio, NH₂, SH, OC₁-C₆alquila, p é um número entre 0 e 2,

[0104] Em uma modalidade adicional, R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5, 6 ou 7 membros que pode opcionalmente conter 1, 2 ou 3 átomos de nitrogênio adicionais e em que o anel com 5, 6 ou 7 membros pode ser opcionalmente substituído por entre um e três substituintes selecionados do grupo que consiste em: SO₂NMe₂, SO₂NH₂, -C(O)Me, -C(O)piridila, - (CH₂)_pOH, -C(O)NH₂, -COOH, -C(O)NMe₂, -C(O)NEt₂, fenila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, triazinila, pirrolidinila, imidazolila, alquila C₁-C₆, alquenila C₂-C₆, -C(O)OC₁-C₆alquila, -C(O)OC₂-C₆alquenila, halogênio, NH₂, SH, OC₁-C₆alquila, p é um número entre 0 e 2.

[0105] Em uma modalidade adicional, R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₁₀, ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5 ou 6 membros que pode opcionalmente conter entre 1 e 3 átomos de nitrogênio adicionais e que podem ser opcionalmente substituídos por um grupo arila ou heteroarila.

[0106] Em uma modalidade adicional, R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre alquila C_1-C_{10} , ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que pode opcionalmente conter entre 1 e 3 átomos de nitrogênio adicionais e que podem ser opcionalmente substituídos por um grupo arila ou heteroarila.

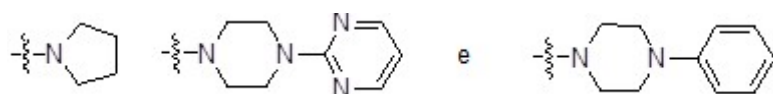
[0107] Em outra modalidade, R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre alquila C_1-C_6 , ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5 ou 6 membros que pode opcionalmente conter 1 ou 2 átomos de nitrogênio adicionais e que pode ser opcionalmente substituído por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, naftila, fenila, pirazinila, triazinila, triazolila, imidazolila, tetrazolila e pirrolila.

[0108] Em outra modalidade, R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre alquila C_1-C_6 , ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que pode opcionalmente conter 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente substituído por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, naftila, fenila, pirazinila, triazinila, triazolila, imidazolila, tetrazolila e pirrolila.

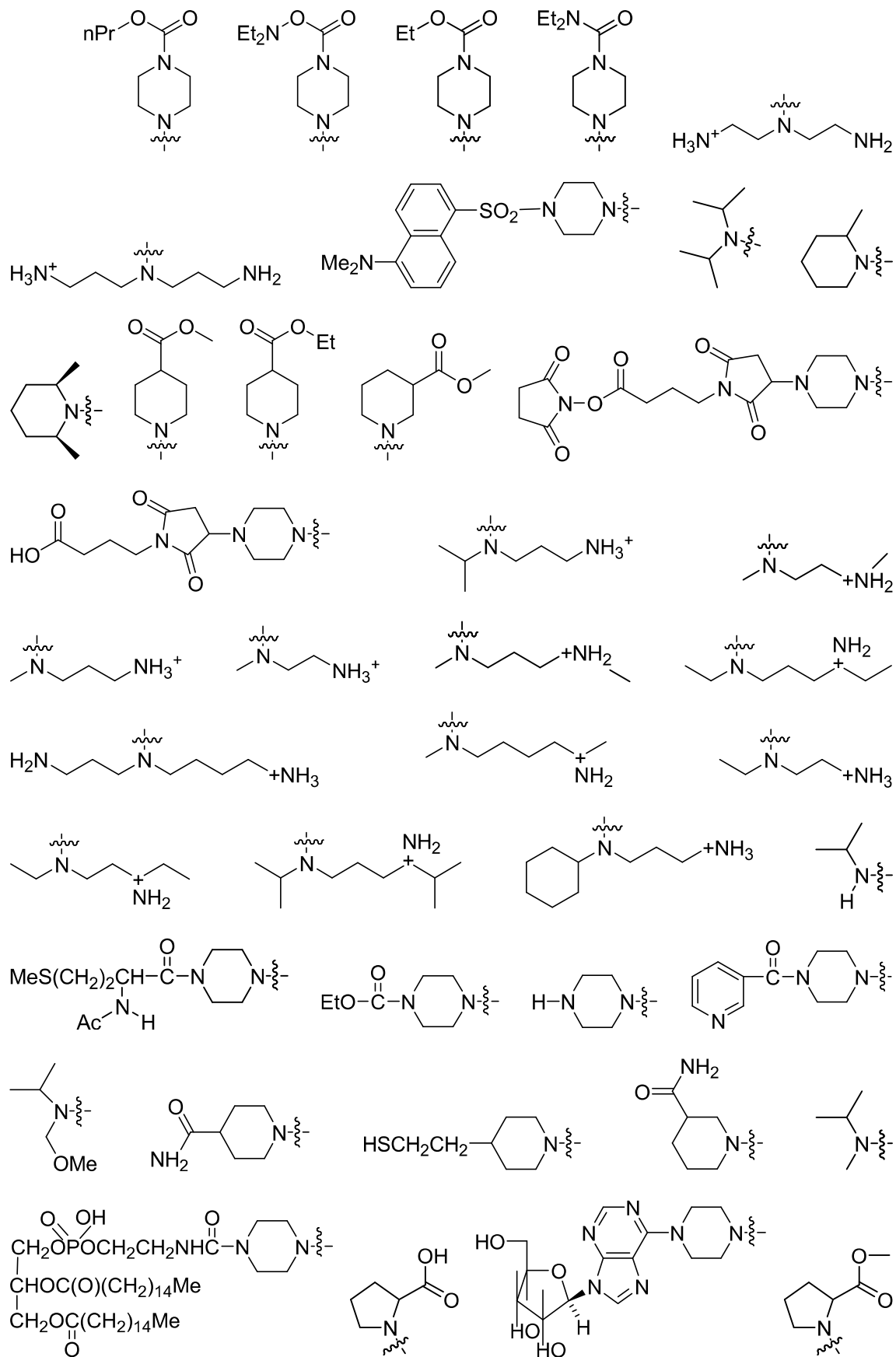
[0109] Em outra modalidade, R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre alquila C_1-C_6 , ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que pode opcionalmente conter 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente substituído por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, fenila, pirazinila e triazinila.

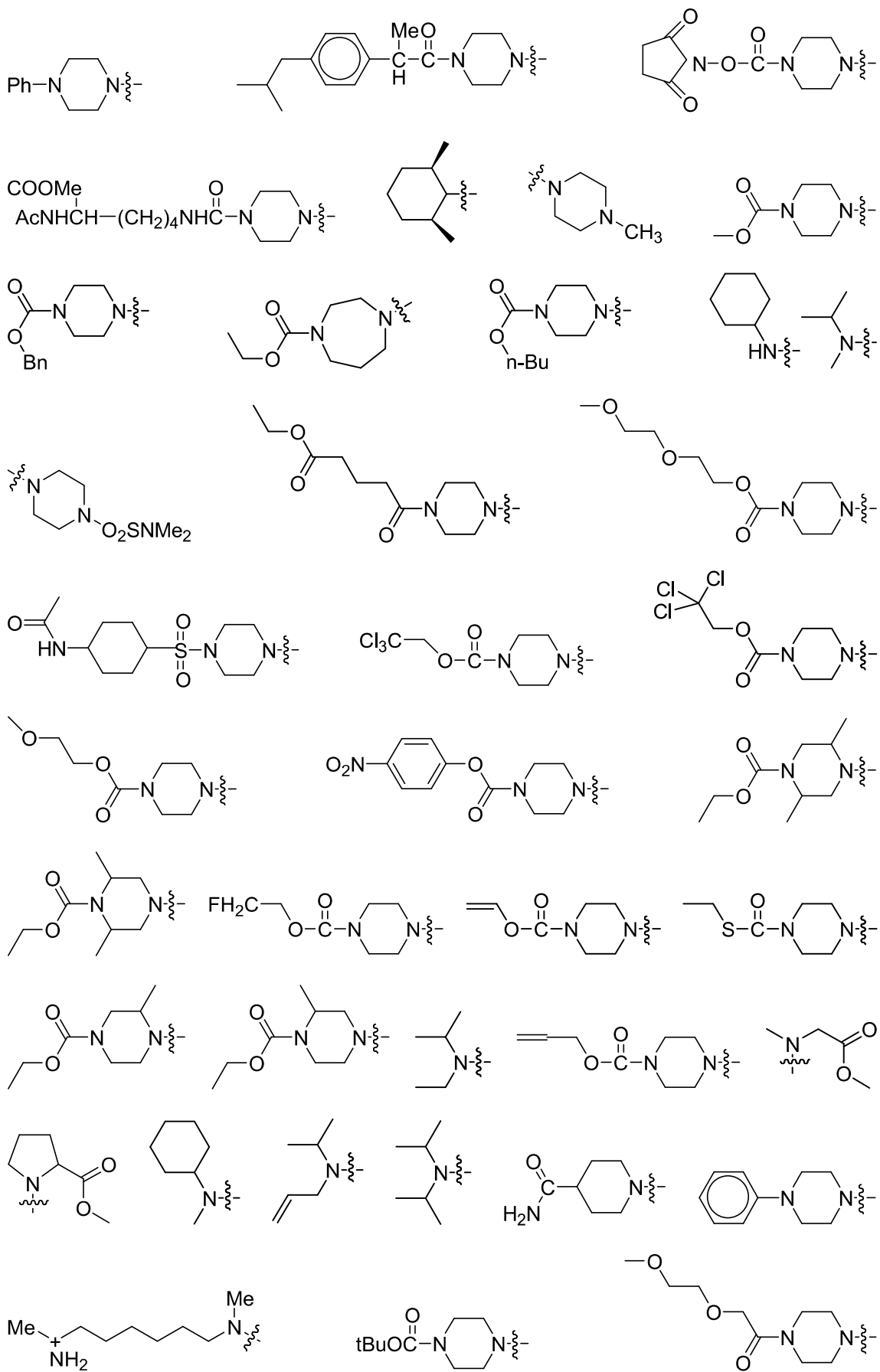
[0110] Já em outra modalidade, R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre metila, etila ou propila, ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que opcionalmente contém 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente substituído no nitrogênio adicional por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, fenila, pirazinila e triazinila.

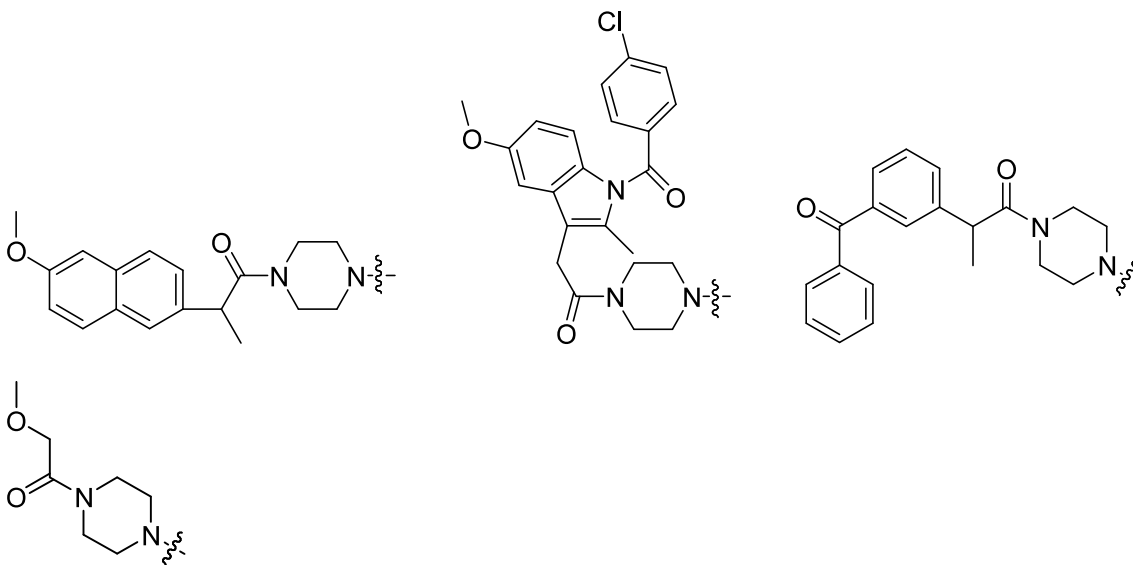
[0111] Em ainda uma modalidade adicional, R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre alquila C_1-C_6 ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam uma estrutura selecionada do grupo que consiste em:



[0112] Em uma modalidade adicional, R_2 e R_3 são







[0115] Em uma modalidade alternativa, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 4 átomos de carbono e arila e heteroarila são opcionalmente substituídas por entre 1 e 3 substituintes selecionados do grupo que consiste em: alquila C₁-C₆, halo, amino e OC₁-C₆ alquila e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₁₀ ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5 ou 6 membros que pode conter opcionalmente entre 1 e 3 átomos de nitrogênio adicionais e que pode ser opcionalmente substituído por um grupo arila ou heteroarila.

[0116] Em uma modalidade alternativa, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 4 átomos de carbono e arila e heteroarila são opcionalmente substituídas e R₂ e R₃ são

independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₁₀, ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5 ou 6 membros que pode conter opcionalmente entre 1 e 3 átomos de nitrogênio adicionais e que pode ser opcionalmente substituído por um grupo arila ou heteroarila.

[0117] Em uma modalidade adicional, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 4 átomos de carbono e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila, naftila, antracênica e fenantrenila e o grupo heteroarila pode ser um anel com 5 ou 6 membros em que entre 1 e 4 átomos de carbono são substituídos por átomos de nitrogênio e/ou enxofre e em que os grupos arila e heteroarila podem ser opcionalmente substituídos por um ou mais substituintes selecionados dentre: alquila C₁₋₆, halo, amino, hidroxila, metóxi e etóxi e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₁₀, ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que pode conter opcionalmente entre 1 e 3 átomos de nitrogênio adicionais e que pode ser opcionalmente substituído por um grupo arila ou heteroarila.

[0118] Em uma modalidade adicional, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto

bivalente que tem 1 a 4 átomos de carbono e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila, naftila, antracênica e fenantrenila e o grupo heteroarila é um anel com 5 ou 6 membros em que entre 1 e 4 átomos de carbono são substituídos por átomos de nitrogênio e/ou enxofre e R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre alquila C_1-C_6 ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que pode conter opcionalmente 1 ou 2 átomos de nitrogênio adicionais e que pode ser opcionalmente substituído por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, naftila, fenila, pirazinila, triazinila, triazolila, imidazolila, tetrazolila e pirrolila.

[0119] Em uma modalidade adicional, T é CH_2 , R_1 é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 3 átomos de carbono e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila, tiazolila, isotiazolila e pirrolila, e R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre alquila C_1-C_6 ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que contém opcionalmente 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente

substituído por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, naftila, fenila, pirazinila, triazinila, triazolila, imidazolila, tetrazolila e pirrolila.

[0120] Em uma modalidade adicional, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é um hidrocarboneto bivalente que tem 1 a 2 átomos de carbono e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila, tiazolila, isotiazolila e pirrolila, e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₆ ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que contém opcionalmente 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente substituído por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, fenila, pirazinila e triazinila.

[0121] Em uma modalidade adicional, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é -CH₂- e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila, tiazolila, isotiazolila e pirrolila, e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₆ ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel

saturado com 5 ou 6 membros que contém opcionalmente 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente substituído por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, fenila, pirazinila e triazinila.

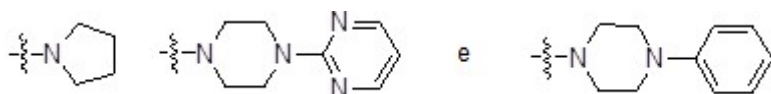
[0122] Em uma modalidade adicional, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é -CH₂- e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila, tiazolila, isotiazolila e pirrolila, e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre metila, etila e propila, ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que contém opcionalmente 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente substituído no nitrogênio adicional por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, naftila, fenila, pirazinila e triazinila.

[0123] Em uma modalidade adicional, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é -CH₂- e o grupo arila é selecionado dentre: fenila, bifenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila, triazolila e pirrolila e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₆, ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6

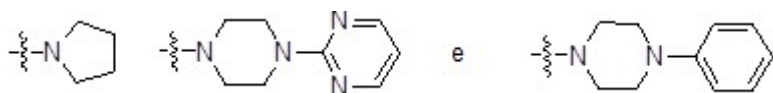
membros que contém opcionalmente 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente substituído no nitrogênio adicional por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila, fenila, pirazinila e triazinila.

[0124] Em uma modalidade adicional, T é CH₂, R₁ é Y-arila ou Y-heteroarila em que Y é -CH₂- e o grupo arila é selecionado dentre: fenila e naftila e o grupo heteroarila é selecionado dentre tienila, tetrazolila, imidazolila e triazolila e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₆, ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel saturado com 5 ou 6 membros que contém opcionalmente 1 átomo de nitrogênio adicional e que pode ser opcionalmente substituído no nitrogênio adicional por um substituinte selecionado do grupo que consiste em: pirimidinila e fenila.

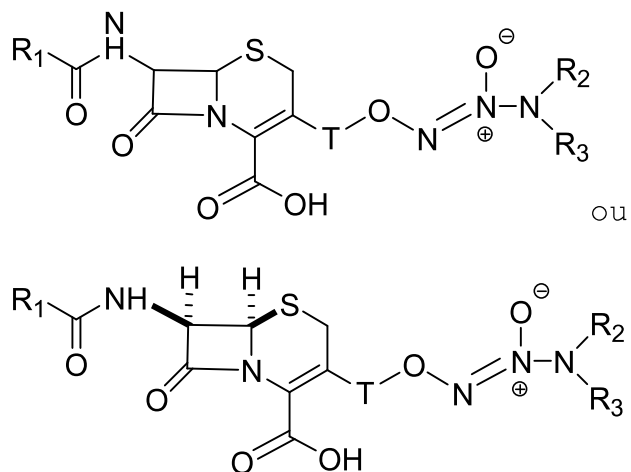
[0125] Em uma modalidade, T é CH₂, R₁ é selecionado do grupo que consiste em: -CH₂-fenila, -CH₂-tienila e -CH₂-tetrazolila e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre alquila C₁-C₆ ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam uma estrutura selecionada do grupo que consiste em:



[0126] Em ainda uma modalidade adicional, T é CH₂, R₁ é selecionado do grupo que consiste em: -CH₂-fenila, -CH₂-tienila e -CH₂-tetrazolila, e R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre metila, etila e propila, ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam uma estrutura selecionada do grupo que consiste em:



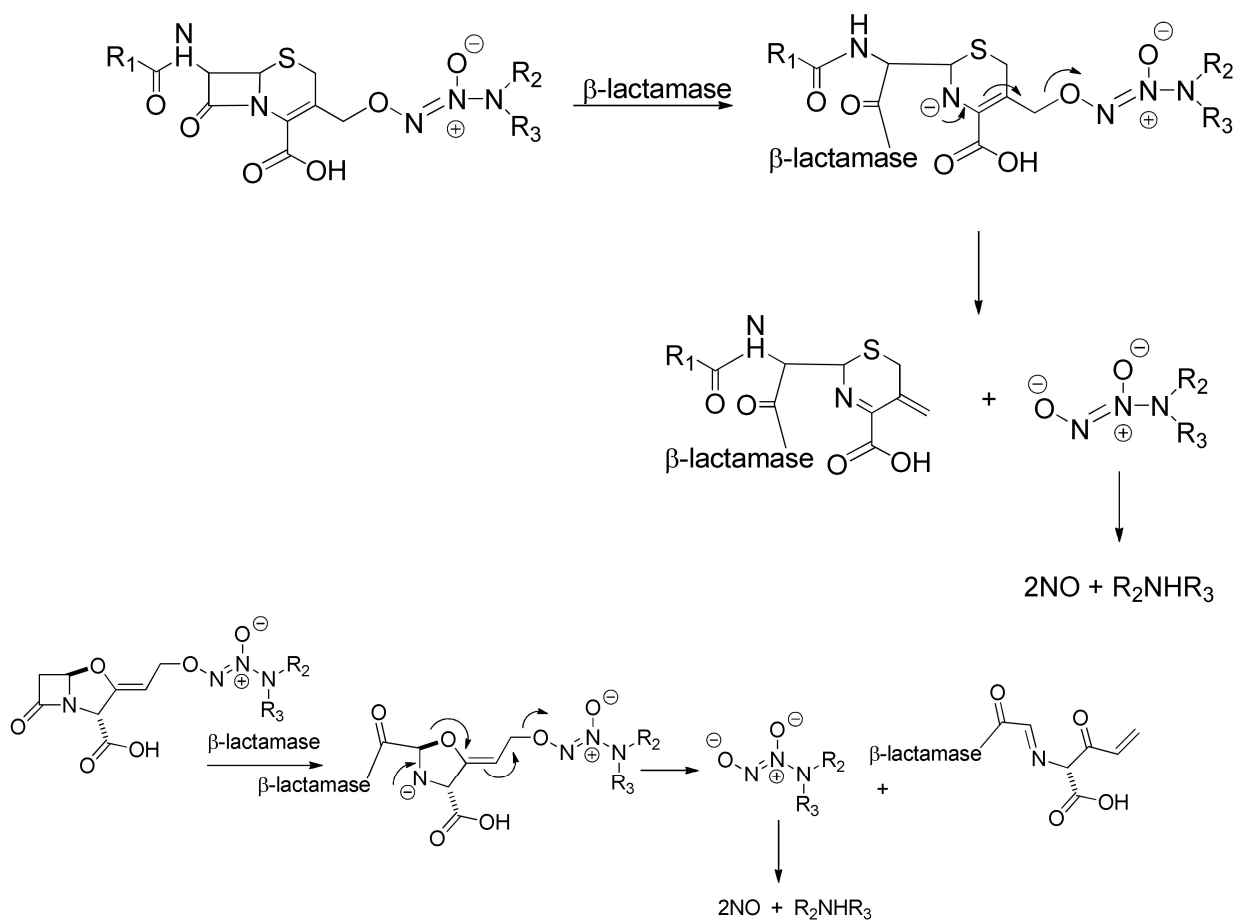
[0127] O composto de fórmula (I) pode ter a seguinte estrutura:



em que R₁, R₂, R₃ e T são conforme definidos acima e no presente documento.

[0128] Quando expostos a uma β -lactamase ou transpeptidase, os compostos de fórmula (I) ao final sofrem uma reação de eliminação que resulta na liberação de óxido nítrico. Dessa forma, os compostos de fórmula (I) representam pró-fármacos de óxido nítrico. O mecanismo pelo

qual o óxido nítrico é liberado dos compostos de fórmula (I) é mostrado abaixo no Esquema 1. Devido ao fato de que a reação de eliminação é estimulada por exposição a uma β -lactamase ou transpeptidase, uma enzima específica para bactérias, a liberação de óxido nítrico dos compostos de fórmula (I) pode ser localizada na proximidade de um biofilme, assim minimizando os efeitos colaterais e a toxicidade em outras localizações que podem estar associados à liberação descontrolada de óxido nítrico.



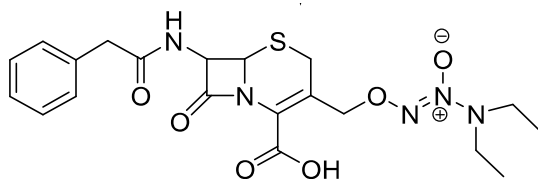
Esquema 1 - Liberação de óxido nítrico de compostos de fórmula (I) após a exposição a β -lactamase.

[0129] A taxa de liberação de óxido nítrico dos compostos de fórmula (I) pode ser modulada por alteração dos substituintes R_2 e/ou R_3 . Tempos de liberação na ordem de alguns segundos podem ser atingidos quando R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel de pirrolidinila, enquanto tempos de liberação na ordem de alguns minutos são possíveis quando R_2 e R_3 são grupos de alquila inferior, tal como etila, por exemplo. Tempos de liberação na ordem de cerca de 3 a 20 horas podem ser atingidos quando R_2 e R_3 são grupos de alquila inferiores que têm substituintes amino terminais. Dessa forma, uma taxa de liberação apropriada de óxido nítrico dos compostos de fórmula (I) dependente da aplicação pretendida é atingível por seleção de substituintes R_2 e R_3 apropriados. Dessa forma, aqueles versados na técnica reconhecerão que R_2 e R_3 podem ser selecionados dentre uma faixa ampla de resíduos orgânicos dependendo do tempo de liberação desejado.

[0130] Devido a seu distanciamento do anel de β -lactama e diazeniodiolato, o substituinte R_1 exerce efeito mínimo sobre a reação de uma β -lactamase com os compostos de fórmula (I) e a eliminação subsequente de óxido nítrico. Dessa forma, aqueles versados na técnica reconhecerão que R_1 não é limitado aos substituintes específicos definidos no presente documento, mas, ao invés disso, representam

qualquer resíduo orgânico.

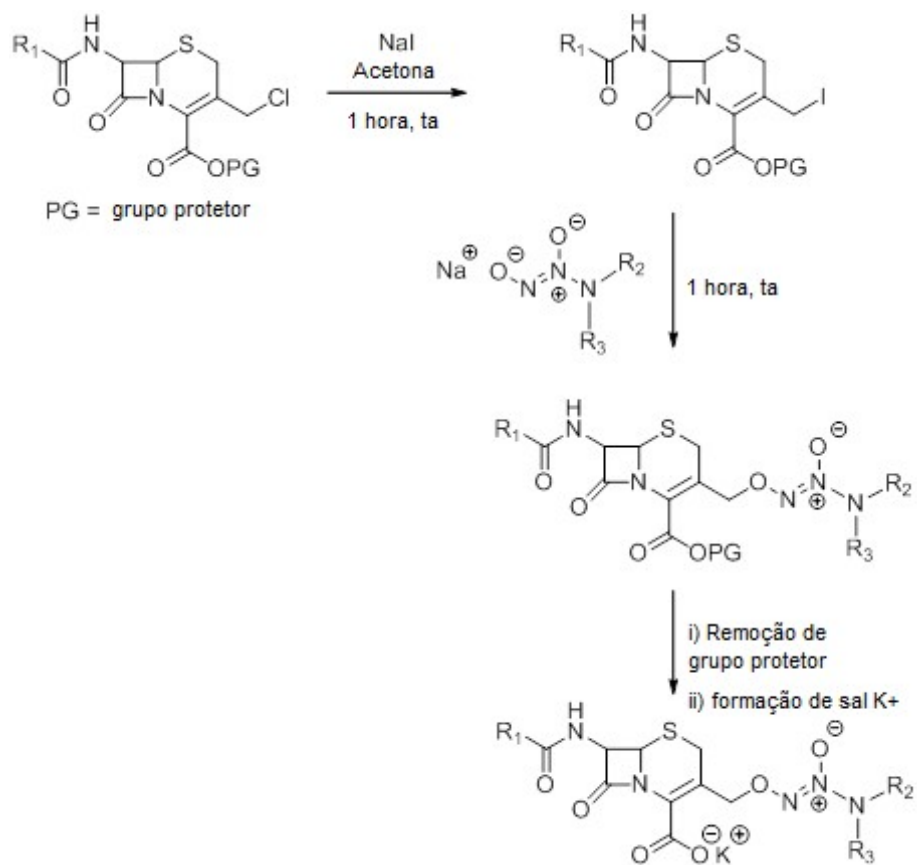
[0131] Em modalidades particulares, os compostos da revelação compreendem um núcleo ou centro de cefalosporina ligado a um diazeniodiolato. Em modalidades particulares adicionais, a cefalosporina é cefaloram. Um composto exemplificativo de fórmula I fornecido pela presente revelação tem a seguinte estrutura. Tanto ácido carboxílico livre quanto sais de carboxilato (por exemplo, sal K^+) são contemplados.

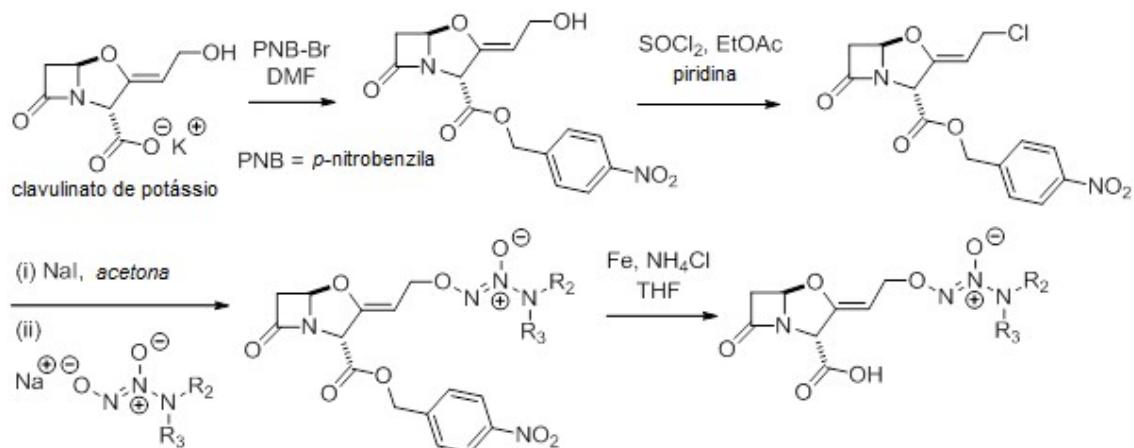


[0132] Nas modalidades adicionais, os substituintes R_2 e/ou R_3 podem compreender ainda um antibiótico que é liberado dos compostos de fórmula (I) juntamente com óxido nítrico. A liberação concomitante de óxido nítrico e o antibiótico podem atuar em conjunto para matar mais efetivamente micro-organismos de biofilme; em que o óxido nítrico induz e promove a dispersão de micro-organismos de um biofilme e o antibiótico atua nas células em dispersão. Aqueles versados na técnica perceberão que qualquer antibiótico adequado pode ser ligado aos substituintes R_2 e/ou R_3 de compostos definidos no presente documento, com a seleção do antibiótico apropriado dependendo de fatores tais como a identidade dos micro-organismos formadores de

biofilme, da extensão do biofilme e do ambiente em que o biofilme está localizado. O antibiótico pode ser um antibiótico que compreende um grupo NH para facilitar a formação de um conjugado de antibiótico e diazeniodiolato. Em uma modalidade, o antibiótico é ciprofloxacina ou um antibiótico relacionado tal como N-desmetil levofloxacina.

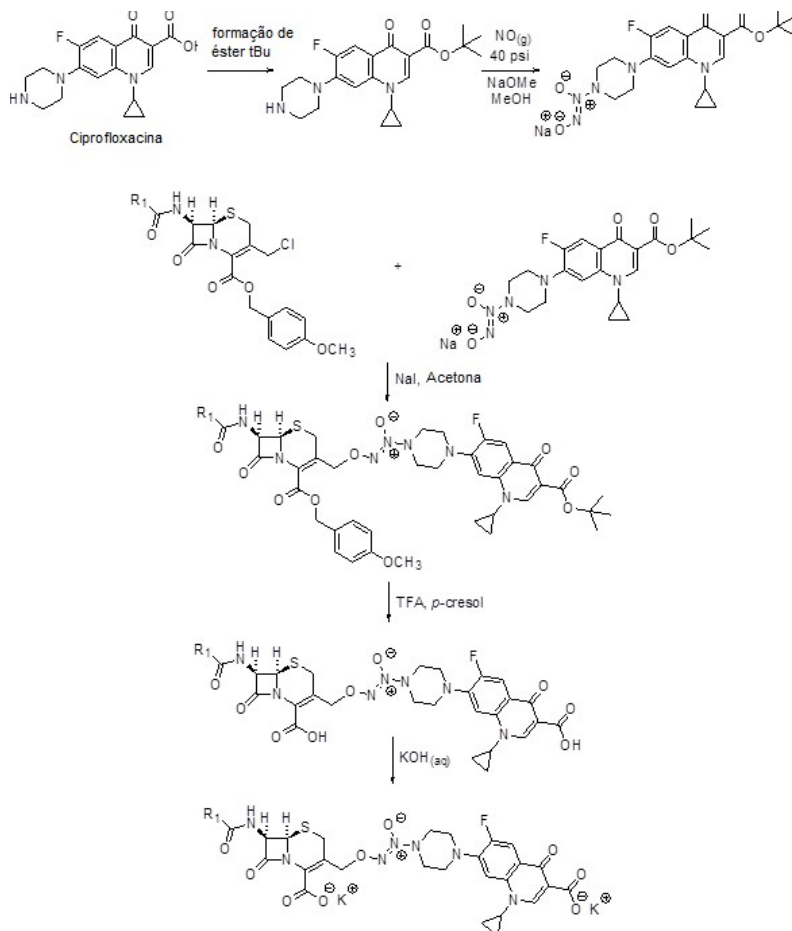
[0133] Os compostos da presente revelação podem ser preparados por acoplamento da porção química $-O-N=N^+(O^-)-N(R_2)(R_3)$ a X, ou por meio de um ligante ou uma ligação direta. Em uma modalidade, os compostos exemplificativos de fórmula (I) podem ser preparados de acordo com o Esquema 2.





Esquema 2: Preparação de compostos de fórmula (I).

[0134] Os compostos de fórmula (I) em que os substituintes R_2 e/ou R_3 compreendem ainda um antibiótico podem ser preparados pelo método representado no Esquema 3.



Esquema 3: Preparação de um composto de fórmula (I)

que compreende um antibiótico adicional (por exemplo, ciprofloxacina).

[0135] Apesar de o antibiótico representado no método ser ciprofloxacina, aqueles versados na técnica perceberão que o método é aplicável a outros antibióticos que podem ser convertidos em derivados de diazeniodiolato.

[0136] Tipicamente, os biofilmes a serem tratados em concordância com as modalidades descritas no presente documento incluem micro-organismos que expressam ou podem ser induzidos a expressar uma enzima tal como uma β -lactamase ou uma transpeptidase. A indução de expressão de uma β -lactamase pode ser atingida por pré-tratamento de micro-organismos ou biofilmes com um antibiótico de β -lactama adequado ou administração de um antibiótico de β -lactama adequado juntamente com a administração dos compostos de fórmula (I). O antibiótico de β -lactama pode induzir a produção de β -lactamase extracelular nos ditos micro-organismos formadores de biofilme. O antibiótico de β -lactama pode ser administrado em qualquer concentração adequada, que pode ser subinibitória, bacteriostática ou bactericida. A β -lactamase é aquela que pode reconhecer e clivar um anel de β -lactama. Os antibióticos de β -lactama adequados para uso na indução de expressão de β -lactamase onde necessário pode, portanto, variar dependendo dos micro-organismos aos quais os compostos de fórmula (I)

devem ser entregues. Aqueles versados na técnica poderiam facilmente ser capazes de determinar o antibiótico de β -lactama apropriado a ser empregado.

[0137] Dessa forma, os compostos, as composições e os métodos da presente revelação possibilitam o controle espacial e temporal de liberação de óxido nítrico, assim facilitando a entrega alvejada ou administração de um gerador de óxido nítrico ou agente de liberação a um sítio desejado que compreende um biofilme ou em que um biofilme pode ser formado, e a liberação de óxido nítrico com cinética apropriada para a aplicação particular.

[0138] Aqueles versados na técnica perceberão que as modalidades da presente revelação são aplicáveis a biofilmes de espécie única ou de espécies misturadas. As espécies bacterianas às quais a presente invenção refere-se podem ser quaisquer espécies capazes de formar um biofilme ou que contribuem para um biofilme e que produzem ou podem ser induzidas a produzir uma β -lactamase. As espécies podem incluir, mas sem limitações, *Pseudomonas* spp. tal como *P. aeruginosa*, *Pseudoalteromonas* spp. tal como *P. tunicata*, *Staphylococcus* spp. tal como *S. aureus* e *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. tal como *E. coli*, *Shigella* spp., *Mycobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Legionella* spp., *Haemophilus* spp., *Bacillus* spp., *Desulfovibrio* spp., *Shewanella* spp.,

Geobacter spp., *Klebsiella* spp. tal como *K. pneumoniae*, *Proteus* spp. tal como *P. mirabilis*, *Serratia* spp. tal como *S. marcescens*, *Porhyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Proteus* spp., *Aeromonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Micrococcus* spp. e *Burkholderia* spp.. Alternativamente, aqueles versados na técnica perceberão que em algumas aplicações da presente invenção, as identidades das espécies particulares nas comunidades misturadas do biofilme a ser tratado são indeterminadas e não são críticas para a aplicabilidade da invenção.

[0139] Em concordância com modalidades reveladas no presente documento, os compostos de fórmula (I) são tipicamente usados em quantidades de modo que uma concentração baixa, não tóxica, de óxido nítrico seja liberada na proximidade do biofilme ou micro-organismos formadores de biofilme. A concentração de óxido nítrico pode estar na faixa de nanomolar, micromolar ou milimolar. Em modalidades particulares, a concentração pode estar entre cerca de 1 nM e cerca de 100 mM, entre cerca de 10 nM e cerca de 50 mM, entre cerca de 25 nM e cerca de 50 mM, entre cerca de 50 nM e cerca de 25 mM, entre cerca de 100 nM e cerca de 10 mM, entre cerca de 200 nM e cerca de 1 mM, entre cerca de 500 nM e 500 μ M, entre cerca de 500 nM e 100 μ M, ou entre cerca de 1 μ M e cerca de 50 μ M. A concentração mais adequada para atingir o efeito desejado dependerá de

inúmeros fatores e pode ser determinada por aqueles versados na técnica com o uso de experimentação de rotina. Tais fatores incluem, mas sem limitações, o composto particular usado para liberação de óxido nítrico, o meio ou via de administração do composto, a natureza, estrutura e idade do biofilme, a espécie de micro-organismo a ser tratada e assim por diante.

[0140] Os compostos, composições e métodos da presente revelação podem ser empregados em combinação com pelo menos um antibiótico adicional ou agente antimicrobiano. Conforme descrito anteriormente no presente documento, os compostos da presente revelação podem incorporar um antibiótico ligado aos substituintes R₂ e/ou R₃. Alternativa ou adicionalmente, os compostos da presente revelação podem ser administrados ou entregues em conjunto com um ou mais antibióticos ou agentes antimicrobianos, seja simultânea ou sequencialmente. Para aplicação sequencial, os antibióticos ou agentes antimicrobianos podem ser formulados na mesma composição que os compostos da presente revelação. A título de exemplo apenas, os antibióticos adequados incluem, mas sem limitações, β -lactamas, monopenems, carboxipenems, aminoglicosídeos, quinolonas, macrolidas, lincozamidas, tetraciclinas, estreptograminas, glicopeptídeos, rifamicinas, sulfonamidas cloramfenicol, ácido nalidíxico, compostos que contêm azol

e antibióticos peptídicos. Os antibióticos exemplificativos incluem ceftazidima e tetraciclina. Os agentes antimicrobianos adequados incluem, mas sem limitações, detergentes, tensoativos, agentes que induzem estresse oxidante, bactericidas e enzimas antimicrobianas, peptídeos e fago. As enzimas antimicrobianas incluem, mas sem limitações, lipases, pronases, liases (por exemplo, alginato liases) e várias outras enzimas proteolíticas e nucleases. Os antibióticos e agentes antimicrobianos podem ser naturais ou sintéticos. O antibiótico ou agente antimicrobiano empregado pode ser selecionado para a aplicação particular da invenção em uma base de caso para caso e aqueles versados na técnica perceberão que o escopo da presente invenção não é limitado pela natureza ou identidade do agente antimicrobiano particular.

[0141] Os compostos, composições e métodos revelados no presente documento encontram aplicação em uma faixa ampla de ambientes e circunstâncias. O seguinte é uma discussão breve de algumas áreas gerais de aplicação. No entanto, aqueles versados na técnica perceberão facilmente que qualquer ambiente ou situação em que o desenvolvimento de biofilme é um problema ou em que é desejável inibir a proliferação microbiana será potencialmente adequado.

[0142] Os compostos, composições e métodos da presente revelação encontram aplicação particular no

tratamento, impedimento e gerenciamento progressivo de doenças infecciosas e de doenças e distúrbios associados a, caracterizados por, ou causados por biofilmes e micro-organismos formadores de biofilme. Por exemplo, uma variedade de infecções bacterianas associadas à formação de biofilme pode ser tratada com os métodos e composições da invenção, tal como fibrose cística, otite média, endocardite bacteriana, pedra nos rins, doença de legionário, infecções do trato urinário, infecções pulmonares, placa dentária, cárie dentária e infecções associadas a procedimentos cirúrgicos ou queimaduras. Dessa forma, as composições da invenção podem ser formuladas como composições farmacêuticas ou formam componentes de, por exemplo, curativos cirúrgicos, enxaguatório bucal, pasta de dente ou soluções salinas.

[0143] Os compostos e composições da presente revelação podem estar incluídos em composições farmacêuticas, cosméticas, dermatológicas ou de entrega tópica como conservantes para inibir ou impedir a proliferação e/ou colonização de micro-organismos indesejados. As composições da invenção são, sendo assim, úteis para impedir a decomposição e, portanto, aumentar a vida útil de qualquer tipo de composições farmacêuticas, cosméticas, dermatológicas ou de entrega tópica às quais são adicionadas. Os compostos ou composições da revelação

podem ser incluídas de modo conveniente em qualquer composição farmacêutica, cosmética, dermatológica ou de entrega tópica líquida ou sólida durante a fabricação da mesma, ou alternativamente após a fabricação. O termo "composição cosmética" é entendido significando uma composição destinada a ser colocada em contato com qualquer parte externa de um corpo animal, incluindo as membranas mucosas da cavidade oral, os dentes, o cabelo e as unhas, para o propósito de, por exemplo: proteger, perfumar, limpar, manter (isto é, hidratar ou esfoliar), embelezar, alterar a aparência ou alterar o odor do corpo. Os exemplos de composições cosméticas incluem, mas sem limitações: produtos para cuidados das unhas, maquiagem, produtos destinados à aplicação nos lábios, máscaras e esfoliantes faciais, tinturas de cabelo, corantes e branqueadores, produtos para ondular, fortalecer e fixar, produtos de limpeza tal como loções, pós e xampus, produtos condicionadores, tal como, loções, cremes, óleos, produtos de cabelereiro tal como loções e lacas, produtos para cuidado dos dentes e da boca, incluindo pastas de dente, enxaguatórios bucais, limpadores de língua, alvejantes/branqueadores dentais e limpadores dentais, perfumes, águas de toalete, água-de-colônia, produtos de higiene feminina, desodorantes, antiperspirantes, limpadores tal como sabonete, sabão desodorante,

adstringente e lavagens de pelo, produtos de depilação tal como cremes, espumas e loções, preparações para banheira e chuveiro tal como sais, espumas, óleos, géis, etc., depiladores, pós pós-banho, pós higiênicos, produtos hidratantes tal como cremes, loções, géis e espumas, produtos para banho de sol (sem SPF ou SPF <4), produtos antirrugas (sem SPF) e produtos antienvhecimento (sem SPF).

[0144] Os compostos, composições e métodos da presente revelação podem também ser usados no revestimento de dispositivos médicos, incluindo equipamento médico e cirúrgico e dispositivos médicos implantáveis, incluindo, mas sem limitações, cateteres venosos, cateteres de drenagem (por exemplo, cateteres urinários), stents, marca-passos, lentes de contato, aparelhos auditivos, sensores de glicose percutâneos, equipamento de diálise, cânula de entrega relacionada à bomba de fármaco, próteses tal como articulações artificiais, corações, válvulas do coração ou outros órgãos, dispositivos de fixação médica (por exemplo, hastes, parafusos, pinos, placas e similares). Ademais, as modalidades da presente revelação encontram aplicação em reparo de feridas, já que, por exemplo, os compostos e composições que compreende os mesmos podem ser impregnados ou revestidos em suturas e curativos de ferida tais como bandagens.

[0145] Os compostos, composições e métodos da presente revelação também encontram aplicação em uma gama de aplicações industriais e domésticas, incluindo, mas sem limitações, reservatórios de suprimento de água e tubos de alimentação, tubos de drenagem (escala doméstica ou industrial), equipamento de processo de, por exemplo, torres de resfriamento, usinas de tratamento de água, fábricas de processamento de laticínios, fábricas de processamento de alimentos, usinas de fabricação de produtos químicos, usinas de fabricação farmacêutica e biofarmacêutica, tubulações de óleo e equipamento de refinaria de óleo e moinhos de polpa e papel. Outros ambientes e ambientações receptivos incluem, por exemplo, tintas ou revestimentos anti-incrustação marinha, por exemplo, no tratamento de cascos de navios, equipamento de aquicultura, redes de pesca e outra estruturas em água.

[0146] As composições de acordo com a presente revelação podem estar em qualquer forma adequada. Tipicamente, a forma dependerá de qual é a mais adequada para aplicação ou entrega ao sítio exigido e assim variará com as aplicações doméstica, industrial e médica diferentes. Por exemplo, uma composição pode ser formulada para administração *in vivo*, tal como na forma de um líquido, suspensão, aspensão nasal, colírios, pó, tablete, cápsula, creme, pasta, gel ou loção. Para aplicações

industriais e domésticas, a composição pode ser formulada como uma tinta, cera, outro revestimento, emulsão, solução, gel, suspensão, microesferas, pó, grânulos, péletes, lascas ou aspersão. O versado na técnica reconhecerá também que a formulação apropriada dependerá da aplicação particular e da via de entrega proposta. As vias de administração adequadas para aplicações *in vivo* incluem, por exemplo, administração oral, nasal, parenteral (por exemplo, intravenosa, tópica, intra-arterial, intramuscular, intraocular), transdérmica e subcutânea.

[0147] As composições da invenção tipicamente também incluem carreadores, diluentes ou excipientes. Os carreadores, diluentes e excipientes adequados são conhecidos por aqueles versados na técnica. Os diluentes, adjuvantes e excipientes devem ser "aceitáveis" em termos de serem compatíveis com os outros ingredientes da composição e, no caso de composições farmacêuticas, não deletérios do receptor dos mesmos. Os carreadores podem ser líquidos ou sólidos. No caso de carreadores líquidos, o líquido pode ser um solvente aquoso ou não aquoso.

[0148] Adicionalmente à liberação controlada de óxido nítrico fornecida pelos compostos da presente revelação por si próprio, um nível adicional de liberação controlada pode ser desejável e pode ser conferido pela formulação de compostos em composições. Para aplicações

farmacêuticas, inúmeros sistemas de liberação controlada adequados são conhecidos na técnica. Por exemplo, partículas coloidais poliméricas ou microencapsulados (micropartículas, microesferas ou nanopartículas) na forma de um reservatório e dispositivos de matriz podem ser empregados ou o agente pode estar contido por um polímero que contém aditivo hidrofílico e/ou lixiviáveis, por exemplo, um segundo polímero, tensoativo ou plastificante, etc. para gerar um dispositivo poroso, ou um dispositivo em que a liberação de fármaco pode ser "controlada" de modo osmótico (tanto reservatórios quanto dispositivos de matriz). Moléculas do tipo gaiola grandes tal como os fulerenos de Buckminster C₆₀ ("Buckyballs") ou dendrímeros hiperramificados (starburst) podem ser também usados.

[0149] Tipicamente, para anti-incrustação e outras aplicações industriais, a composição, por exemplo, na forma de uma tinta ou outro revestimento de superfície, emprega um carreador que possibilita a liberação controlada do agente ativo de modo temporal e/ou espacial. Uma variedade de métodos para atingir liberação controlada de agentes bioativos é conhecida por aqueles versados na técnica e podem incluir, por exemplo, encapsulação do agente ativo em um polímero adequado ou produto à base de polímero. O polímero pode ser um polímero orgânico ou inorgânico, por exemplo, uma poliolefina, poliéter, poliéster, poliamida,

poliuretano ou polipeptídeo. Os polímeros adequados para fornecer liberação controlada são conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, conforme revelado na Patente nº U.S. 6.610.282, a revelação da qual é incorporada ao presente a título de referência.

[0150] Tipicamente, a taxa de liberação da substância é determinada pelas propriedades do próprio polímero assim como fatores ambientais (tal como pH, temperatura etc). Os sistemas de liberação controlada podem entregar substâncias lenta e continuamente por até diversos anos. Aqueles versados na técnica perceberão que inúmeros sistemas de liberação controlada são aplicáveis à entrega de agentes de acordo com a presente invenção. A título de exemplo apenas, a liberação pode ser controlada por difusão, quimicamente controlada ou ativada por solvente.

[0151] Em sistemas controlados por difusão, a difusão do agente capturado dentro de uma matriz polimérica e o fator de determinação de taxa para a taxa de liberação geral. Um tipo de sistema controlado por difusão emprega um dispositivo de reservatório em que o agente forma um núcleo cercado por uma barreira de difusão inerte. Esses sistemas incluem membranas, cápsulas, microcápsulas, lipossomos e fibras ocas. Alternativamente, o dispositivo pode ser um dispositivo monolítico em que o agente ativo é disperso ou dissolvido em um polímero inerte. A difusão através da

matriz polimérica é a etapa de limitação de taxa e as taxas de liberação são determinadas em parte pela escolha de polímero e seu efeito consequente no coeficiente de partição e difusão do agente a ser liberado.

[0152] Em sistemas quimicamente controlados típicos, um polímero degrada com o tempo e libera um agente em uma quantidade proporcional à erosão gradual. O controle químico pode ser atingido com o uso de cadeias passíveis de bioerosão ou pendentes. Em um sistema passível de bioerosão, o agente é distribuído de modo ideal e uniforme por todo um polímero da mesma forma que em sistemas de difusão monolítica. Conforme o polímero que circunda o agente é erodido, o agente escapa. Em um sistema de cadeia pendente, o agente é ligado de modo covalente ao polímero e é liberado por cisão de ligação pertencente a água ou enzimas.

[0153] Em sistemas controlados ativados por solvente típicos, o agente ativo é dissolvido ou disperso dentro de uma matriz polimérica e não pode difundir através dessa matriz. A pressão osmótica é usada como a força de acionamento para a liberação do agente. Em um tipo de sistema controlado por solvente, conforme o fluido ambiental (por exemplo, água) penetra a matriz, o polímero (por exemplo, um hidrogel) se expande e sua temperatura de transição de vidro é reduzida abaixo da temperatura

ambiental (hospedeiro). Assim, o polímero expandido está em um estado elástico e permite que o fármaco contido em seu interior difunda através do encapsulante.

[0154] A ligação química de um agente bioativo a um polímero pode ser realizada de diversas formas com base em diferentes métodos de síntese bem conhecidos por aqueles versados na técnica, incluindo: reação em polímeros pré-formados; reações em polímeros de ocorrência natural; polimerização de monômeros de vilina que contêm o ingrediente ativo; e polimerizações de proliferação em etapa. Quando o agente bioativo é quimicamente ligado a um polímero, a ligação deve ser clivada por uma reação química - tipicamente enzimática, hidrolítica, térmica ou fotoquímica. Uma variedade de variáveis químicas e físicas pode afetar a taxa de clivagem de ligação e liberação subsequente de materiais ligados quimicamente de polímeros que incluem a natureza do osso lábil, comprimento do grupo espaçados, peso molecular, hidrofiliicidade, efeitos de grupo vizinho, fatores ambientais e forma e dimensões físicas.

[0155] Em aplicações anti-incrustação, revestimentos anti-incrustação de autopolimento são conhecidos na técnica. Tais revestimentos são tipicamente à base de polímeros de metacrilato de tributilestano, metacrilato de metila e monômeros de suavização de filme

tal como acrilato de 2-etilhexila. Um polímero de organoestanho tipicamente atua como o ligante de tinta. Tais tintas podem também conter um aditivo tóxico tal como óxido cúprico ou um composto de organoestanho. Adicionalmente, os aditivos de tinta usuais tal como pigmentos, agentes tixotrópicos podem estar também presentes. Em água do mar normalmente alcalina, o ligante de organoestanho polimérico é gradualmente hidrolisado e o tributilestanho é liberado em uma forma que é um anti-incrustante ativo. O polímero hidrolisado formado é solúvel em água ou expansível em água e é facilmente removido por erosão da superfície por movimento da água do mar, expondo uma superfície fresca de tinta.

[0156] Aqueles versados na técnica perceberão facilmente que os sistemas e métodos de entrega descritos acima não meramente exemplos de métodos e sistemas adequados que podem ser empregados na presente invenção. Quaisquer outros carreadores e sistemas de entrega adequados podem ser empregados para atingis o meio desejado de aplicação de agentes de acordo com modalidades da presente invenção.

[0157] Os exemplos de diluentes farmacêuticamente aceitáveis são água destilada ou desmineralizada; solução salina; óleos de base vegetal tal como óleo de amendoim, óleo de girassol, óleo de oliva, óleo de semente de

algodão, óleo de milho, óleos de gergelim tal como óleo de amendoim, óleo de amendoim, óleo de oliva, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleo de gergelim, óleo de amendoim ou óleo de coco; óleos de silicone, incluindo polisiloxanos, tal como metil polisiloxano, fenil polisiloxano e metilfenil polisiloxano; silicones voláteis; óleos minerais tal como parafina líquida, parafina mole ou esqualano; derivados de celulose tal como metil celulose, etil celulose, carboximetilcelulose, carboximetilcelulose ou hidroxipropilmetilcelulose sódica; alcanóis inferiores, por exemplo, etanol ou isopropanol; aralcanóis inferiores; polialquilenoglicóis inferiores ou alquilenoglicóis inferiores, por exemplo, polietilenoglicol, polipropilenoglicol, etilenoglicol, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol ou glicerina; ésteres de ácido graxo tal como palmitato de isopropila, miristato de isopropila ou oleato de etila; polivinilpirridona; ágar; carragena; goma tragacante ou goma acácia e vaselina. Tipicamente, o carreador ou carreadores formarão de 1% a 99,9% em peso das composições.

[0158] Para aplicações farmacêuticas, as composições podem ser formuladas para entrega por qualquer via, por exemplo, oral, tópica, intracavidade, intravesical, intramuscular, intra-arterial, intravenosa ou subcutânea.

[0159] Aqueles versados na técnica perceberão que os aspectos e modalidades descritos no presente documento são suscetíveis a variações e modificações outras que aquelas especificamente descritas. Deve-se entender que a revelação inclui todas tais variações e modificações. A revelação também inclui todas as etapas, recursos, composições e compostos referidos ou indicados neste relatório descritivo, individual ou coletivamente, e qualquer e todas as combinações de quaisquer duas ou mais etapas ou recursos.

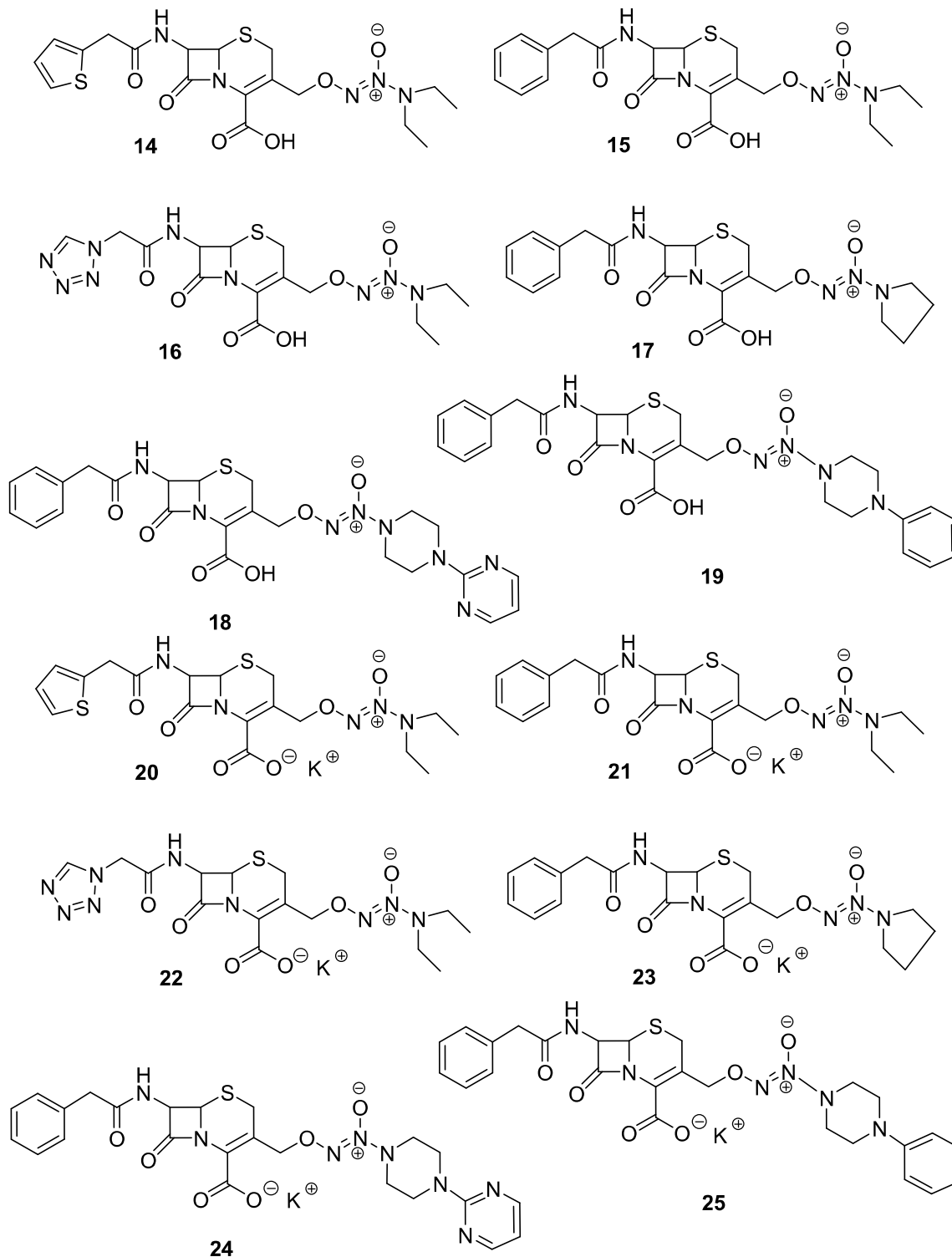
[0160] A citação de qualquer referência no presente documento deve ser interpretada como uma admissão de que tal referência está disponível como "Técnica Anterior" ao presente pedido. Ademais, a referência neste relatório descritivo a qualquer publicação anterior (ou informações derivadas do mesmo) ou a qualquer matéria que é conhecida não é e não deve ser entendida como um reconhecimento ou admissão ou qualquer forma de sugestão de que a publicação anterior (ou informações derivadas da mesma) ou matéria conhecida forma parte do conhecimento geral comum no campo de esforço ao qual este relatório descritivo refere-se.

[0161] A presente revelação é ainda descrita em referência aos seguintes exemplos não limitantes.

Exemplos

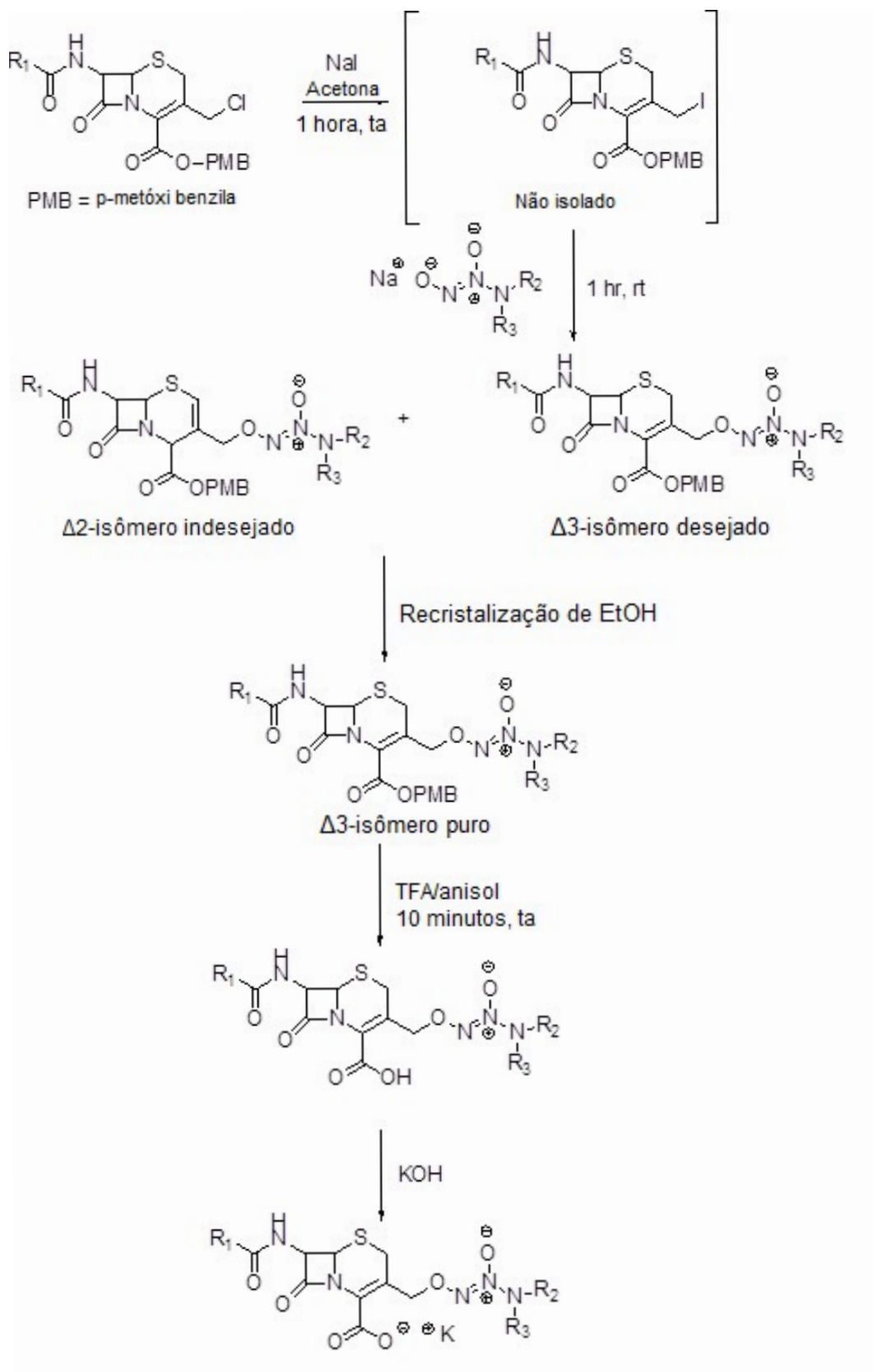
[0162] **Exemplo 1: Síntese de compostos**

[0163] Os seguintes compostos representativos de fórmula (I) foram sintetizados:



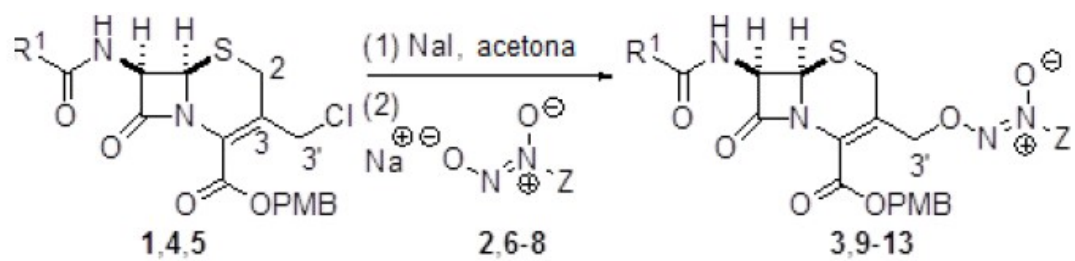
[0164] Os compostos foram sintetizados de acordo

com o Esquema 4:



Esquema 4: Esquema geral para a preparação de compostos representativos de fórmula (I).

[0165] A primeira etapa na síntese de compostos **14** a **25** envolveu a preparação de cefalosporin-3'-diazeniodiolatos **3** e **9** a **13** por reação de cefalosporinas protegidas por PMB funcionalizadas apropriadamente **1**, **4** e **5** com diazeniodiolatos funcionalizados apropriadamente **2** e **6** a **8**, conforme mostrado abaixo:



	Material de partida, R ¹	Diazeniodiolato de sódio, Z	Produto	Rendimento % ^a
1		2 NEt ₂	3	85
4		2 NEt ₂	9	75 ^b
5		2 NEt ₂	10	14 ^c
4		6	11	66
4		7	12	39
4		8	13	80

^arendimento isolado de Δ²-isômero, ^bΔ³-isômero tipicamente isolado em rendimento de aproximadamente 5%, ^c42% de Δ³-isômero puro isolado.

[0166] O composto **3** foi preparado utilizando o seguinte método.

[0167] Iodeto de sódio (0,912 g, 6,08 mmoles) foi adicionado a uma suspensão do éster de cefalosporina protegido por PMB **1** (3,00 g, 6,08 mmoles) em acetona anidra (25 ml) sob N₂ e a mistura foi agitada no escuro à temperatura ambiente por 1 hora. (*Z*)-1-(*N,N*-dietilamino)diazen-1-ium-1,2-diolato de sódio **2** (0,944 g, 6,08 mmoles) foi então adicionado de uma vez e a mistura agitada à temperatura ambiente por mais 1,5 hora (análise TLC; Pet Spirit:EtOAc 7:3). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo diluído com CH₂Cl₂ (75 ml) e lavado com tiosulfato de sódio aquoso a 10% (2 x 40 ml) e água (1 x 40 ml). A fração orgânica foi seca sobre MgSO₄ anidro e concentrada *in vacuo*. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de gel de sílica (Pet. Spirit:EtOAc, 7:3) e recristalizado a partir de EtOH ou MeOH para gerar **3** (3,04 g, 85%) como um pó amarelo pálido. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7,32 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,26 (d, 1H, *J* = 5 Hz), 7,00 e 6,96 (m, 2H), 6,89 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 6,34 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 5,81 (dd, 1H, *J* = 10, 4,5 Hz), 5,34 e 4,99 (ABq, 2H, *J* = 14,5 Hz), 5,18 (s, 2H), 4,90 (d, 1H, *J* = 5 Hz), 3,84 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,52 e 3,44 (ABq, 2H, *J* = 18,5 Hz), 3,11 (q, 4H, *J* = 7,5 Hz), 1,05 (t, 6H, *J* = 7,5 Hz). RMN de ¹³C (500 MHz, CDCl₃):

δ 169,8, 164,4, 161,2, 159,9, 134,6, 130,6, 127,8, 127,5, 126,6, 126,4, 126,0, 125,4, 113,9, 71,9, 68,1, 59,2, 57,4, 55,2, 48,3, 37,1, 25,9 11,5. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.275, 1.754, 1.706, 1.648, 1.517, 1.362, 1.248, 1.177, 1.096, 1027, 822. M.P 166 °C. $[\alpha]_D$ ($c = 1.0$, CHCl_3) = +39,0. ESI-HRMS (m/z) Calculado para 588,1592 $[\text{M} - \text{H}]^- \text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2^-$, Encontrado 588,1550.

[0168] Os Compostos **9** a **13** foram preparados com o uso do mesmo método por seleção de cefalosporinas e diazeniodiolatos protegidos por PMB funcionalizados apropriadamente. Os dados espectroscópicos para os compostos **9** a **13** são apresentados abaixo.

[0169] *Composto 9*

[0170] RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,36 e 7,24 (m, 7H), 6,88 (d, 2H, $J = 9$ Hz), 6,08 (d, 1H, $J = 10$ Hz), 5,81 (dd, 1H, $J = 10, 4,5$ Hz), 5,33 e 4,98 (ABq, 2H, $J = 14$ Hz), 5,17 (s, 2H), 4,88 (d, 1H, $J = 5$ Hz), 3,79 (s, 3H), 3,67 e 3,62 (ABq, 2H, $J = 9$ Hz), 3,44 e 3,42 (ABq, 2H, $J = 18$ Hz), 3,10 (q, 4H, $J = 7$ Hz), 1,05 (m, 6H, $J = 7$ Hz). RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3): 171,1, 164,6, 161,2, 159,9, 133,6, 130,7, 129,4, 129,2, 127,8, 126,7, 126,4, 125,5, 114,0, 72,0, 68,1, 59,2, 57,5, 55,2, 48,4, 43,3, 26,0, 11,5. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.284, 1.778, 1.726, 1.660, 1.519, 1.352, 1.228, 1.187, 1.030, 982, 818, 716, 699, 679. M.P 126 a 128 °C, $[\alpha]_D$ ($c = 1,0$, CH_2Cl_2) = +76,9, ESI-HRMS (m/z) Calculado

para 584,2179 [M + H]⁺ C₂₈H₃₄N₅O₇S, Encontrado 584,2205.

[0171] *Composto 10*

[0172] RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OCD₃): δ 8,90 (s, 1H), 8,26 (d, 1H, *J* = 6 Hz), 7,30 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 6,86 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 5,78 (q, 1H, *J* = 5 Hz), 5,32 e 5,27 (ABq, 2H, *J* = 16,5 Hz), 5,18 (s, 2H), 5,17 e 5,02 (ABq, 2H, *J* = 13 Hz), 4,95 (d, 1H, *J* = 5 Hz), 3,78 (s, 3H), 3,56 e 3,51 (ABq, 2H, *J* = 19 Hz), 3,14 (q, 4H, *J* = 7 Hz), 1,05 (t, 6H, *J* = 7 Hz). RMN de ¹³C (125 MHz, CD₃OD): δ 166,3, 164,4, 161,5, 160,2, 144,5, 130,0, 126,8, 126,6, 126,3, 114,2, 72,1, 68,5, 59,7, 57,5, 55,5, 50,1, 48,4, 26,5, 11,7. FTIR (cm⁻¹, Puro): 3.290, 3.137, 2.973, 2.902, 1.771, 1.702, 1.662, 1.556, 1.378, 1.233, 1.170, 1.094, 1.049, 801. M.P 171 °C, [α]_D (c = 1,0, acetona) = -51,9, ESI-HRMS (*m/z*) Calculado para 574,1838 [M - H]⁻ C₂₃H₂₈N₉O₇S⁻, Encontrado 574,1830.

[0173] *Composto 11*

[0174] RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7,36 (m, 2H), 7,32 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,26 (m, 3H), 6,88 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz), 6,05 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 5,82 e 5,80 (dd, 1H, *J* = 4,5, 5 Hz), 5,21-5,15 (m, 3H), 4,91 (d, 1H, *J* = 4,4 Hz), 4,87 (d, 1H, *J* = 13,5 Hz), 3,80 (s, 3H), 3,68 e 3,62 (ABq, 2H, *J* = 16 Hz), 3,52 e 3,43 (ABq, 2H, *J* = 18,5 Hz), 3,46 (t, 4H, *J* = 7 Hz), 1,91 (t, 4H, *J* = 7 Hz). RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃): 171,0, 164,7, 161,3, 159,9, 133,5, 130,6,

129,4, 129,2, 127,8, 126,8, 126,7, 125,3, 114,0, 71,4, 68,0, 59,1, 57,4, 55,2, 50,7, 43,3, 26,1, 22,8. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.265, 2.965, 2.162, 2.030, 1.756, 1.714, 1.652, 1.612, 1.536, 1.486, 1.446, 1.392, 1.266, 1.244, 1.217, 1.180, 1.013, 986. M.P 157 °C. $[\alpha]_D$ ($c = 1,0$, MeOH) = +20,6. ESI-HRMS (m/z) Calculado para 580,1871 $[\text{M} - \text{H}]^-$ $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}^-$, Encontrado 580,1895.

[0175] *Composto 12*

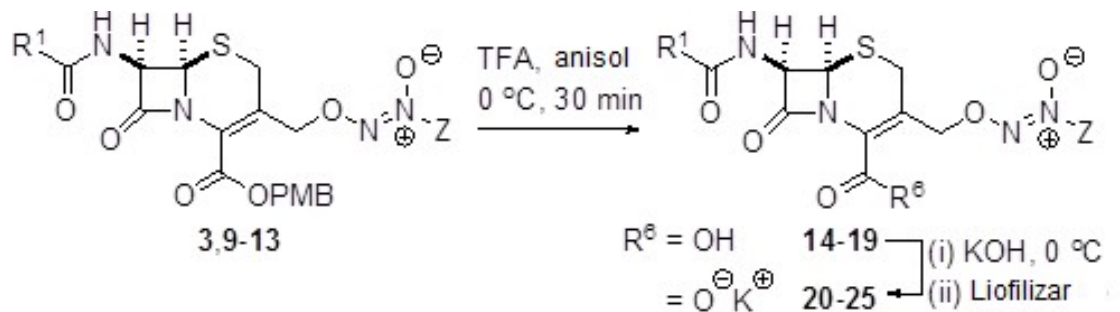
[0176] RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 8,33 (d, 2H, $J = 4,5$ Hz), 7,39 e 7,26 (m, 5H), 7,32 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 6,88 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 6,56 (t, 1H, $J = 2$ Hz), 6,18 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 5,82 (q, 1H, $J = 5$ Hz), 5,24 e 4,95 (ABq, 2H, $J = 13,5$ Hz), 5,18 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz), 4,91 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz), 3,98 (t, 4H, $J = 4,5$ Hz), 3,78 (s, 3H), 3,66 e 3,61 (ABq, 2H, $J = 16$ Hz), 3,53 e 3,40 (ABq, 2H, $J = 18,5$ Hz), 3,41 (t, 4H, $J = 4,5$ Hz). RMN de ^{13}C (500 MHz, CDCl_3): δ 171,0, 164,7, 161,3, 159,9, 157,8, 133,6, 130,7, 129,4, 129,2, 127,7, 126,6, 125,8, 125,7, 113,9, 110,7, 71,8, 68,1, 59,2, 57,4, 55,2, 50,9, 43,3, 42,3, 26,1. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.286, 3.137, 2.976, 2.908, 2.904, 1.772, 1.702, 1.662, 1.557, 1.411, 1.377, 1.232, 1.049. $[\alpha]_D$ ($c = 1,0$, MeOH) = +39,5. ESI-HRMS (m/z) Calculado para 675,2344 $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_7\text{S}^+$, Encontrado 675,2373. M.P 136 °C.

[0177] *Composto 13*

[0178] RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,36 e 7,24

(m, 6H), 6,93 e 6,91 (m, 2H), 6,88 (d, 2H, $J = 9$ Hz), 6,16 (m, 1H), 5,81 (q, 1H, $J = 5$ Hz), 5,24 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz), 5,21 (s, 2H), 5,17 e 4,96 (ABq, 2H, $J = 12$ Hz), 4,91 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz), 3,78 (s, 3H), 3,67 e 3,58 (ABq, 2H, $J = 16$ Hz), 3,53 e 3,40 (ABq, 2H, $J = 18,5$ Hz), 3,51 (m, 4H), 3,29 (m, 4H). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 171,3, 164,9, 161,5, 160,2, 150,4, 133,8, 130,9, 129,6, 129,5, 129,4, 127,9, 126,9, 126,0, 121,0, 116,8, 114,2, 72,0, 68,4, 59,4, 57,7, 55,4, 51,1, 48,4, 43,5, 26,1. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.389, 3.286, 3.197, 3.030, 2.897, 1.756, 1.647, 1.607, 1.546, 1.492, 1.448, 1.384, 1.351, 1.224, 1.004. $[\alpha]_D$ ($c = 1,0$, MeOH) = +54,3, ESI-HRMS (m/z) Calculado para 673,2439 $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}^+$, Encontrado 673,2409. M.P 106 °C.

[0179] Os cefalosporin-3'- diazeniodiolatos protegidos por PMB (**3** e **9** a **13**) foram então desprotegidos com o uso de ácido trifluoroacético puro para gerar os ácidos carboxílicos livres.



Ester	R ¹	Z	R ⁶ = OH R ⁶ = O [⊖] K [⊕]	
			Rendimento %	Rendimento %
3		NEt ₂	14,36	20,99
9		NEt ₂	15,80	21,99
10		NEt ₂	16,81	22
11			17,83	23,98
12			18,93	24,94
13			19,67	25

[0180] O Composto **14** foi preparado utilizando o seguinte método.

[0181] O cefalosporin-3'-diazeniiodiolato protegido por PMB **3** (1,00 g, 1,69 mmol) e anisol anidro (0,55 g, 5,09 mmoles) foram agitados a 0 °C por 30 minutos com ácido trifluoroacético (4,0 ml) após os quais a mistura foi vertida lentamente em gelo triturado (aproximadamente 100 g). Mediante fusão, a mistura aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3 x 70 ml) e os extratos orgânicos combinados foram secos sobre MgSO₄ anidro e concentrados sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (EtOAc:MeOH:H₂O, 85:15:0,5) para fornecer o ácido livre de cefalosporin-3'- diazeniiodiolato **14** (0,285 g, 36%) com um pó amarelo pálido. RMN de ¹H (500

MHz, CD₃OD): δ 7,26 (s, 1H, $J = 1$ Hz), 6,96 e 6,92 (m, 2H), 5,73 (d, 1H, $J = 5$, Hz), 5,29 e 5,07 (ABq, 2H, $J = 12,9$ Hz), 5,05 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz), 3,83 e 3,79 (ABq, 2H, $J = 15$ Hz), 3,62 e 3,53 (ABq, 2H, $J = 18$ Hz), 3,16 (q, 4H, $J = 7,0$ Hz), 1,04 (t, 6H, $J = 7,0$ Hz). RMN de ¹³C (500 MHz, CD₃OD): δ 173,3, 166,1, 164,5, 137,4, 130,2, 128,4, 127,7, 126,9, 125,8, 73,0, 60,8, 59,0, 49,0, 37,1, 27,1, 11,7. FTIR (cm⁻¹, Puro): 3.275, 2.156, 1.754, 1.661, 1.656, 1.522, 1.320, 1.235, 1.065, 995. M.P 87 °C, $[\alpha]_D$ ($c = 1,0$, MeOH) = +84,4, ESI-HRMS (m/z) Calculado para 468,1017 [M - H]⁻ C₁₈H₂₂N₅O₆S₂⁻, Encontrado 468,0996.

[0182] Os compostos **15** a **19** foram preparados com o uso desse método. Os dados espectroscópicos para os compostos **15** a **19** são apresentados abaixo.

[0183] *Composto 15*

[0184] RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD): δ 7,35 e 7,26 (m, 5H), 5,75 (d, 1H, $J = 4,8$, Hz), 5,36 e 5,07 (ABq, 2H, $J = 12,9$ Hz), 5,05 (d, 1H, $J = 4,8$ Hz), 5,03 (m, 1H), 3,68 e 3,45 (m, 4H), 3,19 (q, 4H, $J = 7,0$ Hz), 1,07 (t, 6H, $J = 7,0$ Hz). RMN de ¹³C (500 MHz, CD₃OD): δ 175,4, 167,3, 166,6, 137,2, 132,1, 131,0, 130,4, 128,8, 123,0, 74,6, 61,5, 59,8, 50,1, 44,0, 27,7, 12,6. FTIR (cm⁻¹, Puro): 3.287, 1.780, 1.663, 1.505, 1.337, 1.223, 998, 618. M.P 84 a 86 °C, $[\alpha]_D$ ($c = 1,0$, CH₂Cl₂) = +19,4, ESI-HRMS (m/z) Calculado para 462,1453 (C₂₀H₂₄N₅O₆S) [M - H]⁻, Encontrado 462,1465.

[0185] *Composto 16*

[0186] RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OCD_3): δ 9,40 (d, 1H, $J = 6$ Hz), 9,11 (s, 1H), 5,72 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 5,29 (s, 2H), 5,22 e 4,99 (ABq, 2H, $J = 22$ Hz), 5,01 (s, 1H), 3,52 e 3,49 (ABq, 2H, $J = 19$ Hz), 3,10 (q, 4H, $J = 7$ Hz), 0,95 (t, 6H, $J = 7$ Hz). RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): δ 167,4, 165,8, 164,4, 146,0, 128,1, 127,5, 72,9, 60,6, 58,7, 50,3, 49,3, 27,1, 11,7. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.282, 3.136, 2.975, 2.875, 1.773, 1.703, 1.662, 1.559, 1.414, 1.227, 1.170, 1.026, 800. M.P 156 °C. $[\alpha]_{\text{D}}$ ($c = 1,0$, MeOH) = +117,3, ESI-HRMS (m/z) Calculado para 454,1263 $[\text{M} - \text{H}]^-$ $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_9\text{O}_6\text{S}^-$, Encontrado 454,1266.

[0187] *Composto 17*

[0188] RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 7,30 e 7,22 (m, 5H), 5,72 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 5,23 e 4,97 (ABq, 2H, $J = 22,5$ Hz), 5,07 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 3,64 e 3,50 (m, 4H), 3,50 (t, 4H, $J = 7$ Hz), 1,93 (t, 4H, $J = 7$ Hz). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): 174,5, 166,2, 164,5, 136,4, 130,4, 129,5, 127,9, 127,6, 72,5, 60,7, 59,1, 51,5, 43,1, 27,2, 23,7. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.296, 1.756, 1.729, 1.642, 1.530, 1.469, 1.429, 1.388, 1.318, 1.141, 1.028, 944. $[\alpha]_{\text{D}}$ ($c = 1,0$, MeOH) = 122,8, ESI-HRMS (m/z) Calculado para 484,1261 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{NaO}_6\text{S}^+$, Encontrado 484,1281. M.P 146 °C.

[0189] *Composto 18*

[0190] RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OCD_3): δ 8,37 (s, 2H),

7,34 e 7,23 (m, 5H), 6,65 (s, 1H), 5,84 (s, 1H), 5,24 e 4,97 (ABq, 2H, $J = 7,8$ Hz), 5,14 (s, 1H), 3,97 (s, 4H), 3,69 e 3,41 (m, 4H), 3,46 (s, 4H). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 172,1, 166,4, 164,0, 163,0, 159,5, 137,5, 130,9, 129,9, 128,0, 126,7, 111,9, 72,8, 61,5, 58,2, 52,0, 43,3, 42,3, 26,1. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.286, 3.137, 2.976, 2.908, 2.904, 1.772, 1.702, 1.662, 1.557, 1.411, 1.232, 1.049. $[\alpha]_D$ ($c = 1,0$, MeOH) = +36,6, ESI-HRMS (m/z) Calculado para 555,1769 $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}^+$, Encontrado 555,1799. M.P 116 °C.

[0191] *Composto 19*

[0192] RMN de ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3): δ 8,05 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz), 7,36 e 7,23 (m, 8H), 7,02 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 6,84 (t, 1H, $J = 7,5$), 5,85 (q, 1H, $J = 5$ Hz), 5,25 e 5,01 (ABq, 2H, $J = 13,5$ Hz), 5,14 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz), 3,70 e 3,58 (m, 4H), 3,55 (m, 4H), 3,35 (m, 4H). RMN de ^{13}C (500 MHz, CD_3COCD_3): 171,6, 165,8, 163,1, 151,5, 136,5, 130,0, 129,8, 129,1, 127,4, 125,9, 120,7, 117,2, 72,2, 60,3, 58,5, 51,6, 48,7, 42,9, 26,7. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.397, 3.286, 3.197, 3.028, 2.897, 1.755, 1.647, 1.607, 1.548, 1.492, 1.448, 1.383, 1.351, 1.225, 1.004, 985. $[\alpha]_D$ ($c = 1,0$, MeOH) = +57,7 ESI-HRMS (m/z) Calculado para 553,1864 $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}^+$, Encontrado 553,1847. M.P 96 °C.

[0193] Os compostos **14**, **15**, **17** e **18** foram então convertidos em seus sais de potássio. O composto **20** foi

preparado utilizando o seguinte método.

[0194] Ácido livre de cefalosporin-3'-diazeniodiolato **14** (0,20 g, 0,42 mmol) foi suspenso em H₂O (1,0 ml) a 0 °C ao qual foi então adicionada uma solução aquosa resfriada por gelo de KOH (0,023 g em 100 µl de H₂O, 0,42 mmol). Uma solução amarela pálida foi rapidamente formada e a agitação continuou por mais 20 minutos a 0 °C. A solução aquosa foi lavada com CH₂Cl₂ (2 x 2 ml) e então congelada e liofilizada para fornecer o sal de carboxilato de cefalosporin-3'-diazeniodiolato de potássio **20** (0,21 g, 99 %) como um pó amarelo pálido. RMN de ¹H (300 MHz, D₂O): δ 7,21 (d, 1H, *J* = 10 Hz), 6,89-6,88 (s, 2H), 5,49 (d, 1H, *J* = 4,5, Hz), 5,08 e 4,85 (ABq, 2H, *J* = 12,6 Hz), 4,96 (d, 1H, *J* = 4,8 Hz), 3,81 e 3,74 (ABq, 2H, *J* = 15 Hz), 3,46 e 3,25 (ABq, 2H, *J* = 18 Hz), 2,96 (q, 4H, *J* = 7,0 Hz), 0,85 (t, 6H, *J* = 7,0 Hz). RMN de ¹³C (125 MHz, D₂O): δ 174,4, 168,3, 164,7, 135,8, 132,9, 127,6, 127,5, 125,9, 115,4, 73,9, 59,4, 57,7, 49,0, 36,2, 25,5, 10,7. FTIR (cm⁻¹, Puro): 3.395, 3.326, 3.210, 2.883, 2.816, 1.600, 1.369, 1.233, 1.034. [α]_D (c = 1,0, MeOH) = +90,9, ESI-HRMS (*m/z*) Calculado para 508,0721 [M + H]⁺ C₁₈H₂₃N₅O₆S₂K⁺, Encontrado 508,0742.

[0195] Os compostos **21**, **23** e **24** foram preparados com o uso desse mesmo método. Os dados espectroscópicos para os compostos **21**, **23** e **24** são apresentados abaixo.

[0196] *Composto 21*

[0197] RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ 7,30-7,20 (m, 5H), 5,65 (d, 1H, $J = 4,8$, Hz), 5,35 e 4,85 (ABq, 2H, $J = 12,0$ Hz), 4,98 (d, 1H, $J = 4,8$, Hz), 3,60 e 3,55 (ABq, 2H, $J = 14\text{Hz}$), 3,57 e 3,37 (ABq, 2H, $J = 18$ Hz), 3,15 (q, 4H, $J = 7,0$ Hz), 1,04 (t, 6H, $J = 7,0$ Hz). RMN de ^{13}C (500 MHz, CD_3OD): δ 174,6, 168,7, 165,3, 136,5, 134,5, 130,2, 129,6, 128,0, 116,9, 74,7, 60,4, 58,9, 49,4, 43,1, 26,8, 11,8. IR (cm^{-1} , Puro): 3.395, 1.765, 1.609, 1.495, 1.345, 1.248, 997, 679. M.P 35 a 37 $^\circ\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}$ ($c = 1,0$, CH_2Cl_2) = + 19,0, ESI-HRMS (m/z) Calculado para 502,1157 $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{KN}_5\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, Encontrado 502,1163.

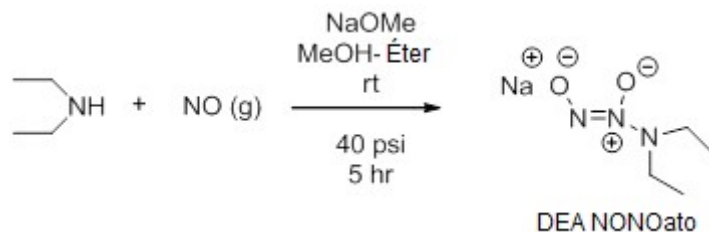
[0198] *Composto 23*

[0199] RMN de ^1H (500 MHz, D_2O): δ 7,35 e 7,2 (m, 5H), 5,53 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 5,05 e 4,72 (ABq, 2H, $J = 12$ Hz), 4,99 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 3,62-3,58 (m, 2H), 3,50 e 3,30 (ABq, 2H, $J = 13$ Hz), 3,4 (m, 4H), 1,82 (m, 4H). RMN de ^{13}C (125 MHz, D_2O): δ 175,5, 168,4, 164,9, 135,0, 132,3, 129,3, 129,1, 127,9, 116,5, 72,9, 59,2, 58,0, 51,6, 42,3, 25,8, 22,5. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.399, 3.283, 3.194, 2.976, 2.980, 2.897, 1.758, 1.648, 1.609, 1.542, 1.492, 1.451, 1.386, 1.351, 1.224, 1.001. $[\alpha]_{\text{D}}$ ($c = 1,0$, MeOH) = -390,3. ESI-HRMS (m/z) Calculado para 500,1001 $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{KN}_5\text{O}_6\text{S}^+$, Encontrado 500,1015.

[0200] *Composto 24*

[0201] RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ 8,33 (s, 2H), 7,39 e 7,26 (m, 5H), 7,32 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 6,56 (t, 1H, $J = 2$ Hz), 5,63 (d, 1H, $J = 5$ Hz), 5,24 e 4,95 (ABq, 2H, $J = 13,5$ Hz), 5,18 (d, 2H, $J = 2,5$ Hz), 4,91 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz), 3,98 (m, 4H, $J = 4,5$ Hz), 3,66 e 3,61 (ABq, 2H, $J = 16$ Hz), 3,53 e 3,40 (ABq, 2H, $J = 18,5$ Hz), 3,41 (t, 4H, $J = 4,5$ Hz). RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD): 171,0, 164,7, 161,3, 159,9, 157,8, 133,6, 130,7, 129,4, 129,2, 127,7, 126,6, 125,8, 125,7, 113,9, 110,7, 71,8, 68,1, 59,2, 57,4, 55,2, 50,9, 43,3, 42,3, 26,1. FTIR (cm^{-1} , Puro): 3.394, 3.282, 3.190, 3.034, 2.980, 2.894, 1.756, 1.645, 1.609, 1.543, 1.492, 1.448, 1.352, 1.224, 994. $[\alpha]_{\text{D}}$ ($c = 1,0$, MeOH) = -190,6, ESI-HRMS (m/z) Calculado para 593,1328 $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{KN}_8\text{O}_6\text{S}^+$, Encontrado 593,1366.

[0202] diazeniodiolatos **2** e **6** a **8** podem ser preparados de acordo com os procedimentos da literatura. A título de exemplo, o composto **2** foi preparado conforme segue.



(Referência: K. R. A. Abdellatif *et al.* / *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 6.796 a 6.801).

[0203] Dietilamina (7,3 g, 0,1 mol) foi adicionada

a uma solução de NaOMe (0,1 mol, 24 ml de uma solução a 25% em peso/volume em MeOH) e éter dietílico (300 ml) com agitação a 25 °C. Essa mistura foi purgada com argônio seco por 5 minutos e então a reação foi pressurizada sob atmosfera de óxido nítrico (pressão interna de 0,28 MPa (40 psi)) com agitação a 25 °C por 5 horas. O produto, que precipitou como um pó branco fino, foi isolado por filtração, suspenso em éter dietílico (100 ml) e agitado por 15 minutos. A suspensão foi filtrada e o sólido coletado foi seco a 25 °C sob pressão reduzida até um peso constante ter sido obtido. 1-(*N,N*-dietilamino)diazen-1-ium-1,2-diolato de O²-sódio (DEA NONOato) foi proporcionado como um pó branco fino (4,0 g, 26%). O produto foi armazenado em garrafas com cor de âmbar a -20 °C sob atmosfera de argônio e usado sem purificação adicional. RMN de ¹H (D₂O) δ 1,12 (t, *J* = 7,3 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂), 2,93 [q, *J* = 7,3 Hz, 4H, N(CH₂CH₃)₂]. m.p. 200 a 202 °C.

[0204] Exemplo 2: Liberação de óxido nítrico de compostos 14 a 19 *in vitro* e por extratos de *P. aeruginosa*

[0205] A liberação de óxido nítrico de compostos **14** a **19** foi detectada com o uso da sonda específica de óxido nítrico ISO-NOP com um analisador Apollo 4000 (World Precision Instruments). A sonda de óxido nítrico, que foi calibrada recentemente com o uso de uma solução de SNAP de acordo com as instruções do fabricante, foi imersa em um

conceptáculo que contém tampão Tris a pH 7,0 e agitada continuamente à temperatura ambiente. Vários reagentes foram adicionados com sucesso enquanto os níveis de óxido nítrico foram monitorados.

[0206] Referindo-se à Figura 1, concentrações de μM baixas de óxido nítrico foram mostradas sendo liberadas de todos os ácidos livres de cefalosporin-3'- diazeniodiolato **14 a 19** quando expostos em tampão aquoso (pH 7) a uma β -lactamase comercialmente disponível (penicilinase, Sigma Aldrich). A liberação de óxido nítrico poderia não ser detectada quando a enzima foi adicionada sem cefalosporin-3'- diazeniodiolato (dados não mostrados). Similarmente, quando cefalotina sozinha (proximamente relacionada à estrutura principal de antibiótico de β -lactama dos cefalosporin-3'- diazeniodiolatos) foi usada ao invés de um cefalosporin-3'- diazeniodiolato, nenhuma liberação de óxido nítrico foi observada na presença ou ausência de penicilinase (dados não mostrados).

[0207] A liberação de óxido nítrico por clivagem de composto **15** foi estudada adicionalmente com o uso de extratos de *P.aeruginosa* que produzem β -lactamase. As células de *P. aeruginosa* foram proliferadas na presença de concentrações subinibitórias de ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) para induzir a atividade de β -lactamase. As células de *P. aeruginosa* que produzem β -lactamase sofreram então lise com

o uso de reagentes CelLytic (Sigma) e extratos celulares foram adicionados a uma solução de 10 ml de composto **15** enquanto a produção de óxido nítrico é monitorada com o uso de eletrodo de óxido nítrico. A Figura 2a mostra que a liberação de óxido nítrico de composto **15** acionada por penicilinase varia ligeiramente entre pH 5 e 7, enquanto em pH 9, a liberação de óxido nítrico é consideravelmente reduzida. A Figura 2b mostra que o óxido nítrico é liberado do composto **15** após o tratamento com extratos celulares de *P. aeruginosa* que expressam β -lactamase e que uma liberação menor ainda mensurável de óxido nítrico do composto **15** ocorre mediante tratamento com células de *E. coli* que expressam não β -lactamase. Isso sugere que as bactérias formadoras de biofilme que não expressam β -lactamase podem também induzir a dispersão por acionamento de cefalosporin-3'- diazeniodiolatos para liberar óxido nítrico, possivelmente por meio de reação com transpeptidases, o alvo principal de antibióticos de cefalosporina bactericidas.

[0208] Pode esperar que os cefalosporin-3'- diazeniodiolatos liberem óxido nítrico melhor se as bactérias de biofilme que são alvejadas secretarem β -lactamases extracelulares, em oposição à expressão de β -lactamases que estão mais tipicamente localizadas no espaço periplásmico de células, que em biofilmes poderiam tornar

as enzimas potencialmente inacessíveis aos compostos. A Figura 2c mostra que *P. aeruginosa* pode ser induzido a expressar β -lactamases extracelulares que acionam a liberação de óxido nítrico do composto **15** por pré-tratamento com o antibiótico de β -lactama imipenem. A mesma indução de β -lactamase extracelular não é aparente com todos os antibióticos de β -lactama, conforme evidenciado na Figura 2c pela falha de ampicilina para induzir a expressão. Assim, o pré-tratamento com imipenem proporciona expressão de β -lactamase extracelular, que subsequentemente leva à liberação de óxido nítrico aumentada dos cefalosporin-3'- diazeniodiolatos.

[0209] Exemplo 3: Indução de liberação de óxido nítrico do composto 21 em células de *P.aeruginosa*

[0210] Para estudar a liberação de óxido nítrico em células intactas de *P. aeruginosa*, a cepa repórter de *P. aeruginosa* NSGFP foi usada (Barraud *et al.*, 2009). Essa cepa abriga um construto repórter de gene que expressa proteína fluorescente verde (GFP) quando o gene *nirS* induzível por óxido nítrico é expresso. As células de *P. aeruginosa* NSGFP foram proliferadas com ou sem ampicilina em concentração subinibitórias (50 μ g/ml) para induzir a atividade de β -lactamase. Aliquotas de 3 ml de cultura bacteriana foram então incubadas com o composto **21**, o doador de óxido nítrico conhecido nitroprussídeo de sódio

(SNP), cefalotina (Sigma n° de ref C4520) ou penicilinase por 2 horas, antes de medir a fluorescência GFP de células NSGFP.

[0211] Conforme mostrado na Figura 3, o composto **21** (150 μ M) sozinho induziu uma resposta por GFP maior que a resposta acionada por SNP em células de *P. aeruginosa* com ou sem pré-ativação de atividade de β -lactamase. Além disso, a clivagem de composto **21** e a disponibilidade de óxido nítrico às bactérias foram acentuadas quando a atividade de β -lactamase de *P. aeruginosa* foi induzida por tratamento com uma concentração subinibitória de ampicilina. A resposta acentuada foi equivalente àquela observada quando o composto **21** foi coadministrado com penicilinase a células proliferadas na ausência de ampicilina. O tratamento de controle que consistiu em penicilinase sozinha ou cefalotina não teve efeito em fluorescência GFP no ensaio de repórter de NSGFP.

[0212] Exemplo 4: Liberação de óxido nítrico do Composto 21 induz a dispersão de biofilme

[0213] As cepas ATCC e MA67 do tipo selvagem de *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* FRD1, um mucoide, isolado de fibrose cística (CF) (Ohman e Chakrabarty, 1981) e a cepa clínica *P. aeruginosa* 18A, que foi isolada de amostras de saliva CF de um indivíduo infectado cronicamente em Tasmania (Kirov et al, 2007) foram usados para ensaios de

dispersão de biofilme. Os biofilmes foram proliferados em meio mínimo M9 (contendo 48 mM de Na₂HPO₄, 22 mM de KH₂PO₄, 9 mM de NaCl, 19 mM de NH₄Cl, pH 7,2, 2 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose e 100 µM de CaCl₂) em culturas em lote em placas com 24 poços a 37 °C com agitação a 200 rpm. Após incubação de 6 horas para biofilmes do tipo selvagem PA01 ou incubação de 24 horas para biofilmes FRD1 e 18A, tratamentos foram adicionados a cada poço em menos de 1 minuto por placa e as placas foram incubadas por mais 10 minutos a 37 °C com agitação a 200 rpm. A biomassa planctônica foi quantificada por medição direta de OD₆₀₀ do sobrenadante e a biomassa de biofilme remanescente foi quantificada por manchamento de violeta cristal (O'Toole e Kolter, 1998).

[0214] Conforme mostrado na Figura 4, o Composto **21** (denotado como "DEA-CP") é potente na indução de dispersão de biofilmes preestabelecidos de *P. aeruginosa*. Após exposição de 10 minutos, a biomassa de biofilme, conforme medida com manchamento CV, foi reduzida em 55%, enquanto a biomassa planctônica, conforme medida por medições de OD_{600nm} dos sobrenadantes, simultaneamente aumentaram em 20% em comparação aos controles que foram deixados sem tratamento ($P < 0,01$, ANOVA de 1 via e teste de comparação múltipla de Tukey). Em contraste, a cefalotina sozinha não induziu eventos de dispersão significativos.

[0215] O Composto **21** foi então testado em uma faixa de concentrações contra biofilmes do tipo selvagem de *P. aeruginosa* PA01. Conforme mostrado na Figura 5, o Composto **21** (denotado como "DEA-CP") induz a dispersão de uma maneira dependente de dose na faixa de 10 a 100 μ M (Figura 5A). O Composto **21** também foi testado contra biofilmes de cepas isoladas CF de *P. aeruginosa* FRD1 e 18A proliferadas por 24 horas. A exposição a Composto **21** a 100 μ M por 10 minutos induziu 30% e 35% de dispersão em biofilmes FRD1 e 18A, respectivamente, conforme medido por manchamento CV (Figura 5B).

[0216] A dispersão de biofilmes de *P. aeruginosa* preestabelecidos (com o uso da cepa MA67 que forma biofilmes melhor que a cepa usada nos experimentos descritos acima) pelo composto **21** e seu análogo (composto **23**) foi ainda avaliada e mostrada como sendo dependente de dose (consulte a Figura 6).

[0217] Experimentos adicionais com o composto **21** demonstraram os efeitos de dispersão de biofilme acentuados em *P. aeruginosa* após a indução de expressão de β -lactamase extracelular através do pré-tratamento de biofilmes com imipenem (consulte a Figura 7). Nesses experimentos, os biofilmes de *P. aeruginosa* preestabelecidos foram proliferados em placas de microtitulação com agitação a 37 °C e tratados com o composto **21** a 10 μ M e 100 μ M na

presença ou ausência de penicilinase (0,1 U/ml) por 15 minutos ou deixados sem tratamento. Os biofilmes de *P. aeruginosa* preestabelecidos que foram pré-tratados com imipenem a 0,5 µg/ml por 1 hora para induzir a liberação de β-lactamase extracelular foram então expostos ao composto **21** a 10 µM e 100 µM por 15 minutos.

[0218] Os inventores então investigaram a capacidade do composto **21** de induzir a dispersão de biofilmes de outras espécies bacterianas gram-negativa (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Serratia marcescens*) e a espécie bacteriana gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Conforme mostrado na Figura 8, o composto **21** induz a dispersão rápida (10 minutos após o tratamento) em biofilmes dessas espécies.

[0219] As propriedades de dispersão de biofilme do composto **21** foram ainda investigadas com o uso de ensaios de cultura de biofilme de fluxo contínuo. Os biofilmes de *P. aeruginosa* PA01 foram estabelecidos em microfermentadores de vidro que recebem um fluxo contínuo de meio mínimo M9 fresco. A entrada foi comutada em vasos que contêm meio fresco, com ou sem o composto **21** (100 µM) e medições de OD₆₀₀ do efluente tomado. Um aumento rápido e significativo em células liberadas foi observado após a adição do composto **21**, enquanto a quantidade de células liberadas dos biofilmes não tratados permaneceu inalterada

(Figura 9).

[0220] Exemplo 5: Concentração inibitória mínima do Composto 21

[0221] As células do tipo selvagem de *P. aeruginosa* PA01 foram proliferadas em meio mínimo M9 em placas com 96 poços a 37 °C sob condições estáticas na presença de uma faixa de concentrações de Composto **21** diazeniodiolato de dietilamina (DEA; doador de óxido nítrico usado para a síntese de Composto **21**) e/ou os antibióticos cefalotina, ceftazidima e tetraciclina. A proliferação planctônica foi quantificada a vários pontos no tempo por medição direta de OD₆₀₀ do sobrenadante. A concentração inibitória mínima (MIC) para tratamentos com antibiótico foi definida como a concentração de antibiótico que resultou em um OD_{600nm} de 35% ou menos após proliferação por 20 horas. Para experimentos de viabilidade de biofilme, os biofilmes de *P. aeruginosa* foram proliferados em placas de microtitulação com 24 poços conforme descrito acima (consulte o Exemplo 4) por 7 horas, antes da adição de tratamentos do Composto **21** e antibióticos nas concentrações finais indicadas e incubação por mais 1 hora ou 2 horas sob condições de cultura normais. Para cada ponto de tempo, bactérias planctônicas foram coletadas, diluídas em série em soro fisiológico tamponado com fosfato estéril (PBS) e difundidas em placas de ágar LB. Os biofilmes foram

gentilmente lavados uma vez com PBS e resuspensos a partir das superfícies de parede e fundo de poço (área total de superfície = 4,4 cm²) com o uso de um cotonete estéril. Os agregados bacterianos foram ainda rompidos em um sonicador de banho por 10 minutos. As bactérias do biofilme foram então diluídas em série e difundidas em placas de ágar LB. As unidades de formação de colônia (CFU) foram determinadas após incubação por 1 dia a 37 °C.

[0222] O Composto **21** sozinho foi revelado-se mais potente na inibição de proliferação planctônica de *P. aeruginosa* com um MIC de 4 mM em comparação à cefalotina ou DEA, que foram ambos revelados tendo um MIC de 16 mM (Figura 10 - Composto **21** denotado como "DEA-CP"). Os efeitos inibitórios de proliferação do Composto **21** são provavelmente devidos aos níveis tóxicos de óxido nítrico e sua toxicidade aumentada em comparação ao DEA é sugerida como resultado da liberação alvejada de óxido nítrico dentro das bactérias.

[0223] Exemplo 6: Tratamento combinatório envolvendo o Composto 21 e antibióticos

[0224] Para avaliar o efeito de Composto **21** e antibióticos sobre a viabilidade de biofilme e células dispersas, os tratamentos combinatórios de Composto **21** com ceftazidima foram executados em biofilmes proliferados em placas de microtitulação (conforme descrito acima no

Exemplo 5) e tanto CFU de biofilme quanto CFU planctônico foram determinados. Os resultados demonstraram uma diminuição concomitante no CFU de biofilme, de $1,9 \times 10^8$ para $1,3 \times 10^8$ CFU por poço e aumento em CFU planctônico, de $4,8 \times 10^8$ para 11×10^8 CFU por poço, após tratamento por 1 hora com o Composto **21** a $100 \mu\text{M}$ sozinho (consulte as Figuras 11A e 11B), que é consistente com as medições de OD e CV previamente obtidas (consulte o Exemplo 4; Figura 4). Ademais, a eficácia de ceftazidima a $10 \mu\text{M}$ contra ambas as bactérias de biofilme e planctônicas foi aumentada quando incubadas na presença de Composto **21** por 1 hora em comparação às bactérias de biofilme e planctônicas que foram tratadas com ceftazidima sozinha (Figura 8A e 8B). A eficácia de ceftazidima contra as bactérias de biofilme foi também aumentada em 2, 3 vezes na presença de Composto **21** após tratamentos por 2 horas em comparação aos biofilmes que foram tratados sem o Composto **21** (Figura 11C).

[0225] Os inventores revelaram ainda que o composto **21** potencializa a eficácia anti-biofilme dos antibióticos clinicamente empregados tobramicina e ciprofloxacina (Tabela 1). Os biofilmes de *P. aeruginosa* estabelecidos proliferados em placas de microtitulação com agitação a 37°C foram pré-tratados com imipenem subinibitório ($10 \mu\text{g/ml}$) por 1 hora para induzir a liberação de β -lactamase

extracelular. Tobramicina ou ciprofloxacina foram então adicionados ou com ou sem o composto **21** ou os biofilmes foram deixados sem tratamento (controles). As bactérias de biofilme foram incubadas por mais 1 hora antes da ressuspensão e enumeração de cfu. Os valores representam as reduções em log vezes em cfu para controlar os biofilmes e são a média de dois experimentos independentes (\pm SEM). As bactérias nos sobrenadantes foram completamente erradicadas (além do limite de detecção; 10 cfu/ml) após o tratamento com ou antibiótico sozinho ou antibiótico em combinação com o composto **21**.

[0226] **Tabela 1**

Antibiótico	Composto 21 (μM)	Redução	
		em log	em cfu
Tobramicina	0	2,15	\pm
80 μ g/ml/170 μ M		0,16	
	10	3,92	\pm
		0,06	
	100	3,58	\pm
		0,15	

Ciprofloxacina 0	3,54	±
5 µg/ml/15 µM	0,09	
10	5,06	±
	0,02	
100	4,90	±
	0,13	

[0227] Em tratamentos combinatórios com tetraciclina, contra *P. aeruginosa* planctônico, o Composto **21** aumentou os efeitos inibitórios de tetraciclina a 6 µM em 45% e os efeitos inibitórios de tetraciclina a 25 µM em 60% (dados não mostrados).

[0228] Referências

[0229] Barraud N, et al. (2009) Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J. Bacteriol.* 191(23):7.333 a 7.342.

[0230] Hope et al, 2002, Determining the spatial distribution of viable and non viable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling, *J. Appl. Microbiol.*, **1993**: 448-455.

[0231] Kirov SM, et al. (2007) Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis.

Microbiology 153(Pt 10):3.264 a 3.274.

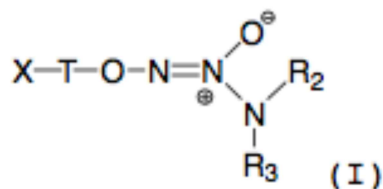
[0232] Ohman DE & Chakrabarty AM (1981) Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate. *Infect. Immun.* 33(1):142 a 148.

[0233] O'Toole GA & Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28(3):449 a 461.

[0234] Webb *et al*, 2003, Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *J. Bact.*, 185: 4.585 a 4.592.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula (I) ou um sal do mesmo:



caracterizado pelo fato de que T é uma ligação ou um hidrocarboneto bivalente com 1 a 6 átomos de carbono, R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre: hidrogênio, cicloalquila C₃-C₇, cicloalquenila C₃-C₇, alquila (CH₂)_pOC(O)PhOC(O)C₁-C₆, alquila (CH₂)_pOC(O)APhC₁-C₆, cadeia C₁-C₂₀ normal ou ramificada, alquenila C₂-C₂₀ de cadeia normal ou ramificada, alquinila C₂-C₂₀ de cadeia normal ou ramificada, em que as cadeias alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente interrompidas por um ou mais grupos/heteroátomos selecionados dentre O, S, NH, NH²⁺ e em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente substituídos por um ou mais substituintes selecionados do grupo que consiste em: halogênio, ciano, COOH, alquila (CH₂)_pC(O)OC₁-C₆, alquenila C(O)OC₁-C₆, SO₃H, halogênio SO₂, SO₂NH₂, NH₂, NH³⁺, OH, SH, alquila OC₁-C₆, alquenila OC₂-C₆, alquinila OC₂-C₆, arila e heteroarila, ou alternativamente R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 4, 5, 6, 7 ou 8 membros que pode opcionalmente conter 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 átomos de

fenila ou triazinila; ou

R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre: hidrogênio, cicloalquila C_5-C_7 , $(CH_2)_pOC(O)PhOC(O)C_1-C_6$ alquila, $(CH_2)_pOC(O)APhC_1-C_6$ alquila, alquila C_1-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, alquenila C_2-C_{10} de cadeia normal ou ramificada e alquinila C_2-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente interrompidas por entre um e três grupos/heteroátomos selecionados dentre O, S, NH e NH_2^+ , e em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente substituídas por entre um e seis substituintes selecionados do grupo que consiste em: halogênio, fenila, etóxi, metóxi, propóxi, COOH, $(CH_2)_pCOOC_1-C_4$ alquila, NH_2 , NH_3^+ , OH e SH e em que A é um radical de hidrocarboneto bivalente que tem entre 1 ou 2 átomos de carbono e p é 0, 1 ou 2; ou

R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre: hidrogênio, cicloalquila C_5-C_7 , alquila C_1-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, alquenila C_2-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, alquinila C_2-C_{10} de cadeia normal ou ramificada, em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente interrompidas por entre um e três grupos selecionados dentre O, NH e NH_2^+ e em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente

substituídas por entre um e quatro substituintes selecionados do grupo que consiste em: halogênio, fenila, metóxi, COOH, CH₂COOC₁-C₄alquila, NH₂ e NH₃⁺; ou

R₂ e R₃ são independentemente selecionados dentre: hidrogênio, ciclohexila, alquila C₁-C₁₀ de cadeia normal ou ramificada ou alquenila C₂-C₁₀ de cadeia normal ou ramificada, em que as cadeias de alquila ou alquenila podem ser opcionalmente interrompidas por um ou dois grupos selecionados dentre NH e NH₂⁺ e em que as cadeias de alquila, alquenila ou alquinila podem ser opcionalmente substituídas por entre um e três substituintes selecionados do grupo que consiste em: fenila, metóxi, COOH, NH₂ e NH₃⁺; ou

R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 4, 5, 6 ou 7 membros que pode opcionalmente conter 1, 2, 3, 4 ou 5 átomos de nitrogênio adicionais e pode ser saturado, insaturado ou parcialmente insaturado e em que o anel com 4, 5, 6 ou 7 membros pode ser opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados do grupo que consiste em: SO₂NMe₂, SO₃H, SO₂halogênio, SO₂NH₂, -C(O)O(CH₂)_pPh, -C(O)Me, -C(O)piridila, -(CH₂)_pOH, -C(O)NH₂, -COOH, -C(O)NMe₂, -C(O)NEt₂, fenila, naftila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, triazinila, pirrolidinila, imidazolila, alquila C₁-C₆, alquenila C₂-C₆, alquinila C₂-C₆, -C(O)OC₁-C₆alquila, -C(O)OC₂-C₆alquenila, -C(O)OC₂-

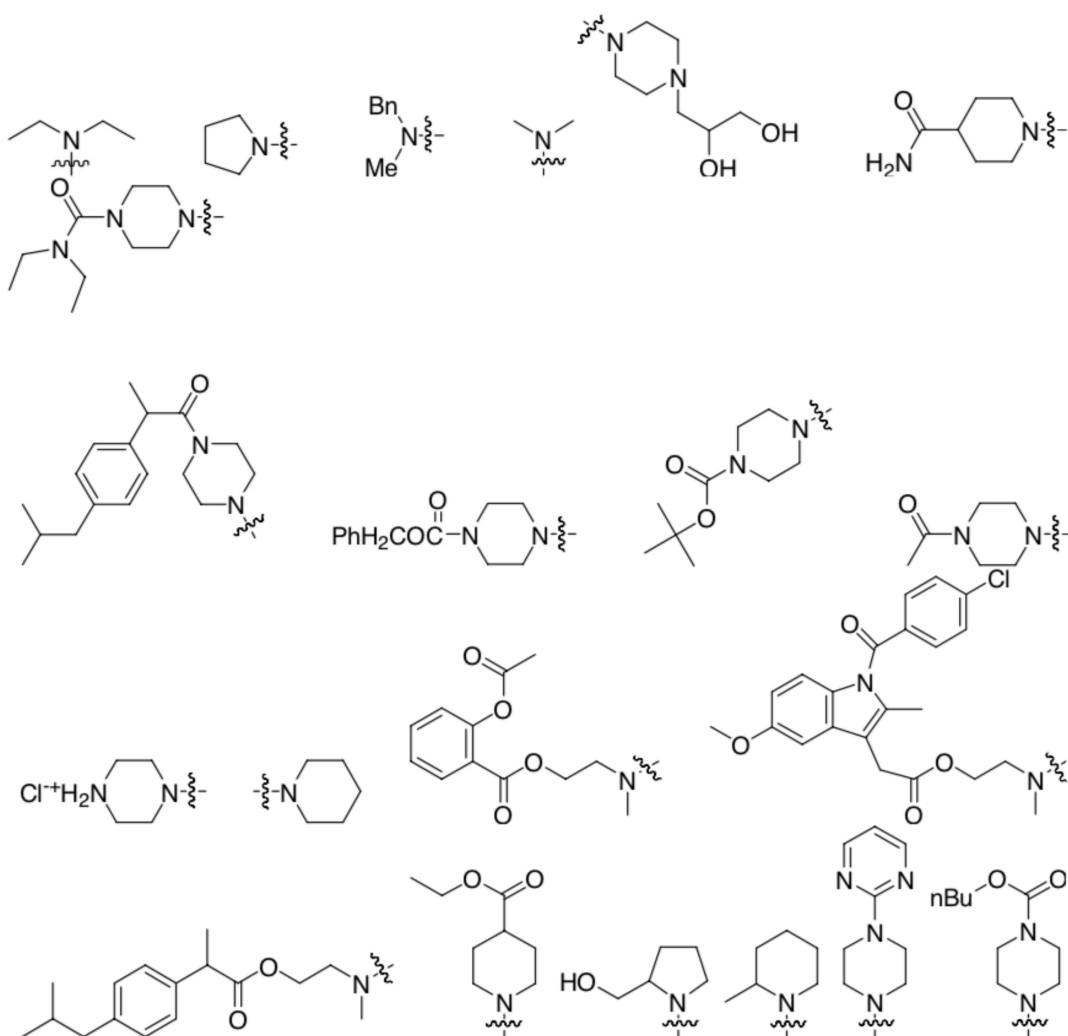
C₆alquinila, -C(O)O(CH₂)_pPh, - (CH₂)_pSH, halogênio, SO₂PhNHCOC₁-C₆alquila, NH₂, SH, OC₁-C₆alquila e em que p é um número entre 0 e 2; ou

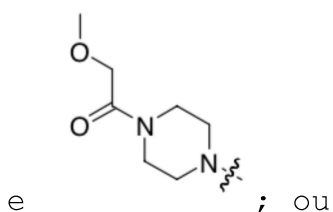
R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5, 6 ou 7 membros que pode opcionalmente conter 1, 2 ou 3 átomos de nitrogênio adicionais e pode ser saturado, insaturado ou parcialmente insaturado e em que o anel com 5, 6 ou 7 membros pode ser opcionalmente substituído por entre um e quatro substituintes selecionados do grupo que consiste em: SO₂NMe₂, SO₂NH₂, -COO(CH₂)_pPh -C(O)Me, -C(O)piridila, - (CH₂)_pOH, -C(O)NH₂, -COOH, -C(O)NMe₂, -C(O)NEt₂, fenila, piridinila, pirimidinila, pirazinila, triazinila, pirrolidinila, imidazolila, alquila C₁-C₆, alquenila C₂-C₆, alquinila C₂-C₆, -C(O)OC₁-C₆alquila, -C(O)OC₂-C₆alquenila, -C(O)OC₂-C₆alquinila, -C(O)O(CH₂)_pPh, - (CH₂)_pSH, halogênio, NH₂, SH, OC₁-C₆alquila, p é um número entre 0 e 2; ou

R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5, 6 ou 7 membros que pode opcionalmente conter 1, 2 ou 3 átomos de nitrogênio adicionais e em que o anel com 5, 6 ou 7 membros pode ser opcionalmente substituído por entre um e três substituintes selecionados do grupo que consiste em: SO₂NMe₂, SO₂NH₂, -C(O)Me, -C(O)piridila, - (CH₂)_pOH, -C(O)NH₂, -COOH, -C(O)NMe₂, -C(O)NEt₂, fenila,

piridinila, pirimidinila, pirazinila, triazinila, pirrolidinila, imidazolila, alquila C₁-C₆, alquenila C₂-C₆, -C(O)OC₁-C₆alquila, -C(O)OC₂-C₆alquenila, halogênio, NH₂, SH, OC₁-C₆alquila, p é um número entre 0 e 2; ou

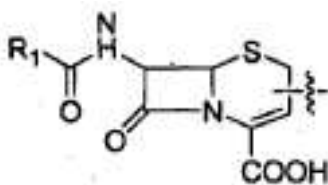
R₂ e R₃, juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados formam uma estrutura selecionada do grupo que consiste em:





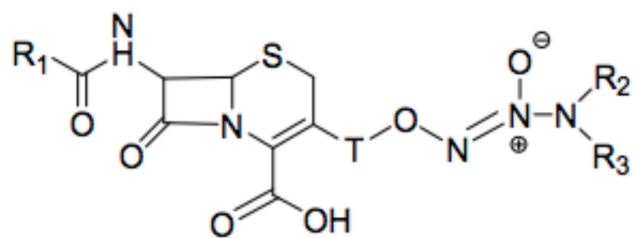
R_2 e R_3 são independentemente selecionados dentre alquila C_1-C_{10} , ou alternativamente R_2 e R_3 , juntamente com o nitrogênio ao qual são ligados, formam um anel com 5 ou 6 membros que pode opcionalmente conter entre 1 e 3 átomos de nitrogênio adicionais e que podem ser opcionalmente substituídos por um grupo arila ou heteroarila;

e X é selecionado do grupo que consiste em:



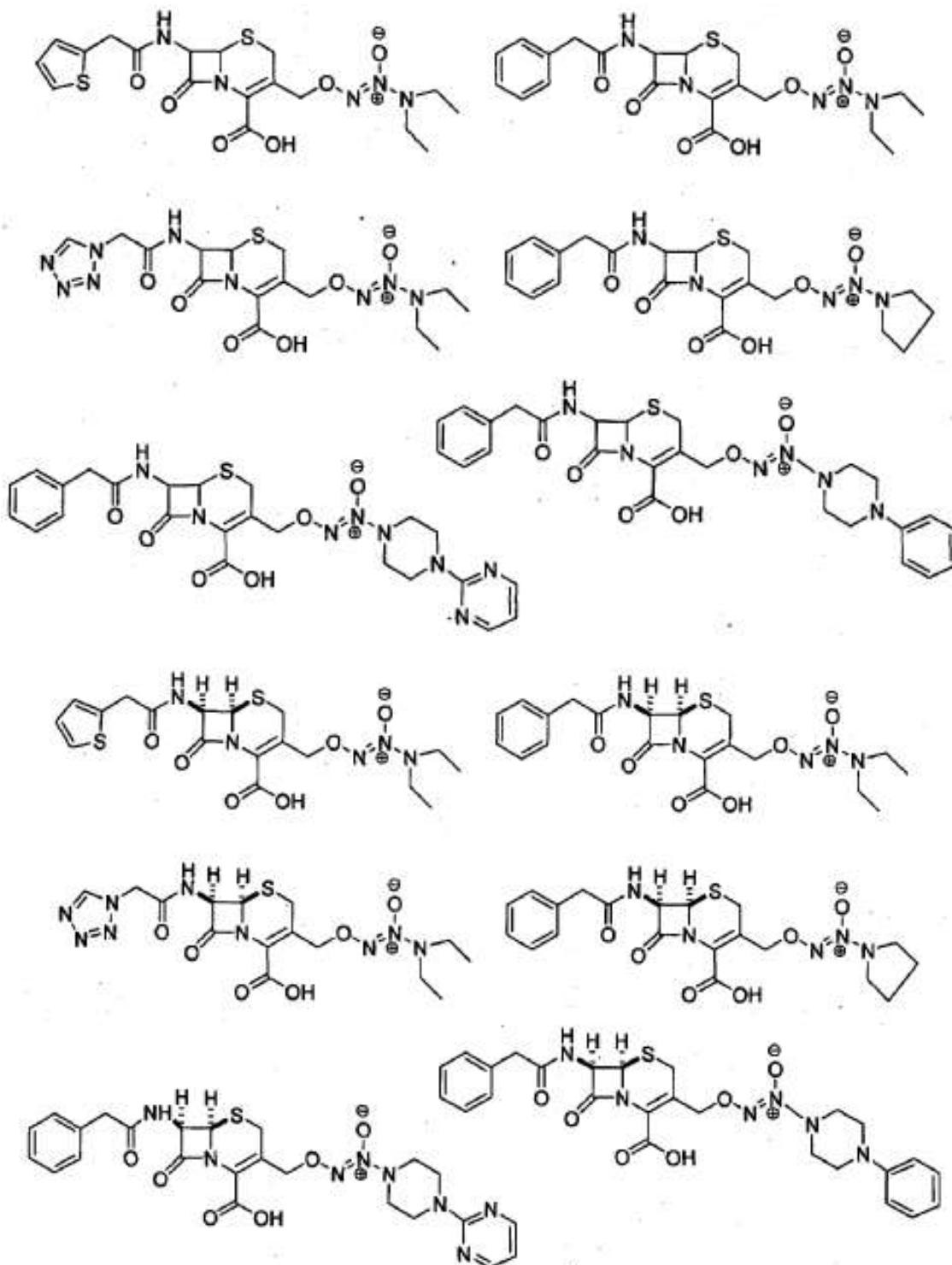
em que R_1 é um substituinte que corresponde a um substituinte ligado ao grupo 7-NHC (O) - de um antibiótico cefalosporina; ou em que R_1 é Y-aril ou Y-heteroaril em que Y é um hidrocarboneto bivalente tendo entre 1 e 4 átomos de carbono.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que tem a estrutura:



ou sais do mesmo.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o composto compreende uma estrutura selecionada do grupo que compreende:



e sais dos mesmos.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda um composto antibiótico ligado por meio do substituinte R_2 e/ou R_3 .

5. Composto, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o antibiótico é ciprofloxacina ou N-desmetil levofloxacina.

6. Composição **caracterizada** pelo fato de que é para promover a dispersão de microrganismos a partir de um biofilme ou inibir a formação e/ou desenvolvimento de biofilmes, a composição compreendendo um composto como definido na reivindicação 1.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelo fato de compreender ainda um ou mais antibióticos ou agentes antimicrobianos adicionais.

8. Uso de um composto conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 5 **caracterizado** pelo fato de que é para preparar uma composição para tratar ou prevenir uma infecção, doença ou distúrbio associado a biofilme em um indivíduo, em que a infecção é causada por micro-organismo capaz de formar o biofilme.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o composto é revestido, impregnado ou de outro modo colocado em contato com uma superfície ou interface suscetível à formação de biofilme.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a superfície é uma superfície de um dispositivo médico implantável, prótese ou equipamento médico ou cirúrgico.

11. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que os micro-organismos formadores de biofilme expressam uma β -lactamase ou uma transpeptidase.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a β -lactamase é uma penicilinase.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o biofilme ou micro-organismos formadores de biofilme são expostos a um antibiótico de β -lactama antes ou concomitante à exposição ao composto.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o biofilme forma-se em uma superfície corporal do indivíduo, interna ou externa ao indivíduo, e a exposição do biofilme ou micro-organismos formadores de biofilme ao composto é por meio da administração do composto ao indivíduo.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que prevenir a formação de biofilmes compreende induzir eventos de diferenciação em

micro-organismos dentro de biofilmes que compreende impedir a indução de eventos de diferenciação em micro-organismos que levam à formação de biofilme; ou em que impedir a formação de biofilmes compreende aumentar a sensibilidade de um micro-organismo a agentes antimicrobianos.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o biofilme ou micro-organismos formadores de biofilme são expostos ao composto de modo que a concentração do doador de óxido nítrico ou de óxido nítrico liberado e assim exposta ao biofilme ou micro-organismos não seja tóxica ao ambiente ou ao indivíduo em que o biofilme ou micro-organismos são encontrados.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o biofilme está sobre ou dentro do corpo do indivíduo e está associado a uma doença ou distúrbios sofridos pelo indivíduo.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que a doença ou distúrbio é selecionado dentre o grupo compreendendo fibrose cística, endocardite bacteriana, otite média, doença dos legionários, tuberculose e cálculos renais.

FIGURA 1

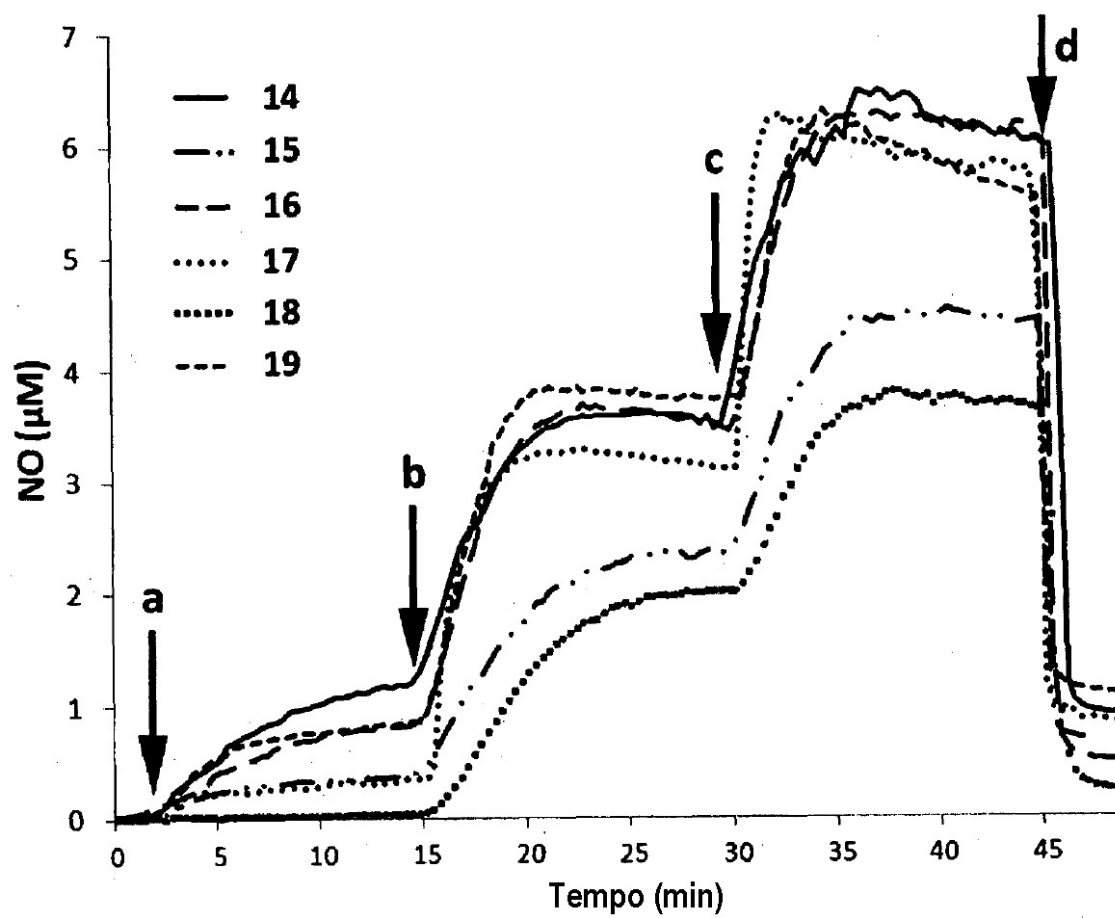


FIGURA 2

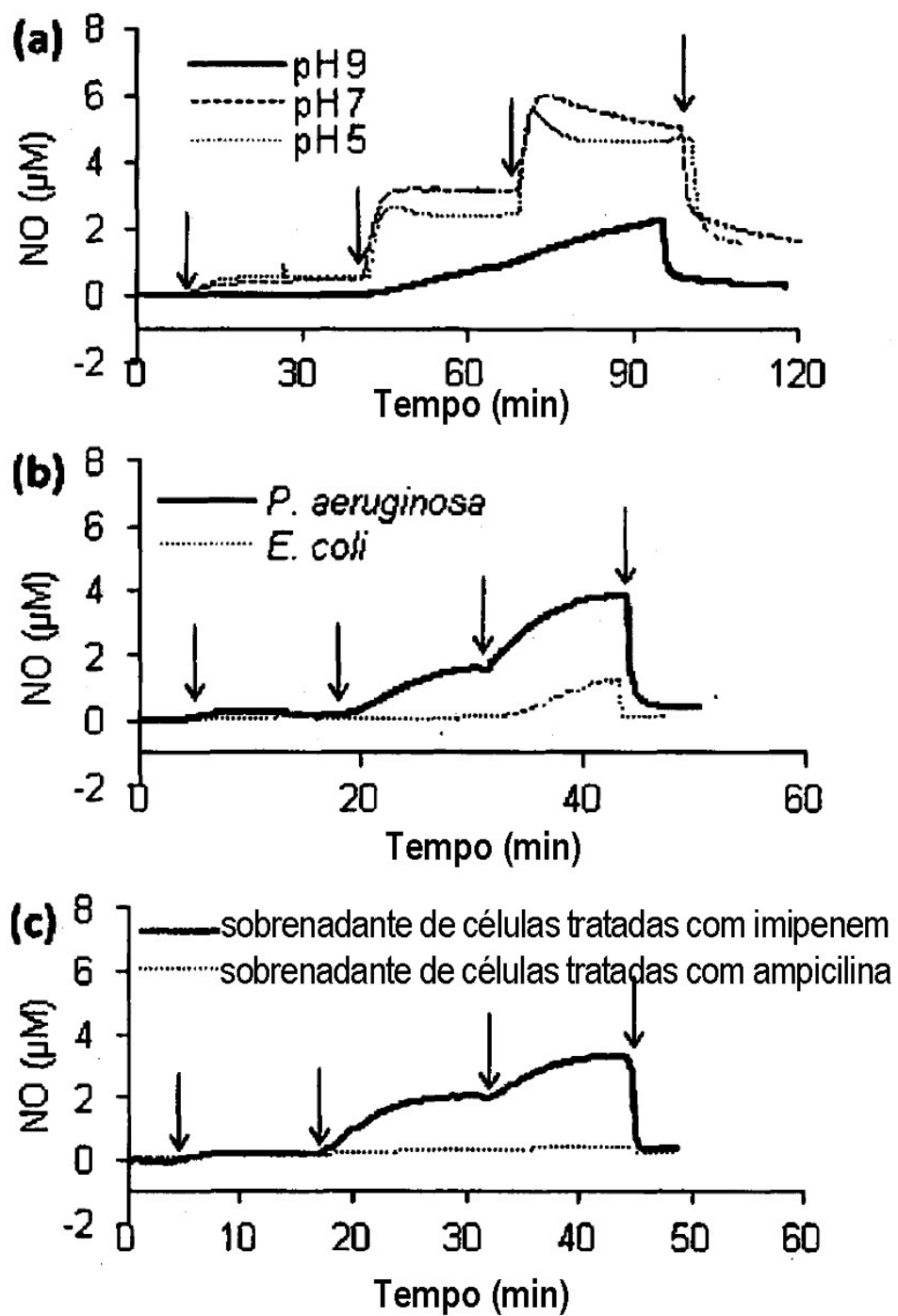


FIGURA 3

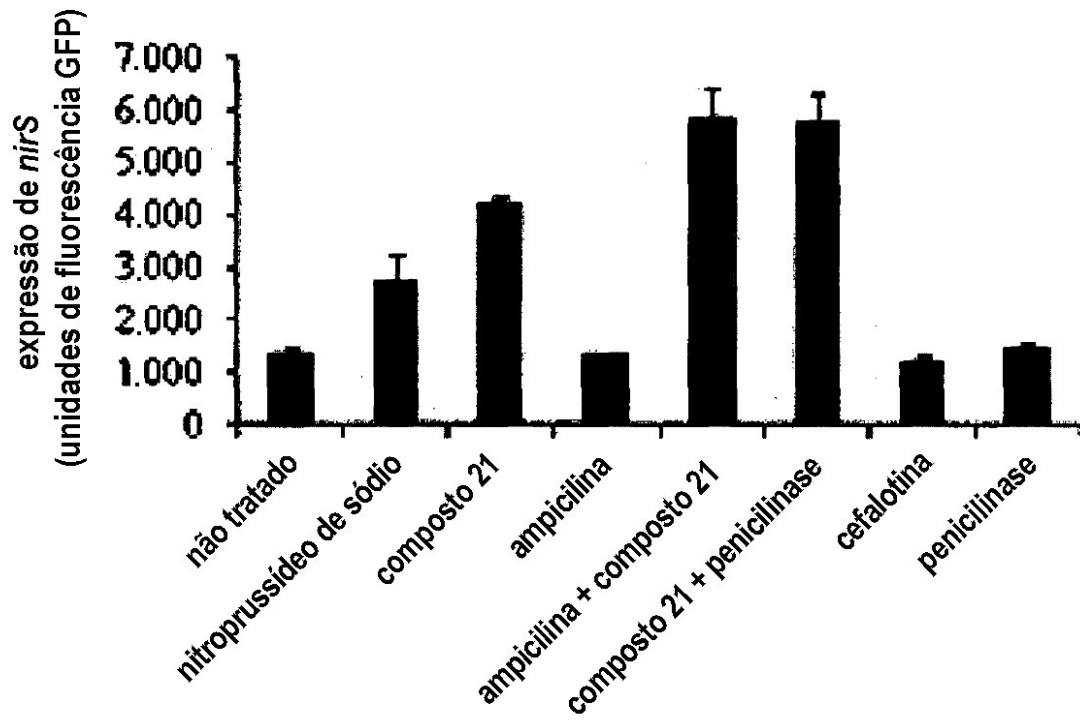


FIGURA 4

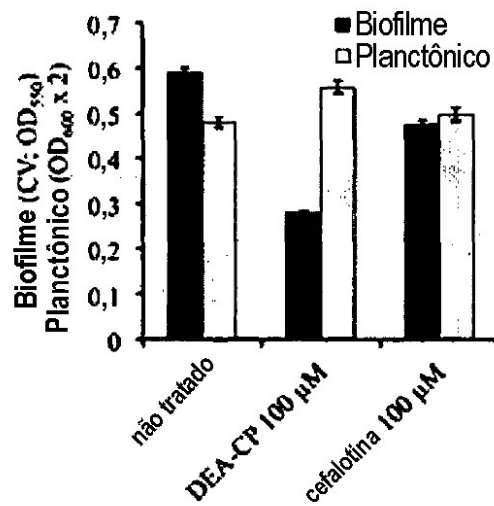


FIGURA 5

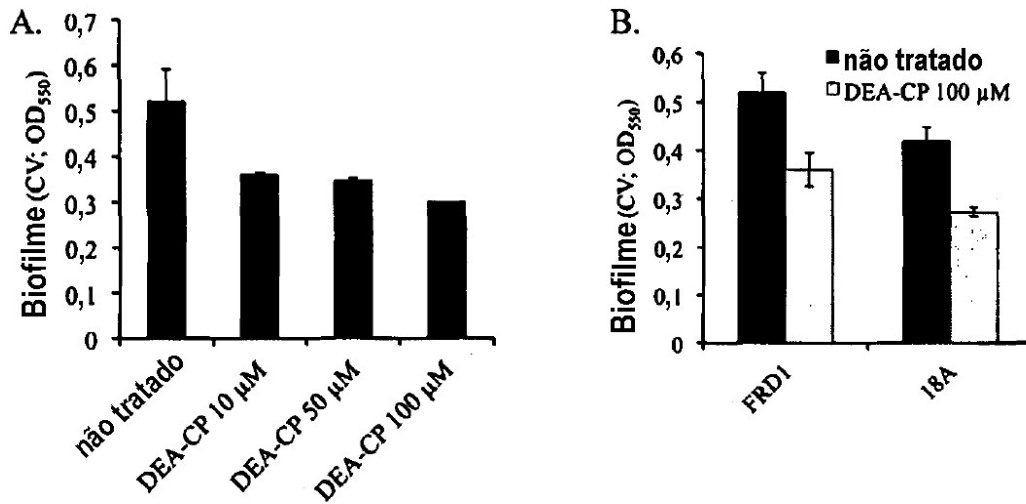


FIGURA 6

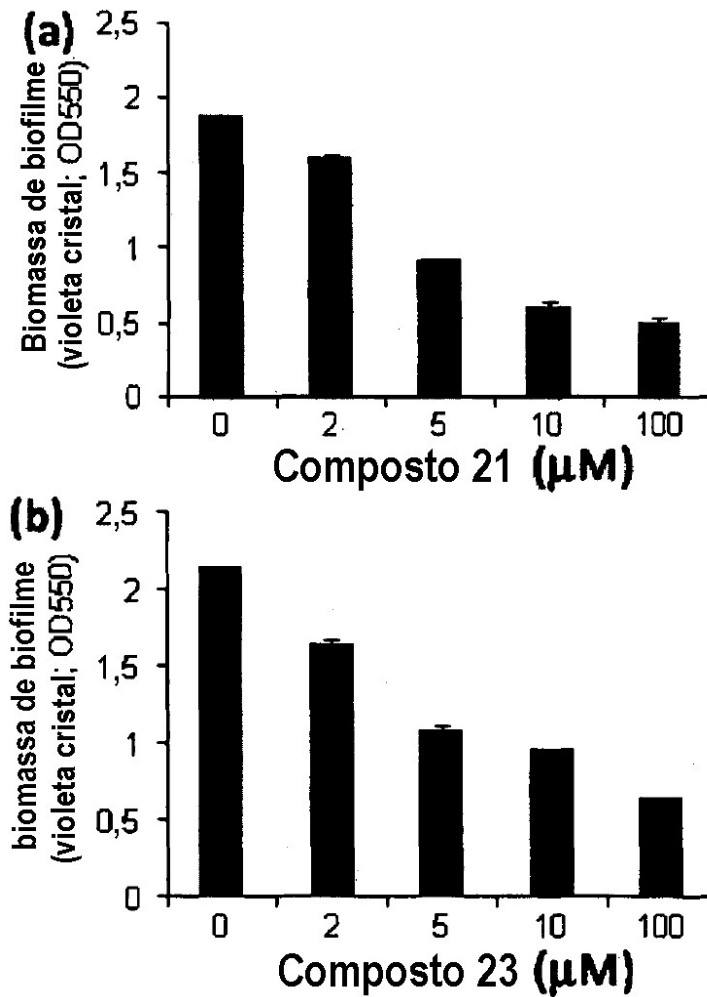


FIGURA 7

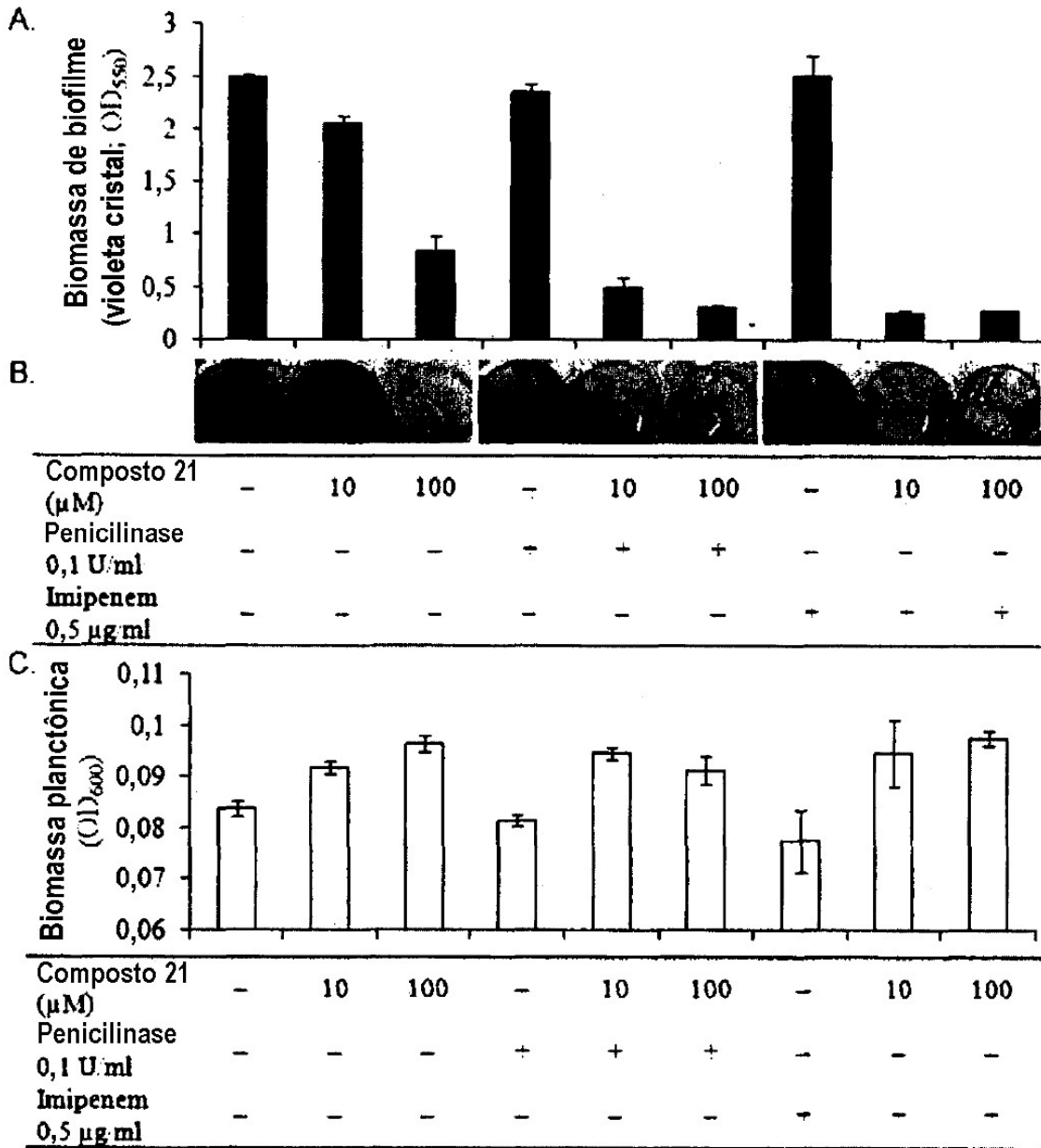


FIGURA 8

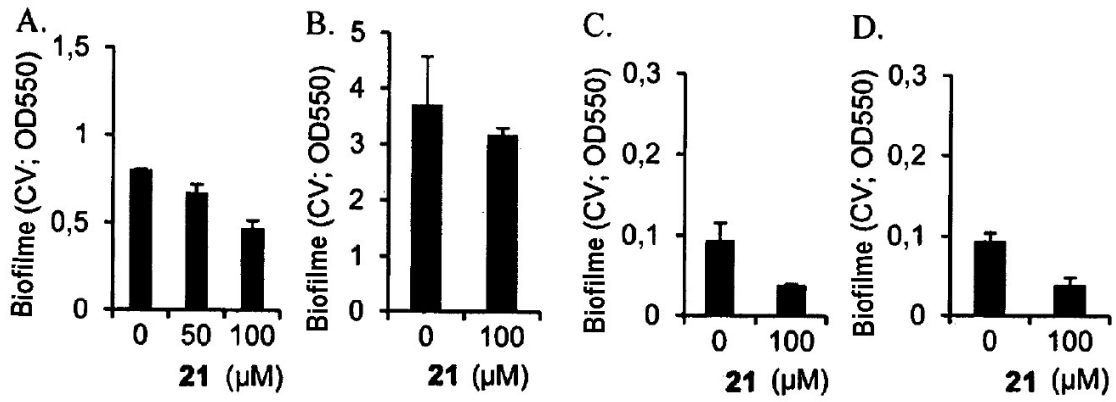


FIGURA 9

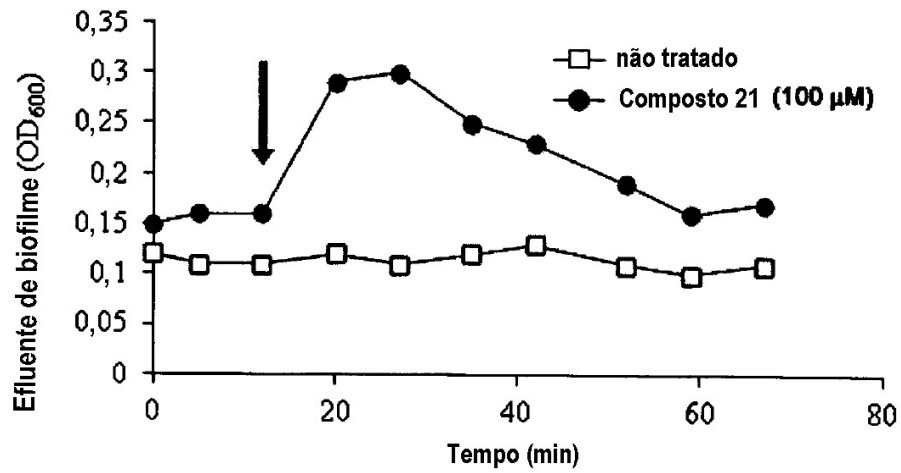


FIGURA 10

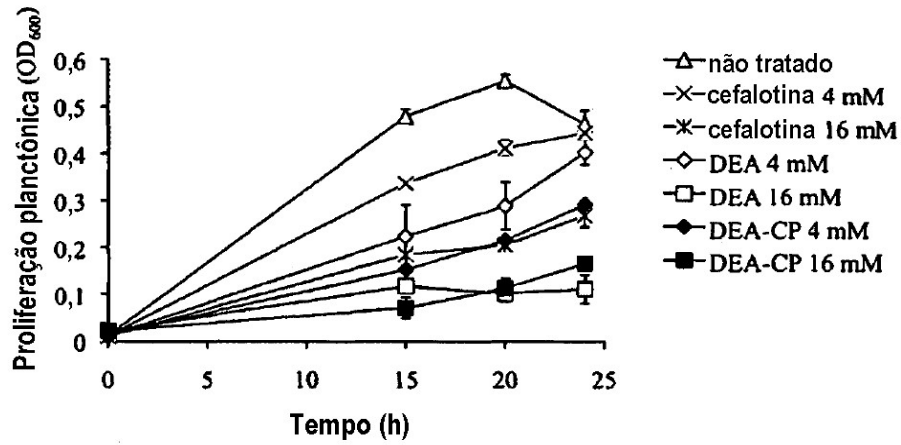
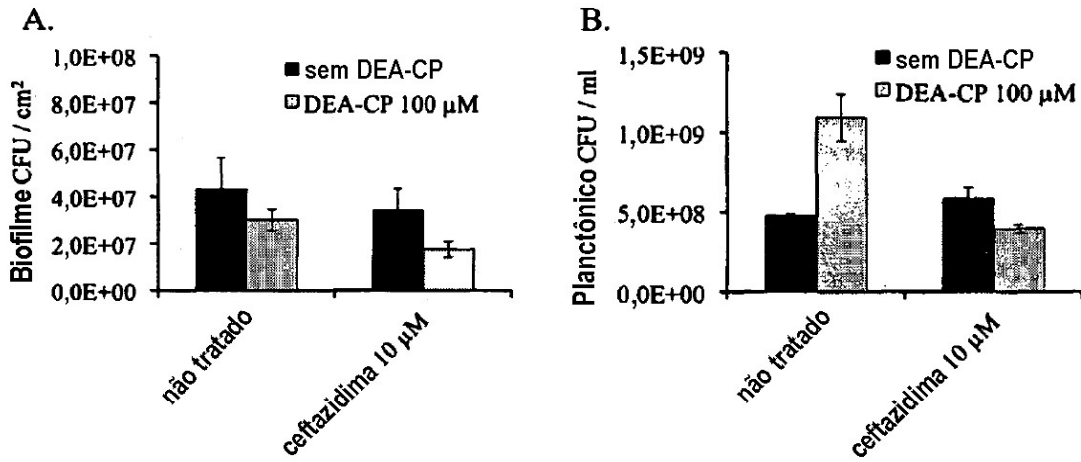


FIGURA 11

tratamentos combinados de 1 hora



tratamentos combinados de 2 horas

