

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 047835

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.09.18

(51) Int. Cl. C07K 7/62 (2006.01)  
A61K 38/12 (2006.01)

(21) Номер заявки  
202092819

(22) Дата подачи заявки  
2019.06.25

## (54) СОЕДИНЕНИЯ

(31) 62/689,602

(32) 2018.06.25

(33) US

(43) 2021.05.21

(86) PCT/EP2019/066819

(87) WO 2020/002325 2020.01.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
СПЕРО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

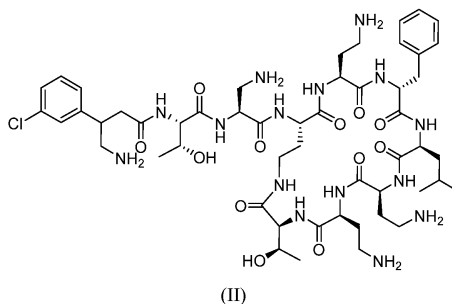
(72) Изобретатель:  
Браун Памела, Доусон Майкл,  
Симонович Мона, Боукс Стивен,  
Дюперчи Эстер, Риверс Дин, Лестер  
Рой (GB), Коулман Скотт (US)

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2016083531  
WO-A1-2015135976  
WO-A1-2017054047  
US-A1-2012316105  
WO-A1-2016166103

KOH JUN-JIE ET AL.: "Recent advances in synthetic lipopeptides as anti-microbial agents: designs and synthetic approaches", AMINO ACIDS, SPRINGER VERLAG, AU, vol. 49, no. 10, 19 August 2017 (2017-08-19), pages 1653-1677, XP036320623, ISSN: 0939-4451, DOI: 10.1007/S00726-017-2476-4 [retrieved on 2017-08-19], p. 1656-1657, "Polymyxin analogs"

(57) В изобретении предложено полимиксиновое соединение формулы (II), его соли и сольваты. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (II), и применение указанного соединения и композиции для лечения или профилактики бактериальной и/или микробных инфекций.



B1

047835

047835 B1

### Родственная заявка

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет на основании заявки US 62/689602, поданной 25 июня 2018 г. (25.06.2018), содержание которой в полном объеме включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к новым полимиксиновым соединениям формулы (II), фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, и применению таких соединений и фармацевтических композиций для лечения или профилактики бактериальной и/или микробной инфекций, в частности, инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями.

### Уровень техники

В WO 2013/072695 и WO 2014/188178 описаны производные полимиксина, в которых N-концевой жирный ацильный фрагмент и соседний фрагмент диаминоасляной кислоты полимиксина В или колистина заменены на концевую группу, содержащую аминокислотный заместитель. Такие производные обладают хорошей антибактериальной активностью при одновременном проявлении пониженной цитотоксичности.

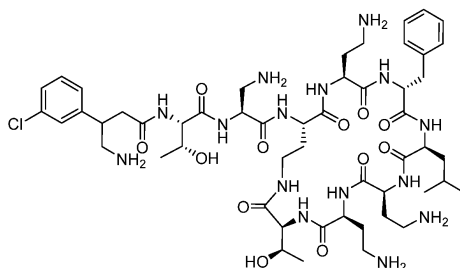
В WO 2015/135976 также описаны производные полимиксина, в которых N-концевой жирный ацильный фрагмент и соседняя диаминоасляная кислота полимиксина В или колистина также заменены на концевую группу, содержащую аминокислотный заместитель. В данном документе было показано, что определенное положение аминокислотного заместителя и расположение других заместителей в N-концевом фрагменте имеют важное значение с точки зрения сильной антимикробной активности против ряда ключевых патогенов, таких как *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Описанные соединения также сохраняли низкую цитотоксичность.

В WO 2016/083531 описаны производные полимиксина, в которых N-концевой жирный ацильный фрагмент и соседняя диаминоасляная кислота полимиксина В или колистина также заменены на концевую группу, содержащую аминокислотный заместитель, например на группы, описанные в WO 2013/072695, WO 2014/188178 и WO 2015/135976. Кроме того, аминокислотный остаток в положениях 6 и/или 7 является замещенным по сравнению с полимиксином В и колистином.

Чтобы быть более полезными с точки зрения парентеральной терапии системных инфекций, чем известные в настоящее время полимиксины, новые производные полимиксина должны по меньшей мере иметь активность, сопоставимую с активностью таких известных полимиксинов, и проявлять при этом значительно более низкую нефротоксичность *in vivo*.

### Сущность изобретения

Согласно первому аспекту в настоящем изобретении предложено соединение формулы (II)



и его соли и сольваты.

Такие соединения находят применение в способах лечения или профилактики, необязательно в комбинации со вторым активным агентом. Указанные соединения можно применять для лечения микробной инфекции, такой как инфекция, вызванная грамотрицательной бактерией (грамотрицательная бактериальная инфекция).

Показано, что соединения согласно настоящему изобретению обладают низкой цитотоксичностью, сбалансированной приемлемыми уровнями лекарственного средства в почках после парентерального введения. Показано, что соединения согласно настоящему изобретению превосходят как полимиксин В, так и модифицированные полимиксиновые соединения, известные в данной области техники, в том числе соединения, о которых ранее сообщал заявитель настоящей заявки. Такое превосходство проявляется в одной или более из следующих характеристик: более низкая цитотоксичность, приемлемые уровни лекарственного средства в почках (т.е. приемлемая нефротоксичность, обусловленная невысокими уровнями лекарственного средства в почках) после парентерального введения, эффективность в моделях бедра и легких у мышей и/или более высокое значение МИС в отношении патогенных бактериальных штаммов, при этом предложенные соединения эквивалентны соединениям предшествующего уровня техники в отношении других характеристик.

Как правило, соединения, известные в данной области техники, проявляют одну или, возможно, две из перечисленных улучшенных характеристик, но не все. Например, в настоящее время относительно часто встречаются полимиксиновые соединения, обладающие более низкой цитотоксичностью, но такая более низкая цитотоксичность часто сопровождается снижением антибактериальной активности. Кроме

того, соединения, обладающие более низкой цитотоксичностью, могут, тем не менее, после введения обнаруживаться в почках при высоких уровнях. Таким образом, указанные соединения все еще являются токсичными и не применимы в способах медицинского лечения.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (II), вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

Согласно дополнительному аспекту предложено применение соединения формулы (II) или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (II), для лечения или профилактики бактериальной и/или грибковой инфекции.

Согласно еще одному аспекту предложено применение соединения формулы (II) или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (II), в способе лечения микробной инфекции.

Микробная инфекция может представлять собой бактериальную инфекцию, например, грамотрицательную бактериальную инфекцию. Грамотрицательную бактериальную инфекцию можно выбрать из группы, состоящей из *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., и других энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*), *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas* и *Legionella*.

Эти и другие аспекты и варианты реализации настоящего изобретения более подробно описаны ниже.

#### **Подробное описание изобретения**

В настоящем изобретении предложены соединения формулы (I), в том числе соединения формулы (II) и (III), как более подробно описано ниже, для применения при медицинском лечении, необязательно совместно со вторым активным агентом.

В общем случае соединения формулы (I), (II) и (III) содержат полимиксиновый остов, который представляет собой нонапептидный остов, и группу  $-X-R^{15}$  на N-конце полимиксинового остова. Группа  $-R^{15}$  представляет собой замещенную  $\gamma$ -аминопропильную группу.  $\gamma$ -Аминопропильная группа в  $\beta$ -положении относительно фрагмента  $-X-$  содержит в качестве заместителя необязательно замещенную арильную или аралкильную группу.

Первый аминокислотный остаток в экзоциклической цепи соединений согласно настоящему изобретению - соответствующий положению 3 в полимиксине - представляет собой остаток Dap (диаминопропионовой кислоты), например, L-Dap, а не остаток L-Dab (L-диаминомасляной кислоты), присутствующий в полимиксине В и колистине.

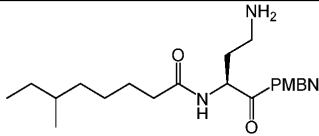
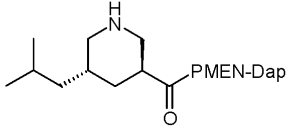
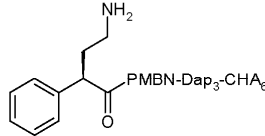
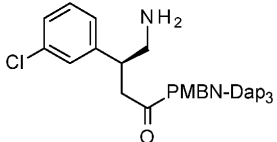
Аминокислотные остатки в положениях 6 и 7 полимиксинового соединения (согласно нумерации, применяемой для полимиксина) могут соответствовать тем аминокислотным остаткам, которые присутствуют в полимиксине В и колистине. Аминокислотные остатки в положениях 6 и/или 7 могут быть заменены на аминокислотные остатки, отличные от остатков, присутствующих в полимиксине В и колистине.

Чтобы быть более полезными с точки зрения парентеральной терапии системных инфекций, чем известные в настоящее время ряды полимиксиновых соединений, новые производные полимиксина должны по меньшей мере иметь антибактериальную активность, сопоставимую с активностью таких известных полимиксиновых соединений, и обладая при этом значительно более низкой нефротоксичностью *in vivo*.

В настоящее время было обнаружено, что для полимиксинового соединения недостаточно проявлять более низкую цитотоксичность, поскольку она часто не связана с пониженной токсичностью *in vivo*. Таким образом, накопление лекарственного средства в почках и его выведение оттуда также должно быть приемлемым. Другими словами, сочетание цитотоксичности и уровней лекарственного средства в почках после парентерального введения - это то, что приводит к благоприятному профилю токсичности *in vivo*.

Это можно продемонстрировать с помощью сравнительных примеров, приведенных в табл. А, где РМВN относится к нонапептидному остову полимиксина В и РМЕН относится к нонапептидному остову полимиксина Е, с заменами в аминокислотных остатках в положениях 3 и 6 (согласно нумерации полимиксинов), показанными, где это целесообразно (например, Dap заменяет Dab в положении 3 и циклогексилаланин (СНА) заменяет фенилаланин в положении 6).

Таблица А

Соединение	Структура	Цитотоксичность	Уровень лекарственного средства в почках		Нефротоксичность*
			4 ч	16 ч	
Полимиксин В		1,0	128	18	++
Контрольный пример D77 WO 2015/135976		23**	516	264	++++
Контрольный пример 38 WO 2016/083531		9,2***	567	333	+++
Пример 5		11,6	170	19	+/-

Цитотоксичность относится к измеренной  $IC_{50}$  относительно  $IC_{50}$ , зафиксированной для полимиксина В в отношении клеточной линии НК-2. Уровень лекарственного средства относится к количеству соединения (мкг/г почек), обнаруженному в почках через 4 или 16 ч после подкожного введения мыши дозы, составляющей 17,2 мг/кг.

\* Соединения вводили либо в виде 4 доз с интервалом 8 ч из расчета 25 мг свободного основания/кг/доза, либо в течение 4 дней три раза в день с интервалом в 4 ч из расчета 17,2 мг свободного основания/кг/доза. После введения собирали мочу в течение от 16 до 24 ч для определения содержания в моче биомаркеров нефротоксичности (КИМ-1, альбумин, цистатин С). Соединения классифицировали от - (неотлично относительно контроля носителем) до ++++ (сильный ответ от всех биомаркеров).

\*\* В WO 2015/135976 для этого соединения приведено значение 13,3 (пример D77). В настоящее время указанное соединение было дополнительно исследовано дважды, и относительное значение было рассчитано на основе значения для РМВ в том же эксперименте. Среднее значение составляло 23.

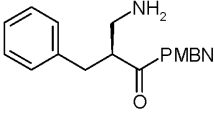
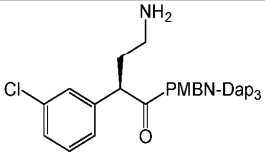
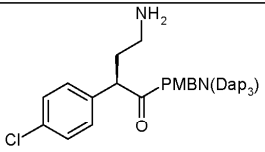
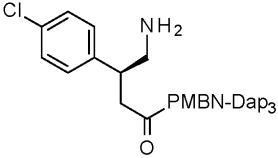
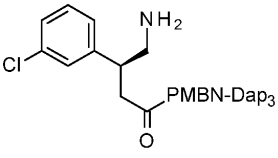
\*\*\* В WO 2016/083531 для этого соединения указано значение  $IC_{50}$  255 мкг/мл (пример 38) по сравнению с 12 мкг/мл для полимиксина В. Однако значение для РМВ, применяемое в той заявке, представляло собой медианное значение из нескольких экспериментов. Значение 9,2, приведенное в настоящем документе, получено путем сравнения со значением  $IC_{50}$  для РМВ, определенным в том же эксперименте.

Заявитель настоящего изобретения ранее описал в WO 2015/135976 нонапептиды полимиксина с N-концевой  $\gamma$ -аминопропильной группой, содержащей в качестве заместителя фенильный или бензильный фрагмент. Однако фенильный или бензильный заместитель находится в  $\alpha$ -положении, а не в  $\beta$ -положении, относительно группы -X-. В WO 2015/135976 также описан нонапептид полимиксина с N-концевой  $\beta$ -аминоэтильной группой, содержащей в  $\alpha$ -положении бензильную группу в качестве заместителя. Согласно настоящему изобретению аминная функциональная группа находится в  $\beta$ -положении, а не в  $\gamma$ -положении, относительно группы -X-.

Хотя такие известные соединения демонстрируют многообещающую активность и умеренно улучшенную цитотоксичность по сравнению с полимиксином В, указанные соединения уступают соединениям, предложенным в настоящем изобретении, в том, что они не проявляют сочетание низкой цитотоксичности в балансе с приемлемыми уровнями в почках после введения лекарственного средства.

Это продемонстрировано с помощью сравнительных примеров, приведенных ниже в табл. В, где РМВН относится к нонапептидному остову полимиксина В с заменами в аминокислотном остатке в положениях 3, где это необходимо (например, Dap заменяет Dab в положении 3).

Таблица В

Соединение	Структура	Цитотоксичность	Уровень лекарственного средства в почках (мкг/г почки, 4 ч)	Уровень в почках через 4 ч/относительная цитотоксичность
Эталонное соединение D6 WO 2015/135976		4,4*	235	53
Эталонное соединение**		5,1	589	115
Эталонное соединение**		4,8	533	111
Пример 1		8,8	268	30
Пример 5		11,6	170	15

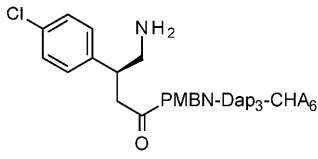
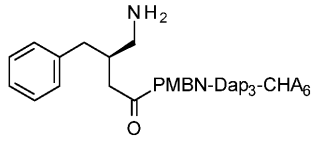
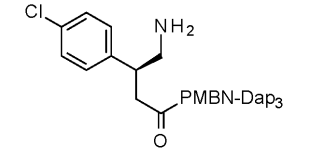
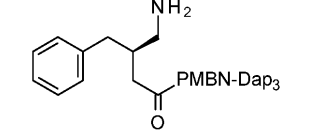
\* Указанное соединение представляет собой пример D6 в WO 2015/135976. Приведенное там значение относительной цитотоксичности составляло 3,7. Такое значение представляет собой среднее значение из двух повторных определений.

\*\* Соединения, представляющие собой указанные эталонные примеры, можно получить согласно способам, описанным в WO 2015/135976, содержание которого в полном объеме включено в настоящий документ посредством ссылки.

Заявитель настоящего изобретения ранее описал в WO 2016/083531 нонапептиды полимиксина с модифицированными N-концевыми группами, в частности группами, содержащими β-арильные или β-аралкильные группы. Однако такие известные соединения содержат липофильный аминокислотный остаток в положении 6, такой как остаток циклогексилаланина, тогда как соединения, описанные в настоящей заявке, содержат в положении 6, например, остаток фенилаланина, лейцина, норлейцина, валина или норвалина. Указанные известные соединения также уступают соединениям согласно настоящему изобретению с точки зрения неудовлетворительного сочетания цитотоксичности и уровней лекарственного средства в почках после дозирования.

Это продемонстрировано с помощью сравнительных примеров, показанных в табл. С, где PMBN относится к нонапептидному остову полимиксина В, с заменами в аминокислотных остатках в положениях 3 и 6, показанными, где это целесообразно, (например, Dap заменяет Dab в положение 3, и циклогексилаланин (СНА) заменяет фенилаланин в положении 6).

Таблица С

Соединение	Структура	Цитотоксичность	Уровень лекарственного средства в почках (мкг/г почки, 4ч)	Уровень в почках через 4 ч/относительная цитотоксичность
Эталонное соединение 50 WO 2016/083531		7,4	463	63
Эталонное соединение 58 WO 2016/083531		5,2	212	32
Пример 1		8,8	268	30
Пример 9		12,0	159	13

Соединения 50 и 58 известны из WO 2016/083531, и в этом случае они представляют собой соединения, идентифицированные как изомер 1.

Полимиксиновые соединения.

Соединения формулы (I) представляют собой дериватизированные по N-концу производные нонапептидов полимиксина. Остов соединения формулы (I) представляет собой производное нонапептида, такого как нонапептид полимиксина В (PMBN, полимиксин В 2-10), в котором аминокислотный остаток в положении 3 заменен на Dap. Аминокислотные остатки в положениях 6 и/или 7 необязательно заменены на другую аминокислоту, такую как аминокислоту, описанную в настоящем документе. Соединения формулы (I) содержат группу  $-X-R^{15}$  на N-конце полимиксинового остова. Такая структура подробно описана ниже.

$-R^1$ .

Группа  $-R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому она присоединена, соответствует аминокислотному остатку в положении 6 в ряду полимиксиновых соединений.

Аминокислотный остаток в положении 6 может быть таким же, что и аминокислотный остаток в положении 6 полимиксина В. То есть  $R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, может представлять собой остаток D-фенилаланина.

Аминокислотный остаток в положении 6 может быть таким же, что и аминокислотный остаток в положении 6 колистина. То есть  $R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, может представлять собой остаток D-лейцина.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой остаток фенилаланина, лейцина, норлейцина, валина или норвалина. Такой аминокислотный остаток может представлять собой D-форму.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой аминокислотный остаток, такой как остаток фенилаланина, лейцина или норлейцина. Такой аминокислотный остаток может представлять собой D-форму.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в по-

ложении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой остаток фенилаланина, например, D-фенилаланин, или остаток лейцина, такой как остаток D-лейцина.

Замена аминокислотного остатка в положении 6 известна, например, из WO 2016/083531.

$-R^2$ .

Группа  $-R^2$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому она присоединена, соответствует аминокислотному остатку в положении 7 в ряду полимиксиновых соединений.

Группа  $-R^2$  представляет собой  $C_{1-4}$ алкил, необязательно содержащий в качестве заместителя одну гидроксильную группу.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^2$  представляет собой  $C_{1-4}$ алкил. Такая группа не является замещенной.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^2$  представляет собой  $C_{3-4}$ алкил, такой как  $C_4$ -алкил, необязательно содержащий в качестве заместителя одну гидроксильную группу, например, незамещенный.

Остаток аминокислотной группы в положении 7 может быть таким же, что и аминокислотный остаток в положении 7 полимиксина В и колистина. То есть  $R^2$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, может представлять собой остаток L-Leu.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^2$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой остаток лейцина, изолейцина, фенилаланина, треонина, валина, норвалина, аланина, треонина или аминобутирата. Такой аминокислотный остаток может представлять собой L-форму.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^2$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой остаток лейцина, аминобутирата или треонина. Такой аминокислотный остаток может представлять собой L-форму.

Согласно другим вариантам реализации аминокислотный остаток в положении 7 можно заменить на другой аминокислотный остаток по сравнению с полимиксином В и колистином.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^2$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой остаток лейцина, треонина или аминаомасляной кислоты (Abu), такой как L-лейцин, L-треонин или L-Abu.

Замена аминокислотного остатка в положении 7 описана, например, помимо прочего, в WO 2016/083531 и Velkov et al.

$-R^3$ .

Группа  $-R^3$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому она присоединена, соответствует аминокислотному остатку в положении 10 в ряду полимиксиновых соединений.

Группа  $-R^3$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому она присоединена, представляет собой треонин, такой как L-треонин.

$-R^4$ .

Группа  $-R^4$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому она присоединена, соответствует аминокислотному остатку в положении 3 в ряду полимиксиновых соединений.

В соединениях согласно настоящему изобретению аминокислотный остаток в положении 3 не является L-Dab, который представляет собой аминокислотный остаток в положении 3 полимиксина В и колистина. В соединениях согласно настоящему изобретению  $-R^4$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой Dar, например, L-Dar.

Соединения, в которых  $-R^4$  представляет собой боковую цепь Dar, например L-Dar, можно получить с применением способов, описанных в WO 2015/135976.

В соединениях формулы (I) аминогруппа в боковой цепи Dar может быть защищена, например, аминогруппа может быть защищена группой Vos.

$-R^8$ .

Группа  $-R^8$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении бета по отношению к атому углерода, к которому она присоединена через гидроксиметиленовый спейсер ( $-CH(OH)-$ ), соответствует аминокислотному остатку в положении 2 в ряду полимиксиновых соединений.

Аминокислотный остаток в положении 2 может быть таким же, что и аминокислотный остаток в положении 2 полимиксина В и колистина. То есть  $R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении бета по отношению к атому углерода, к которому он присоединен через гидроксиметиленовый спейсер, может представлять собой остаток L-треонина.

Аминокислотный остаток, содержащий группу  $-R^8$ , соответствует положению 2 в ряду полимиксиновых соединений.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^8$  представляет собой метил. Таким образом, полученная аминокислота представляет собой Thr.

Согласно одному из вариантов реализации  $-R^8$  представляет собой H. Таким образом, полученная аминокислота представляет собой Ser.

Как правило,  $-R^8$  представляет собой метил.

$-X-$ .

Группа  $-X-$  представляет собой  $-C(O)-*$ .

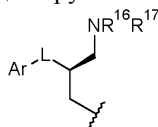
Звездочка указывает точку присоединения к NH, аминоконцу нонапептидного остова полимиксина, например, аминокислоте в положении 2. Левая часть группы  $-X-$  представляет собой точку присоединения к  $-R^{15}$ .

$-R^{15}$ .

Группа  $-R^{15}$  вместе с  $-X-$  представляет собой модификацию N-конца полимиксинового остова.

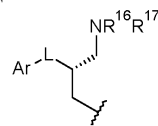
Соединения согласно настоящему изобретению содержат стереоцентр в  $\beta$ -положении  $\gamma$ -аминопропильной группы в N-концевом фрагменте,  $-R^{15}$ . Было обнаружено, что один из стереоизомеров связан с более низкой цитотоксичностью и более низкими уровнями лекарственного средства в почках. Такой стереоизомер представляет собой стереоизомер, который быстрее элюируется при обращенно-фазовой хроматографии, как подробно описано в настоящей заявке в рабочих примерах.

Согласно одному из вариантов реализации группа  $-R^{15}$  представляет собой:



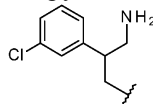
Такая стереоформа представляет собой наиболее быстро элюируемую стереоформу при обращенно-фазовой хроматографии.

Альтернативно, группа  $-R^{15}$  может представлять собой:

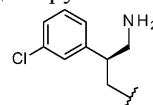


Такая стереоформа представляет собой наиболее медленно элюируемую стереоформу.

Согласно одному из вариантов реализации группа  $-R^{15}$  представляет собой:



Согласно одному из вариантов реализации группа  $-R^{15}$  представляет собой:



Типичные группы внутри  $-R^{15}$  представлены ниже.

$-R^{16}$  и  $-R^{17}$ .

Обе группы  $-R^{16}$  и  $-R^{17}$  представляют собой водород.

В соединениях формулы (I) группа  $-NR^{16}R^{17}$  может быть защищена, например, группа  $-NR^{16}R^{17}$  может быть защищена группой Boc.

$-L-$ .

Группа может представлять собой метилен с ковалентной связью ( $-CH_2-$ ).

Как правило,  $-L-$  представляет собой ковалентную связь.

$-Ar$ .

Группа  $-Ar$  представляет собой арильную группу, такую как карбоарильная или гетероарильная группа. Арильная группа необязательно содержит заместитель.

Арильная группа может представлять собой  $C_6$ -арильную группу, такую как фенил, или  $C_5$ -арильную группу, такую как тиофен.

Группа  $-Ar$  может представлять собой фенил, при этом она необязательно является замещенной, например, содержит заместитель. Согласно одному из вариантов реализации  $-Ar$  представляет собой незамещенный фенил.

Арильная группа может содержать заместитель, например одну или более групп  $-R^S$ . Каждая группа  $-R^S$  независимо выбрана из галогена, алкила, галогеналкила и арила, например галогена и алкила.

Арильная группа может содержать в качестве заместителя одну, две или три группы  $-R^S$ , например одну или две группы, например одну группу (мономещенная группа).

Галогеновую группу можно выбрать из фтора, хлора, брома и йода и можно выбрать из фтора и хлора, например хлора.



Галогеновая группа может представлять собой хлор.

Алкильная группа может представлять собой  $C_{1-6}$ алкил, такой как  $C_{1-4}$ алкил, такой как  $C_{1-3}$ алкил, такой как  $C_3$ алкил.

Алкильную группу можно выбрать из метила, этила и пропила, в том числе *n*-пропила и изопропила.

Алкильная группа может представлять собой изопропил.

Галогеналкильная группа может представлять собой  $C_{1-6}$ алкильную группу, такую как  $C_{1-4}$ алкил, такой как  $C_{1-2}$ алкил, содержащий в качестве заместителя одну или более галогеновых групп. Алкильная группа может быть пергалогенированной, например перфторированной.

Галогеналкильная группа может представлять собой трифторметил.

Когда  $-R^S$  представляет собой арильную группу, она может представлять собой карбоарил или гетероарил. Арил может представлять собой  $C_{5-6}$ арил, такой как  $C_5$ -арил.  $C_5$ -арил можно выбрать из тиофенила, фуранила, пирролила, пиразолила, тиазолила, изотиазолила, оксазолила и изоксазолила.  $C_6$ -арил может представлять собой фенил.

Арильная группа может представлять собой тиофенил, такой как тиофен-2-ил.

Арильная группа сама по себе может необязательно содержать в качестве заместителя одну, две или три группы  $-R^{Ar}$ , например одну или две группы, например одну группу (монозамещенная группа). Каждая группа  $-R^{Ar}$  независимо выбрана из галогена, алкила, галогеналкила и арила, например галогена и алкила. Такие группы могут иметь то же значение, что и группы, описанные выше, за исключением того, что арильная группа не является замещенной.

Группа  $-Ar$  может представлять собой галогенфенил или алкилфенил.

Галогенфенил можно выбрать из 2-галогенфенила, такого как 2-хлорфенил, 3-галогенфенила, такого как 3-хлорфенил, и 4-галогенфенила, такого как 4-хлорфенил.

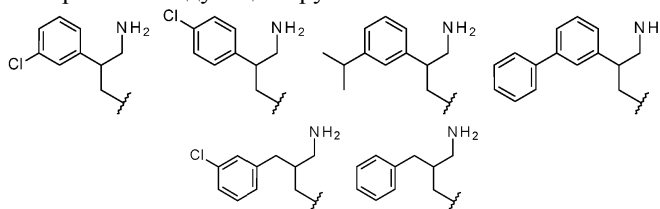
Алкилфенил можно выбрать из 2-алкилфенила, такого как 2-изопропилфенил, 3-алкилфенила, такого как 3-изопропилфенил, и 4-алкилфенила, такого как 4-изопропилфенил.

Группа  $-Ar$  может представлять собой 2-хлорфенил или 3-изопропилфенил.

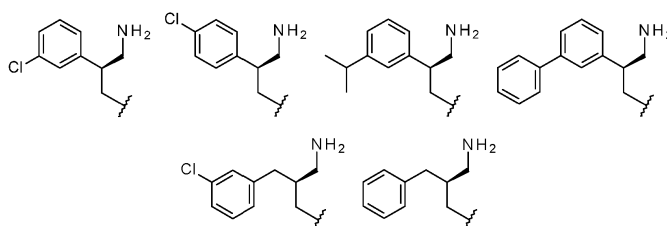
Группа  $-Ar$  может представлять собой 2-хлорфенил.

Выбранные группы  $-R^{15}$ .

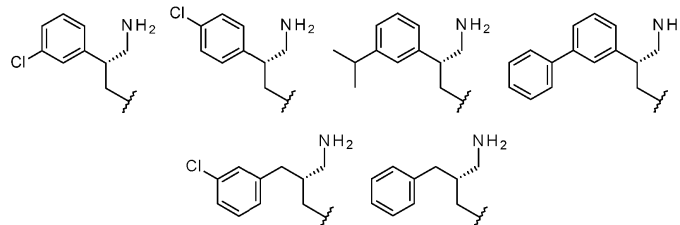
Группу  $-R^{15}$  можно выбрать из следующих групп:



Группу  $-R^{15}$  можно выбрать из следующих групп:

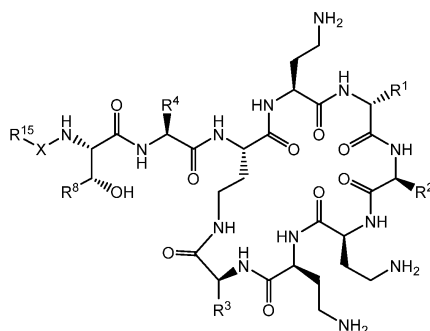


Группу  $-R^{15}$  можно выбрать из следующих групп:



Варианты реализации, относящиеся к соединениям формулы (I).

Согласно некоторым вариантам реализации соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (Ia), характеризующееся ориентацией фрагментов  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$ , как показано ниже:



где  $-X$ -,  $-R^1$ -,  $-R^2$ -,  $-R^3$ -,  $-R^4$ -,  $-R^8$  и  $-R^{15}$  имеют значения, определенные для соединений формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, защищенную форму или пролекарственную форму.

В соединениях формулы (Ia)  $-R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой D-фенилаланин, D-лейцин или D-норлейцин.

В соединениях формулы (Ia)  $-R^2$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой остаток L-лейцина, L-аминобутирата или L-треонина.

Соединения формулы (Ia) могут представлять собой соединения, в которых  $-L$ - представляет собой ковалентную связь или  $-CH_2-$  и  $-Ar$  представляет собой фенил, необязательно содержащий в качестве заместителя одну или две группы, выбранные из группы, состоящей из галогена,  $C_1$ - $C_6$ -алкила, необязательно замещенного арила и необязательно замещенного гетероарила. Например,  $-Ar$  может представлять собой фенил, необязательно содержащий в качестве заместителя одну или две группы, выбранные из группы, состоящей из хлора, брома, тиофенила, фенила, метила, изопропила и изобутила.

В настоящем документе  $-Ar$  можно выбрать из фенила, 3-хлорфенила, 4-хлорфенила, 3-изопропилфенила, 3-изобутилфенила, 3-метилфенила, 3-бромфенила, 1,1'-бифенил-3-ила, 3,5-дихлорфенила и тиофен-3-илфенила.

Соединения согласно настоящему изобретению могут представлять собой соединения формулы (I), в которых:

$-R^1$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой D-фенилаланин, D-лейцин или D-норлейцин;

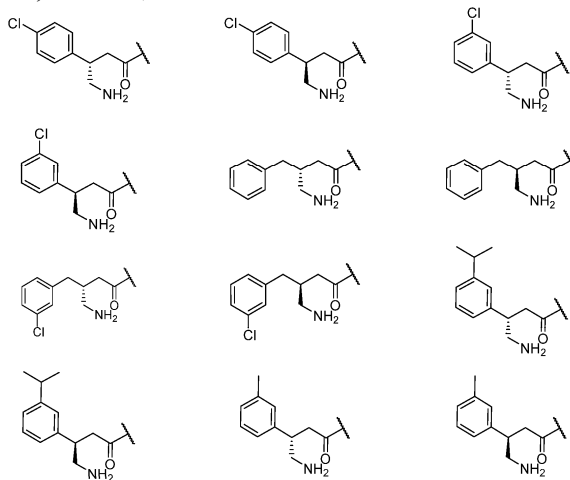
$-R^2$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой остаток L-лейцина, L-аминобутирата или L-треонина;

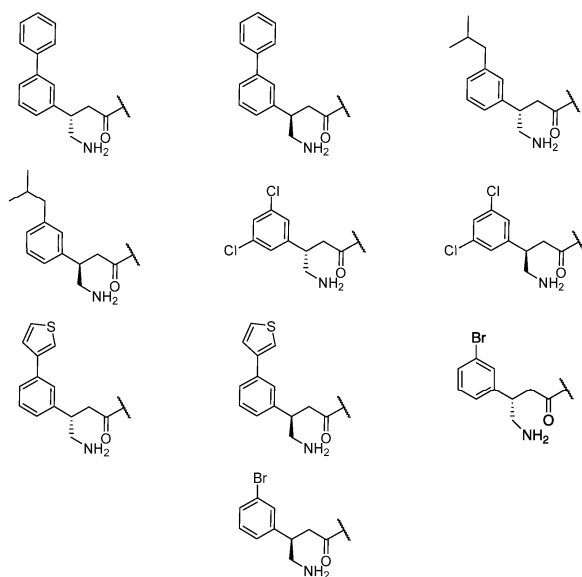
$-R^3$  представляет собой L-треонин;

$-R^4$  представляет собой L-Дар;

$-R^8$  представляет собой метил;

$R^{15}-X$ - выбран из группы, состоящей из:

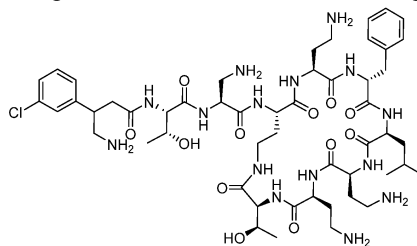




и их соли, сольваты, защищенные формы и пролекарственные формы.

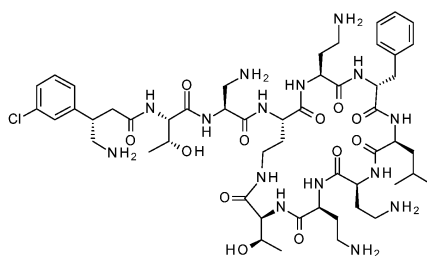
Соединение (II) и соединение (III).

Соединение формулы (I) может представлять собой соединение формулы (II), показанное ниже:



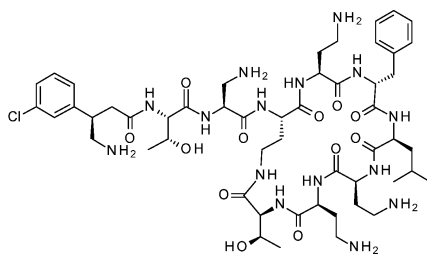
и его соли, сольваты и защищенные формы.

Соединение формулы (I) может представлять собой соединение формулы (IIa), как показано ниже:



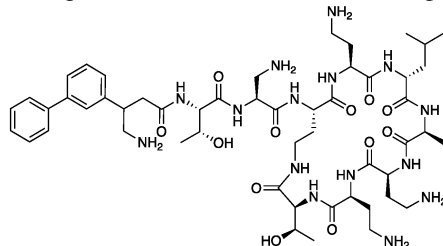
и его соли, сольваты и защищенные формы.

Соединение формулы (I) может представлять собой соединение формулы (IIb), как показано ниже:



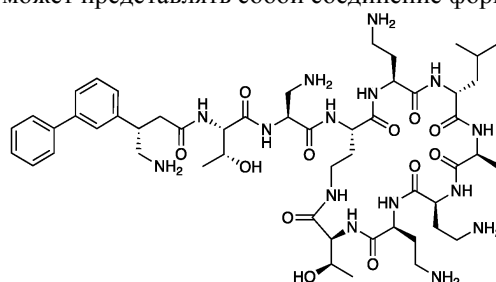
и его соли, сольваты и защищенные формы.

Соединение формулы (I) может представлять собой соединение формулы (III), показанное ниже:



и его соли, сольваты и защищенные формы.

Соединение формулы (I) может представлять собой соединение формулы (III), показанное ниже:

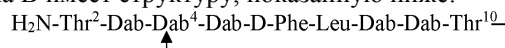


и его соли, сольваты и защищенные формы.

Полимиксиновые соединения.

Соединения для применения в настоящем изобретении основаны на модифицированных формах известных полимиксиновых соединений, таких как нонапептид полимиксина В и нонапептид колистина.

Нонапептид полимиксина В имеет структуру, показанную ниже:



где указаны положения 2, 4 и 10 (со ссылкой на систему нумерации, применяемую для декапептида полимиксина В), при этом аминокислотные остатки находятся в L-конфигурации, если не указано иное.

Соединения согласно настоящему изобретению являются производными нонапептида полимиксина В, в которых (i) N-концевая аминогруппа,  $-\text{NH}_2$ , заменена на группу  $\text{NH-X-R}^{15}$ , как описано в настоящем документе; (ii) аминокислотный остаток в положении 3 заменен на Dap, и необязательно (iii) аминокислотные остатки в положении 2, 6 и/или 7 заменены на другие аминокислотные остатки.

Для удобства соединения согласно настоящему изобретению представлены формулой (I), где аминокислоты в положениях 2, 3, 6, 7 или 10 определяются природой групп  $\text{R}^8$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  и  $\text{R}^3$ , соответственно. Соединения согласно настоящему изобретению, включающие варианты, описанные выше, являются биологически активными.

Способы синтеза.

Получение соединений согласно настоящему изобретению известно специалистам в данной области техники, в частности, специалистам, знающим об описанных в WO 2015/135976 способах получения нонапептидов модифицированного полимиксина. Способы, описанные в данной области техники, можно легко адаптировать для применения для получения соединений согласно настоящему изобретению с учетом новых N-концевых групп, применяемых в настоящей заявке.

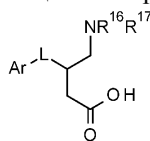
В общем случае, соединение согласно настоящему изобретению можно получить путем реакции сочетания подходящим образом защищенного промежуточного нонапептида полимиксина с карбоновой кислотой, содержащей группу  $-\text{R}^{15}$ . Продукт такой реакции обычно представляет собой защищенную форму соединения формулы (I). При желании можно осуществить удаление защитных групп. Такая процедура является общей стратегией, известной из WO 2015/135976.

Подходящим образом защищенное нонапептидное промежуточное соединение само по себе можно получить согласно способам, изложенным в WO 2015/135976. Как описано в данном документе, подходящим образом защищенный промежуточный нонапептид также можно получить посредством твердофазного синтеза линейного нонапептида с последующим отщеплением линейной формы от твердого носителя, а затем путем последующей циклизации такой линейной формы между аминокислотными остатками в положениях 4 и 10.

Соединения согласно настоящему изобретению можно получить путем обычного синтеза пептидов с применением способов, известных специалистам в данной области техники. Подходящие способы включают твердофазный синтез, например, синтез, описанный Visser et al., J. Peptide Res., 61, 2003, 298-306, Vaara et al., Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 52, 2008, 3229-3236 или Velkov et al., ACS Chem. Biol. 9, 2014, 1172. Указанные способы включают подходящую стратегию защиты и способы проведения стадии циклизации.

При необходимости соединение формулы (I) можно по меньшей мере частично очистить, например, для разделения диастереомерных форм продукта.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложено соединение формулы (X)



где  $-\text{R}^{16}$  представляет собой водород;

$-\text{R}^{17}$  представляет собой водород;

$-\text{L}$  представляет собой ковалентную связь или метилен;

-Ag представляет собой необязательно замещенный арил, такой как замещенный фенил, и его соли, сольваты, защищенные формы и активированные формы.

Соединение формулы (X) находит применение при получении соединений формулы (I). Как правило, проводят сочетание соединения (X), например, в его защищенной форме, с защищенным нонапептидом полимиксина формулы (XI) с получением защищенной формы соединения формулы (I).

Варианты реализации соединения формулы (I) в отношении групп -L- и -Ag также применимы к соединениям формулы (X).

Обычно аминная функциональная группа, представляющая собой группу  $-NR^{16}R^{17}$ , является защищенной.

Согласно одному из вариантов реализации аминная функциональная группа в соединении формулы (X) защищена Вос- или СВZ-группой. В настоящем документе  $-R^{16}$  представляет собой водород и  $-R^{17}$  представляет собой C(O)O-t-Bu или -C(O)O-Bn.

Соединение формулы (XI) представляет собой соединение формулы (I), за исключением того, что группа  $R^{15}$ -X- представляет собой водород, а также его соли, сольваты и защищенные формы.

Выбранные варианты реализации соединения формулы (I) в отношении групп  $-R^1$ ,  $-R^2$ ,  $-R^3$ ,  $-R^4$  и  $-R^8$  также применимы к соединениям формулы (XI).

Соединение формулы (XI) обычно является защищенным, и более конкретно аминокислоты в боковых цепях аминокислотных остатков в положениях 3, 5, 8 и 9 являются защищенными, например, каждая из аминокислот в положениях 3, 5, 8 и 9 защищена Вос-группой или защищена СВZ-группой, при этом гидроксильные группы в боковых цепях аминокислотных остатков в положении 2 и необязательно в положении 10 являются защищенными, например, каждая из таких аминокислот защищена с помощью tBu-группы.

Соединение карбоновой кислоты формулы (X) можно сочетать с аминосоединением формулы (XI) с применением обычных условий амидного сочетания. Соединение формулы (X) можно применять в активированной форме, которую можно получить *in situ*, для проведения реакции с соединением формулы (XI).

Активированную форму можно получить *in situ* посредством соответствующего выбора агентов сочетания в реакции образования амидной связи, необязательно в присутствии основания.

Карбоновую кислоту формулы (X) можно активировать посредством реакции стандартного активирующего агента, такого как карбодимид, например, DIC (N,N'-диизопропилкарбодимид) или EDCI (водорастворимый карбодимид; 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид). Активированная форма кислоты представляет собой O-ацилизоmocевину.

Карбоновую кислоту можно активировать с помощью гидроксibenзотриазола или гидроксизабензотриазола, такого как HOBt (1-гидроксibenзотриазол) или HOAt (1-гидрокси-7-азабензотриазол). Активированная форма кислоты представляет собой сложный эфир.

Сложный эфир можно получить через форму, активированную карбодимидом, или его можно получить непосредственно из карбоновой кислоты, например, с применением подходящего реагента, такого как HATU, HBTU, PyBOP, PyBROP или TBTU.

Для образования активированной формы может присутствовать органическое основание, такое как DIPEA или TEA.

Защищенные формы.

Соединения согласно настоящему изобретению, такие как соединения формулы (I), (II) и (III), можно получить в защищенной форме. В этом случае реакционноспособную функциональную группу, такую как аминная функциональная группа, можно маскировать для предотвращения ее взаимодействия во время стадии синтеза. Защитную группу вводят для маскирования реакционноспособной функциональной группы, при этом такую защитную группу можно удалить на более поздней стадии синтеза для освобождения исходной реакционноспособной функциональной группы.

Согласно одному из вариантов реализации защищенная форма представляет собой соединение, в котором амина, гидроксильная, тиольная и/или карбоксильная функциональная группа защищена (маскирована) с помощью защитной группы. Согласно одному из вариантов реализации защищенная форма представляет собой соединение, в котором функциональные группы боковых цепей аминокислотных остатков в соединении являются защищенными.

В соединении формулы (I), (II) и (III) аминокислотные остатки в положениях 5, 8 и 9 представляют собой остатки Dab, при этом боковая цепь остатка Dab содержит аминную функциональную группу. Аминокислотная функциональная группа каждого остатка Dab может быть защищена с помощью аминокислотной защитной группы, как описано в настоящем документе. Аналогичным образом, аминокислотный остаток в положении 3 представляет собой Dar, при этом боковая цепь такого аминокислотного остатка содержит аминную функциональную группу.

Группа  $-R^{15}$  содержит аминную функциональную группу в форме группы  $-R^{16}R^{17}$ , например, где каждый из  $-R^{16}$  и  $-R^{17}$  представляет собой водород. Аминная функциональная группа может быть защищена с помощью аминокислотных групп, как описано в настоящем документе.

Защитные группы, такие как защитные группы для аминокислотных остатков, хорошо известны и

хорошо описаны в данной области техники.

Аминокислоты с защищенными боковыми группами, необязательно вместе с защитой amino- и карбокси-групп, являются коммерчески доступными. Соответственно, защищенное полимиксиновое соединение можно получить из исходных веществ, представляющих собой защищенные соответствующим образом аминокислоты.

Velkov et al. описывают постадийное получение полимиксиновых соединений на твердой фазе с применением защищенной подходящим образом аминокислоты. Описано применение защищенных форм треонина и Dab (см. раздел "Дополнительная информация").

При применении защитной группы ее можно удалить в условиях, которые не приводят к существенному нарушению структуры полимиксинового остова, например, в условиях, которые не изменяют стереохимию аминокислотных остатков.

Согласно одному из вариантов реализации защитные группы являются неустойчивыми к действию кислот, неустойчивыми к действию основания или могут быть удалены в восстановительных условиях.

Примеры защитных групп для аминной функциональной группы включают Boc (трет-бутоксикарбонил), Bn (бензил, Bzl), Cbz (бензилоксикарбонил, Z), 2-CL-Z (2-хлор), ivDde (1-[4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден]-3-метилбутил), Fmoc (флуоренилметилоксикарбонил), HSO<sub>3</sub>-Fmoc (сульфонилованный Fmoc, такой как 2-сульфо-Fmoc, как описано, например, в Schechter et al., J. Med. Chem. 2002, 45(19), 4264), Dde (1-[4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден]этил), Mmt (4-метокситриил), Mtt (4-метилтриил), Nvoc (6-нитровератрилоксикарбонил), Tfa (трифторацетил) и Alloc (аллилоксикарбонил).

Примеры защитных групп для ароматической азотсодержащей функциональной группы включают Boc, Mtt, Trt и Dnp (динитрофенил).

Согласно одному из вариантов реализации защитная группа для аминной функциональной группы выбрана из Boc, ivDde, Cbz, Bn и Fmoc и HSO<sub>3</sub>-Fmoc.

Согласно одному из вариантов реализации защитная группа для аминной функциональной группы представляет собой Boc, ivDde, Fmoc или Cbz, например Boc, ivDde или Cbz.

Для аминной функциональной группы, присутствующей в боковых цепях аминокислотных остатков, находящихся в положениях 5, 8 и 9 и, необязательно, в положении 3, можно обеспечить защиту с помощью Boc-группы.

Примеры защитных групп для гидроксильной функциональной группы включают Trt (триил), Bn (бензил) и tBu (трет-бутил).

Согласно одному из вариантов реализации защитная группа для гидроксильной функциональной группы представляет собой tBu.

Дополнительные примеры защитных групп включают защитные группы на основе простых силиловых эфиров, такие как TMS, TES, TBS, TIPS, TBDMS и TBDPS. Такие защитные группы можно удалить, например, с помощью TBAF.

Примеры защитных групп для карбоксильной функциональной группы включают Bn (бензил, Bz), tBu (трет-бутил), TMSET (триметилсилилэтил) и Dmab ({1-[4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден]-3-метилбутил}аминобензил).

Примеры защитных групп для ароматической азотсодержащей функциональной группы, например, когда такая функциональная группа присутствует в группе -Ar, включают Boc, Mtt, Trt и Dnp (динитрофенил).

Согласно некоторым вариантам реализации защищенными являются только определенные типы функциональных групп. Например, могут быть защищены только аминокислотные группы, такие как аминокислотные группы в боковой цепи аминокислотного остатка.

Согласно одному из вариантов реализации защищенными являются аминокислотные группы и гидроксильные группы.

LogP.

Соединение согласно настоящему изобретению, такое как соединение формулы (I), (II) или (III), может иметь коэффициент распределения, например, выраженный как значение LogP, в определенных пределах. Коэффициент распределения может указывать на липофильность соединения.

Авторы настоящего изобретения установили, что соединения с более высокой липофильностью обладают меньшей цитотоксичностью. Соединения согласно настоящему изобретению обычно имеют значения LogP, связанные с более низкой цитотоксичностью, например, значения LogP, описанные ниже.

Значение LogP для соединения можно определить экспериментально (например, путем распределения соединения между октанолом и водой) или его можно рассчитать с применением стандартных вычислительных методов.

Например, ссылка на LogP может указывать на ALogP, который можно определить с применением способов, описанных в Ghose et al. J. Phys. Chem. A, 1998, 102, 3762-3772, содержание которого в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, ALogP представляет собой оценку групповых вкладов методом Гхоуза/Криппена (Ghose/Crippen) для LogP.

Согласно одному из вариантов реализации соединение имеет определенное значение LogP, напри-

мер значение ALogP, составляющее по меньшей мере -6,5, по меньшей мере -6,6, по меньшей мере -6,7, по меньшей мере -6,8, по меньшей мере -6,9, по меньшей мере -7,0, по меньшей мере -7,5 или по меньшей мере -8,0.

Согласно одному из вариантов реализации соединение имеет определенное значение LogP, например значение ALogP, составляющее не более -6,4, не более -6,3, не более -6,2, не более -6,1, не более -6,0, не более -5,9 или не более -5,8.

Согласно одному из вариантов реализации соединение имеет значение LogP в диапазоне, имеющем верхний и нижний пределы, соответствующим образом выбранные из пределов, указанных выше, например, в диапазоне от -5,8 до -8,0, например, от -6,0 до -6,7, например, от -6,3 до -6,7. Указанные диапазоны можно выбрать, когда группа -R<sup>2</sup> представляет собой незамещенный алкил.

Согласно еще одному варианту реализации соединение имеет значение LogP в диапазоне от -6,7 до -7,4. Такой диапазон можно выбрать, когда группа -R<sup>2</sup> представляет собой алкил, содержащий в качестве заместителя одну гидроксильную группу.

Было обнаружено, что соединения, имеющие значения LogP, например значения ALogP, в приведенных выше пределах, обладают превосходной активностью против бактериальных штаммов, как чувствительных к полимиксину, так и устойчивых к полимиксину. Указанные соединения могут иметь антимикробную активность, сравнимую с полимиксином В. Предпочтительно такие соединения также могут иметь пониженную цитотоксичность по сравнению с полимиксином В.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединение, имеющее оптимальные значения LogP, можно получить путем выбора группы -R<sup>15</sup>, описанной в настоящем документе, вместе с соответствующим выбором аминокислотных остатков в положении 6 и/или 7 (например, с соответствующим выбором -R<sup>1</sup> и/или -R<sup>2</sup>).

Активный агент.

Каждое из соединений формулы (I), (II) или (III) можно применять вместе со вторым активным агентом. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что такие комбинации обладают более высокой биологической активностью, чем можно было бы ожидать, исходя из индивидуальной активности обоих соединений. Соединения формулы (I), (II) или (III) можно применять для усиления активности второго активного агента. В частности, соединения формулы (I), (II) или (III) можно применять вместе со вторым активным агентом для повышения противомикробной активности такого агента, например, в отношении грамотрицательных бактерий.

Не желая ограничиваться теорией, полагают, что соединения формулы (I), (II) или (III) воздействуют на внешнюю мембрану клетки, например, клетки грамотрицательной бактерии, что облегчает проникновение второго активного агента внутрь клетки. Соответственно, агенты, которые в других условиях не способны пройти или плохо проходят через внешнюю мембрану, могут проникать в клетку-мишень под действием соединений формулы (I), (II) или (III).

Согласно одному из вариантов реализации комбинация соединения формулы (I), (II) или (III) со вторым активным агентом проявляет активность против грамотрицательных бактерий. В этом случае необязательно, чтобы соединения формулы (I), (II) или (III) или второй активный агент обладали по отдельности активностью против грамотрицательных бактерий.

Согласно одному из вариантов реализации второй активный агент представляет собой агент, измеренное значение MIC которого в отношении определенного микроорганизма, такого как бактерия, составляет менее 10, менее 5 или менее 1 мкг/мл. Микроорганизм может представлять собой грамотрицательные бактерии, например грамотрицательные бактерии, выбранные из группы, состоящей из *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*; *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa* и *Stenotrophomonas maltophilia*.

Примеры вторых активных агентов, обладающих активностью в отношении грамотрицательных бактерий, включают бета-лактамы, тетрациклины, аминогликозиды и хинолоны.

Согласно одному из вариантов реализации второй активный агент представляет собой агент, измеренное значение MIC которого в отношении определенного микроорганизма, такого как грамотрицательная бактерия, составляет более 4, более 8, более 16 или более 32 мкг/мл. Согласно такому варианту реализации второй активный агент может обладать активностью против грамположительных бактерий. Например, второй активный агент представляет собой агент, измеренное значение MIC которого в отношении определенной грамположительной бактерии, составляет менее 10, менее 5 или менее 1 мкг/мл. В этом случае соединение формулы (I), (II) или (III) действует таким образом, чтобы облегчить проникновение второго активного агента в клетку грамотрицательной бактерии. Соответственно, второй активный агент может воздействовать на мишень внутри клетки грамотрицательной бактерии, при этом указанная мишень может представлять собой ту же мишень, что и мишень второго активного агента в клетке грамположительной бактерии.

Грамположительные бактерии можно выбрать из группы, состоящей из бактерий *Staphylococcus* и *Streptococcus*, таких как *S. aureus* (в том числе MRSA), *S. epidermis*, *E. faecalis* и *E. faecium*.

Примеры вторых активных агентов, обладающих активностью против грамположительных бактерий (например, со значениями MIC, приведенными выше) и умеренной активностью против грамотрица-

тельных бактерий, включают рифампицин, новобиоцин, макролиды, плевомутилины. Согласно одному из вариантов реализации соединение, обладающее умеренной активностью против грамотрицательных бактерий, может характеризоваться измеренным значением МИС в отношении грамотрицательной бактерии, составляющим менее 32, менее 64 или менее 128 мкг/мл.

Кроме того, подходящими для применения являются агенты, обладающие активностью против грамположительных бактерий, которые по существу являются неактивными против грамотрицательных бактерий. Примеры включают фузидовую кислоту, оксазолидины (например, линезолид), гликопептиды (например, ванкомицин), даптомицин и лантибиотики. Согласно одному из вариантов реализации соединение, по существу не обладающее активностью против грамотрицательных бактерий, может характеризоваться измеренным значением МИС в отношении грамотрицательной бактерии, составляющим более 32, более 64, более 128, более 256 мкг/мл.

В нормальных условиях такие агенты не обязательно подходят для применения против грамотрицательных бактерий вследствие их относительно низкой способности проходить через наружную мембрану клетки грамотрицательной бактерии. Как объяснено выше, такие агенты подходят для применения в случае, когда их применяют вместе с соединением формулы (I), (II) или (III).

Согласно одному из вариантов реализации активный агент можно выбрать из группы, состоящей из рифампицина (рифампина), рифабутина, рифалазила, рифапентина, рифаксимины, азтреонама, оксациллина, новобиоцина, фузидовой кислоты, азитромицина, ципрофлоксацина, меропенема, тигециклина, миноциклина, эритромицина, кларитромицина и мупироцина и их фармацевтически приемлемых солей, сольватов и пролекарственных форм.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что полимиксиновые соединения формулы (I), (II) или (III) можно применять вместе с некоторыми соединениями семейства рифамицина для лечения микробных инфекций. Семейство рифамицина включает изоляты рифамицина A, B, C, D, E, S и SV, а также синтетически дериватизированные варианты таких соединений, например, рифампицин (рифампин), рифабутин, рифалазил, рифапентин и рифаксимин и их фармацевтически приемлемые соли и сольваты.

Согласно одному из вариантов реализации активный агент представляет собой рифампицин (рифампин) и его фармацевтически приемлемые соли, сольваты и пролекарственные формы.

Соли, сольваты и другие формы.

Примеры солей соединения формулы (I), (II) и (III) включают все фармацевтически приемлемые соли, например, без ограничения, соли присоединения сильных минеральных кислот, такие как соли HCl и HBr, и соли присоединения сильных органических кислот, такие как соль метансульфоновой кислоты. Дополнительные примеры солей включают сульфаты и ацетаты, такие как ацетат таковой, трифтороацетат или трихлорацетат.

Согласно одному из вариантов реализации соединения, предложенные в настоящем изобретении, получают в форме сульфатной соли или соли трифторуксусной кислоты (ТФУК). Согласно одному из вариантов реализации соединения, предложенные в настоящем изобретении, получают в форме ацетатных солей, таких как ацетат.

Соединение формулы (I), (II) или (III) также можно получить в виде пролекарства. Пролекарства могут включать антибактериальное соединение, описанное в настоящем документе, в котором одна или более аминогрупп защищены с помощью группы, которую можно отщепить *in vivo* для высвобождения биологически активного соединения. Согласно одному из вариантов реализации пролекарство представляет собой "аминосодержащее пролекарство". Примеры аминосодержащих пролекарств включают сульфометил, описанный, например, в Bergen et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 2006, 50, 1953, или HSO<sub>3</sub>-FMOС, описанный, например, в Schechter et al., *J. Med. Chem.* 2002, 45(19), 4264, и их соли. Другие примеры аминосодержащих пролекарств приведены Krise и Oliyai в *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*, 2007, 5(2), 101-131.

Согласно одному из вариантов реализации соединение формулы (I), (II) или (III) предоставляют в форме пролекарства.

Ссылка на соединение формулы (I), (II) или (III) или любое другое соединение, описанное в настоящем документе, также является указанием на сольват такого соединения. Примеры сольватов включают гидраты.

Соединение формулы (I), (II) или (III) или любое другое соединение, описанное в настоящем документе, включает соединение, в котором один из атомов заменен на природный или не встречающийся в природе изотоп. Согласно одному из вариантов реализации изотоп представляет собой стабильный изотоп. Таким образом, описанное в настоящем документе соединение включает, например, соединения, содержащие дейтерий, и т.п. Например, H может быть в любой изотопной форме, в том числе <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H (D) и <sup>3</sup>H (T); C может быть в любой изотопной форме, в том числе <sup>12</sup>C, <sup>13</sup>C и <sup>14</sup>C; O может быть в любой изотопной форме, в том числе <sup>16</sup>O и <sup>18</sup>O; и т.п.

Некоторые соединения формулы (I), (II) или (III) или любое другое соединение, описанное в настоящем документе, могут существовать в одной или более определенных геометрических, оптических, энантиомерных, диастереомерных, эпимерных, атропо-, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, в том числе, но не ограничиваясь ими: в цис- и транс-формах; E- и



Z-формах; с-, t- и г- формах; эндо- и экзо-формах; R-, S- и мезо-формах; D- и L-формах; d- и l-формах; (+) и (-) формах; кето-, енольных и енолятных формах; син- и антиформах; синклинальных и антиклинальных формах;  $\alpha$ - и  $\beta$ -формах; аксиальных и экваториальных формах; в форме ванны, форме кресла, твист-форме, форме конверта и форме полукресла и их комбинациях, которые далее в настоящем документе обозначают общим термином "изомеры" (или "изомерные формы").

Следует отметить, что за исключением рассматриваемых ниже таутомерных форм, из применяемого в настоящем документе термина "изомеры" специально исключены структурные (или относящиеся к строению) изомеры (т.е. изомеры, которые различаются связями между атомами, а не просто положением атомов в пространстве). Например, ссылку на метокси-группу,  $-\text{OCH}_3$ , не следует рассматривать как указание на ее структурный изомер, гидроксиметильную группу,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . Аналогичным образом, ссылку на орто-хлорфенил не следует рассматривать как указание на его структурный изомер, мета-хлорфенил. Однако ссылка на определенный класс структур также может включать структурные изомерные формы, относящиеся к такому классу (например,  $\text{C}_{1-6}$ алкил включает n-пропил и изопропил; бутил включает n-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и пара-метоксифенил).

Если не указано иное, ссылка на конкретное соединение включает все такие изомерные формы, в том числе их смеси (например, рацемические смеси). Способы получения (например, асимметрический синтез) и разделения (например, фракционная кристаллизация и хроматографические методы) таких изомерных форм либо известны в данной области техники, либо могут быть легко обеспечены путем адаптации способов, описанных в настоящем документе, или известных способов, известным образом.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к соединениям по существу в очищенной форме и/или в форме, по существу не содержащей примесей.

Согласно одному из вариантов реализации по существу очищенная форма составляет по меньшей мере 50% по массе, например, по меньшей мере 60% по массе, например, по меньшей мере 70% по массе, например, по меньшей мере 80% по массе, например, по меньшей мере 90% по массе, например, по меньшей мере 95% по массе, например, по меньшей мере 97% по массе, например, по меньшей мере 98% по массе, например, по меньшей мере 99% по массе.

Если не указано иное, по существу очищенная форма относится к соединению в любой стереоизомерной или энантиомерной форме. Например, согласно одному из вариантов реализации по существу очищенная форма относится к смеси стереоизомеров, т.е. очищена относительно других соединений. Согласно одному из вариантов реализации по существу очищенная форма относится к одному стереоизомеру, например, оптически чистому стереоизомеру. Согласно одному из вариантов реализации по существу очищенная форма относится к смеси энантиомеров. Согласно одному из вариантов реализации по существу очищенная форма относится к эквимолярной смеси энантиомеров (т.е. рацемической смеси, рацемату). Согласно одному из вариантов реализации по существу очищенная форма относится к одному энантиомеру, например, оптически чистому энантиомеру.

Согласно одному из вариантов реализации примеси составляют не более 50% по массе, например, не более 40% по массе, например, не более 30% по массе, например, не более 20% по массе, например, не более 10% по массе, например, не более 5% по массе, например, не более 3% по массе, например, не более 2% по массе, например, не более 1% по массе.

Если не указано иное, примеси относятся к другим соединениям, т.е. отличным от стереоизомеров или энантиомеров. Согласно одному из вариантов реализации примеси относятся к другим соединениям и другим стереоизомерам. Согласно одному из вариантов реализации примеси относятся к другим соединениям и другому энантиомеру.

Согласно одному из вариантов реализации оптическая чистота по существу очищенной формы составляет по меньшей мере 60% (т.е. 60% соединения, в расчете на моли, представляет собой требуемый стереоизомер или энантиомер, и 40% представляет собой нежелательный стереоизомер или энантиомер), например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 97%, например, по меньшей мере 98%, например, по меньшей мере 99%.

Способы лечения.

Соединения формулы (I), (II) или (III) или фармацевтические составы, содержащие такие соединения, подходят для применения в способах лечения и профилактики. Указанные соединения можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом. Такие соединения подходят для применения совместно с активным агентом ("вторым активным агентом"), например вторым активным агентом, представляющим собой противомикробный агент.

Соединения формулы (I), (II) или (III) предназначены для применения в способе лечения организма человека или животного. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения соединение формулы (I), (II) или (III) можно вводить млекопитающему субъекту, такому как человек, для лечения микробной инфекции.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению соединения формулы (I) или (II) при получении лекарственного средства для применения при лечении. Согласно одному из вариантов реализации лекарственное средство содержит соединение формулы (I), (II) или (III). Согласно одному из

вариантов реализации лекарственное средство предназначено для применения при лечении микробной инфекции.

Термин "микробная инфекция" относится к заражению хозяина, представляющего собой животное, патогенными микробами. Такая инфекция включает избыточный рост микробов, которые обычно присутствуют на теле животного или внутри него. В более общем смысле микробная инфекция может представлять собой любую ситуацию, при которой присутствие микробной популяции(ий) наносит вред хозяину, представляющему собой животное. Соответственно, животное "страдает" от микробной инфекции, когда на теле животного или внутри него присутствуют избыточные количества микробной популяции или когда присутствие микробной популяции(ий) наносит вред клеткам или другим тканям животного.

Предложенные соединения можно применять для лечения субъекта с микробной инфекцией или подверженного риску инфицирования микроорганизмом, таким как бактерия.

Микробная инфекция может представлять собой бактериальную инфекцию, такую как инфекция, вызванная грамотрицательной бактерией.

Примеры грамотрицательных бактерий включают, но не ограничиваются ими, *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp. и другие *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas* и *Legionella* и многие другие.

Имеющие медицинское значение грамотрицательные бациллы включают множество видов. Некоторые из них вызывают в основном респираторные проблемы (*Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*), в основном проблемы с мочевыводящими путями (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*) и в основном проблемы с желудочно-кишечным трактом (*Salmonella enterica*).

Грамотрицательные бактерии, связанные с внутрибольничными инфекциями, включают *Acinetobacter baumannii*, которая вызывает бактериемию, вторичный менингит и вентиляторно-ассоциированную пневмонию в реанимационных отделениях лечебных заведений.

Согласно одному из вариантов реализации вид грамотрицательных бактерий выбран из группы, состоящей из *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*; *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa* и *Stenotrophomonas maltophilia*.

Согласно одному из вариантов реализации вид грамотрицательных бактерий выбран из группы, состоящей из *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *A. baumannii*.

Соединения формулы (I), (II) или (III) или композиции, содержащие такие соединения, можно применять для лечения инфекций кожи и мягких тканей, желудочно-кишечной инфекции, инфекции мочевыводящих путей, пневмонии, сепсиса, внутрибрюшной инфекции и акушерских/гинекологических инфекций. Инфекции могут представлять собой инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями.

Соединения формулы (I), (II) или (III) или композиции, содержащие такие соединения, можно применять для лечения инфекций, вызванных *Pseudomonas*, в том числе инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, например инфекций кожи и мягких тканей, желудочно-кишечной инфекции, инфекции мочевыводящих путей, пневмонии и сепсиса.

Соединения формулы (I), (II) или (III) или композиции, содержащие такие соединения, можно применять для лечения инфекций, вызванных акинетобактериями *Acinetobacter*, в том числе инфекции, вызванной *A. baumannii*, в случае пневмонии, раневых инфекций, инфекции мочевыводящих путей и сепсиса.

Соединения формулы (I), (II) или (III) или композиции, содержащие такие соединения, можно применять для лечения инфекций, вызванных *Klebsiella*, в том числе инфекции, вызванной *K. pneumoniae*, в случае пневмонии, внутрибрюшной инфекции, инфекции мочевыводящих путей, менингита и сепсиса.

Соединения формулы (I), (II) или (III) или композиции, содержащие такие соединения, можно применять для лечения инфекции, вызванной *E. coli*, в том числе инфекций, вызванных *E. coli*, в случае бактериемии, холецистита, холангита, внутрибрюшной инфекции, инфекции мочевыводящих путей, менингита и пневмонии у новорожденных.

Соединения формулы (I), (II) или (III) или композиции, содержащие такие соединения, можно применять в способах лечения совместно с активным агентом.

Активный агент может представлять собой агент, обладающий активностью против микроорганизма. Активный агент может быть активен против грамотрицательных бактерий. Активный агент может быть активен против микроорганизма, выбранного из приведенного выше перечня.

Согласно одному из вариантов реализации второй активный агент имеет значение МИС, составляющее 10 мкг/мл или менее, в отношении микроорганизма, такого как *E. coli*, в отсутствие соединения формулы (I), (II) или (III). Микроорганизм может представлять собой микроорганизм, выбранный из перечисленной выше группы.

В настоящем документе описаны конкретные соединения для применения в качестве вторых активных агентов, включающие:

рифампицин, рифабутин, рифалазил, рифапентин и рифаксимин;

оксациллин, метициллин, ампициллин, клоксациллин, карбенициллин, пиперациллин, трикарцил-

лин, флуклоксациллин и нафциллин;  
азитромицин, кларитромицин, эритромицин, телитромицин, цетромицин и солитромицин;  
азтреонам и BAL30072;  
меропенем, дорипенем, имипенем, эртапенем, биापенем, томопенем и панипенем;  
тигециклин, омадациклин, эравациклин, доксициклин и миноциклин;  
ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин и делафлоксацин;  
фузидовую кислоту;  
новобиоцин;  
тейкопланин, телаванцин, далбаванцин и оритаванцин  
и их фармацевтически приемлемые соли и сольваты;

Согласно одному из вариантов реализации в настоящем документе описаны конкретные соединения для применения в качестве вторых активных агентов, включающие рифампицин (рифампин), рифабутин, рифалазил, рифапентин, рифаксимин, азтреонам, оксациллин, новобиоцин, фузидовую кислоту, азитромицин, ципрофлоксацин, меропенем, тигециклин, эритромицин, кларитромицин и мупиноцин и их фармацевтически приемлемые соли и сольваты.

Согласно альтернативному аспекту соединения формулы (I) подходят для применения при лечении грибковых инфекций, например, в комбинации с противогрибковым агентом. Противогрибковый агент можно выбрать из полиенового противогрибкового средства, например амфотерицина В, имидазольного, триазольного или тиазольного противогрибкового средства, например миконазола, флуконазола или абафунгина, аллиламина, эхинокандина или другого агента, например циклопирокса.

Лечение.

В настоящем документе термин "лечение" в контексте лечения состояния относится в общем случае к лечению и терапии, будь то человека или животного (например, в ветеринарии), при которых достигается некоторый требуемый терапевтический эффект, например подавление прогрессирования состояния, при этом указанный термин включает снижение скорости прогрессирования, торможение скорости прогрессирования, облегчение симптомов состояния, улучшение состояния и излечение состояния. Также включено лечение в качестве профилактической меры (т.е. профилактика). Например, в термин "лечение" включено применение пациентами, у которых еще не развилось состояние, но которые подвержены риску развития состояния.

В настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству соединения или вещества, композиции или лекарственной формы, содержащей соединение, которое является эффективным с точки зрения обеспечения некоторого требуемого терапевтического эффекта, соизмеримого с разумным соотношением польза/риск, при введении согласно требуемой схеме лечения.

Термин "лечение" включает комбинированные способы лечения и терапии, описанные в настоящем документе, при которых два или более способа лечения или терапии объединены, например, для применения последовательно или одновременно.

Комбинированная терапия.

Соединение формулы (I), (II) или (III) можно вводить вместе с активным агентом. Введение может быть одновременным, отдельным или последовательным.

Способы и порядок введения будут зависеть от фармакокинетики соединения формулы (I), (II) или (III) и второго активного агента.

Под "одновременным" введением подразумевают, что соединение формулы (I), (II) или (III) и второй активный агент вводят субъекту в однократной дозе с применением одного и того способа введения.

Под "раздельным" введением подразумевают, что соединение формулы (I), (II) или (III) и второй активный агент вводят субъекту двумя различными способами введения, которое осуществляют в одно и то же время. Это может происходить, например, когда один агент вводят путем инфузии, а другой дают перорально в процессе инфузии.

Под "последовательным" введением подразумевают, что два агента вводят в разные моменты времени, при условии, что активность первого введенного агента присутствует и сохраняется у субъекта в момент введения второго активного агента.

В общем случае последовательное введение осуществляют таким образом, чтобы второй из двух агентов был введен в течение 48 ч, например, в течение 24 ч, например, в течение 12, 6, 4, 2 или 1 ч после введения первого агента. Альтернативно, вначале можно ввести активный агент, а затем соединение формулы (I), (II) или (III).

В конечном счете, порядок и режим введения предложенного соединения и второго активного агента при комбинированном лечении будет зависеть от фармакокинетических свойств каждого из них.

Количество соединения формулы (I), (II) или (III), подлежащего введению субъекту, в конечном счете будет зависеть от природы субъекта и заболевания, подвергаемого лечению. Аналогичным образом, количество активного агента, подлежащего введению субъекту, в конечном счете будет зависеть от природы субъекта и заболевания, подвергаемого лечению.

#### Составы.

Согласно одному из аспектов в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I), (II) или (III) вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать второй активный агент. Согласно одному из альтернативных вариантов реализации, в котором используют второй активный агент для применения в терапии, указанный второй активный агент можно приготовить отдельно от соединения формулы (I), (II) или (III). Соответственно, приведенные ниже комментарии в отношении соединения формулы (I), (II) или (III), также можно применять ко второму активному агенту, приготовленному отдельно.

Хотя возможно введение соединения формулы (I), (II) или (III) самого по себе или вместе со вторым активным агентом, желательно присутствие указанного соединения в виде фармацевтического состава (например, композиции, препарата, лекарственного средства), содержащего по меньшей мере одно соединение формулы (I), (II) или (III), описанное в настоящем документе, вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь ими: фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями, вспомогательными веществами, адъювантами, наполнителями, буферами, консервантами, антиоксидантами, смазывающими веществами, стабилизаторами, солубилизаторами, поверхностно-активными веществами (например, смачивающими агентами), маскирующими агентами, красителями, вкусоароматическими веществами и подсластителями. Такой состав может дополнительно содержать и другие активные агенты, например, другие терапевтические или профилактические средства.

Соответственно, в настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, определенные выше, и способы получения фармацевтической композиции, включающие смешивание по меньшей мере одного соединения формулы (I), (II) или (III), описанного в настоящем документе, с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, например, носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и т.д. В случае получения в виде дискретных элементов (например, таблеток и т.д.), каждый элемент содержит заранее определенное количество (дозировку) соединения. Предложенная композиция необязательно может дополнительно содержать второй активный агент в заранее определенном количестве.

В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к соединениям, ингредиентам, веществам, композициям, дозированным лекарственным формам и т.д., которые с медицинской точки зрения подходят для применения в контакте с тканями конкретного субъекта (например, человека) без проявления излишней токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений при разумном соотношении польза/риск. Каждый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество и т.д. также должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава.

Подходящие носители, разбавители, вспомогательные вещества и т.д. можно найти в стандартных фармацевтических руководствах, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5<sup>th</sup> edition, 2005.

Составы можно приготовить любыми способами, известными в области фармацевтики. Такие способы включают стадию объединения соединения формулы (I) или (II) с носителем, представляющим собой один или более вспомогательных ингредиентов. В общем случае, составы получают путем равномерного и тщательного объединения предложенного соединения с носителями (например, жидкими носителями, тонкоизмельченным твердым носителем и т.д.) с последующим приданием продукту формы, при необходимости.

Состав можно приготовить таким образом, чтобы обеспечить быстрое или медленное высвобождение, немедленное, отсроченное высвобождение, высвобождение в выбранное время или замедленное высвобождение или их комбинацию.

Соответственно, составы могут быть в форме жидкостей, растворов (например, водных, неводных), суспензий (например, водных, неводных), эмульсий (например, типа масло-в-воде, вода-в-масле), эликсиров, сиропов, электуариев, ополаскивателей для рта, капель, таблеток (в том числе, например, таблеток с покрытием), гранул, порошков, таблеток для рассасывания, пастилок, капсул (в том числе, например, твердых и мягких желатиновых капсул), саше, пилюлей, ампул, болюсов, суппозиториев, пессариев, микстур, гелей, паст, мазей, кремов, лосьонов, масел, пенки, спреев, туманов или аэрозолей.

Соответственно, составы можно приготовить в виде пластыря, лейкопластыря, повязки, перевязочных материалов и т.п., пропитанных одним или более соединениями и необязательно одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, в том числе, например, веществами, усиливающими проникновение, проницаемость и поглощение. Соответственно, составы также можно приготовить в форме депо или резервуара.

Предложенное соединение можно растворять или суспендировать в одном или более фармацевтически приемлемых ингредиентах или смешивать с ними. Предложенное соединение может находиться в липосоме или других микрочастицах, предназначенных для целевой доставки соединения, например, в компоненты крови или один или более органов. Следует отметить, что при применении липосомы ука-

занная липосома может содержать как соединение формулы (III), так второй активный агент.

Составы, подходящие для перорального введения (например, путем проглатывания) включают жидкости, растворы (например, водные, неводные), суспензии (например, водные, неводные), эмульсии (например, типа масло-в-воде, вода-в-масле), эликсиры, сиропы, электуарии, таблетки, гранулы, порошки, капсулы, саше, пилюли, ампулы, болюсы.

Составы, подходящие для буккального введения, включают ополаскиватели для рта, таблетки для рассасывания, пастилки, а также пластыри, лейкопластыри, депо и резервуары. Таблетки для рассасывания обычно содержат соединение в ароматизированной основе, как правило, сахарозе и гуммиарабике или трагаканте. Пастилки обычно содержат соединение в инертной матрице, такой как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик. Ополаскиватели для рта обычно содержат соединение в подходящем жидком носителе.

Составы, подходящие для подъязычного введения, включают таблетки, таблетки для рассасывания, пастилки, капсулы и пилюли.

Составы, подходящие для трансмукозального введения пероральным путем, включают жидкости, растворы (например, водные, неводные), суспензии (например, водные, неводные), эмульсии (например, типа масло-в-воде, вода-в-масле), ополаскиватели для рта, таблетки для рассасывания, пастилки, а также пластыри, лейкопластыри, депо и резервуары.

Составы, подходящие для трансмукозального введения непероральным путем, включают жидкости, растворы (например, водные, неводные), суспензии (например, водные, неводные), эмульсии (например, типа масло-в-воде, вода-в-масле), суппозитории, пессарии, гели, пасты, мази, кремы, лосьоны, масла, а также пластыри, лейкопластыри, депо и резервуары.

Составы, подходящие для трансдермального введения, включают гели, пасты, мази, кремы, лосьоны и масла, а также пластыри, лейкопластыри, повязки, перевязочные материалы, депо и резервуары.

Таблетки можно получить обычными способами, например, путем прессования или формования, необязательно с применением одного или более вспомогательных ингредиентов. Прессованные таблетки можно получить путем прессования в подходящем устройстве предложенного соединения в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанного с одним или более связывающими веществами (например, повидоном, желатином, гуммиарабиком, сорбитом, трагакантом, гидроксипропилметилцеллюлозой); наполнителями или разбавителями (например, лактозой, микрокристаллической целлюлозой, гидрофосфатом кальция), смазывающими веществами (например, стеаратом магния, тальком, диоксидом кремния), разрыхлителями (например, натрия крахмала гликолятом, сшитым повидоном, сшитой карбоксиметилцеллюлозой натрия), поверхностно-активными или диспергирующими или смачивающими веществами (например, лаурилсульфатом натрия), консервантами (например, метил-п-гидроксibenзоатом, пропил-п-гидроксibenзоатом, сорбиновой кислотой); ароматизаторами, усилителями вкуса и подсластителями. Формованные таблетки могут получить путем формования в подходящем устройстве смеси порошкообразного соединения, смоченного инертным жидким разбавителем. Таблетки могут необязательно содержать покрытие или насечки и могут быть получены таким образом, чтобы обеспечить замедленное или контролируемое высвобождение содержащегося в них соединения путем применения, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных соотношениях для обеспечения требуемого профиля высвобождения. Таблетки необязательно могут быть снабжены покрытием, например, для воздействия на высвобождение, например, кишечнорастворимым покрытием, для обеспечения высвобождения в частях кишечника, отличных от желудка.

Мази обычно получают из соединения и парафиновой или смешивающейся с водой основы для мази.

Кремы обычно получают из соединения и основы для крема типа масло-в-воде. При необходимости, водная фаза основы для крема может содержать, например, по меньшей мере примерно 30% мас./мас. многоатомного спирта, т.е. спирта, содержащего две или более гидроксильные группы, такого как бутан-1,3-диол, маннитол, сорбит, глицерин и полиэтиленгликоль и их смеси. Может быть желательно, чтобы составы для наружного применения содержали соединение, усиливающее поглощение или проникновение соединения через кожу или другие пораженные области. Примеры таких веществ, усиливающих проникновение через кожу, включают диметилсульфоксид и родственные аналоги.

Эмульсии обычно получают из соединения и масляной фазы, которая может необязательно содержать только эмульгатор (также известный как эмульгент) или может содержать смесь по меньшей мере одного эмульгатора с жиром или маслом или как с жиром, так и с маслом. Гидрофильный эмульгатор можно использовать вместе с липофильным эмульгатором, действующим как стабилизатор. Также возможно применение как и масла, так и жира. Эмульгатор(ы) совместно со стабилизатором(ами) или без него образуют так называемый эмульгирующий воск, при этом такой воск вместе с маслом и/или жиром составляют так называемую эмульгирующую основу мази, которая образует масляную диспергированную фазу составов в форме крема.

Подходящие эмульгенты и стабилизаторы эмульсий включают Tween 60, Span 80, цетостеариловый спирт, миристиловый спирт, глицерил моностеарат и лаурилсульфат натрия. Выбор подходящих масел или жиров для указанного состава основан на обеспечении требуемых косметических свойств, поскольку

растворимость предложенного соединения в большинстве масел, которые вероятно будут применяться в фармацевтических эмульсионных составах, может быть очень низкой. Соответственно, крем должен представлять собой нежирный, не оставляющий пятен и смываемый продукт с подходящей консистенцией для избежания вытекания из тюбиков или других контейнеров. Можно применять одно- или двухосновные сложные алкиловые эфиры с прямой или разветвленной цепью, такие как диизоадипат, изоцетиластеарат, диэфир пропиленгликоля и жирных кислот кокосового масла, изопропилмириститат, децилолеат, изопропилпальмитат, бутилстеарат, 2-этилгексилпальмитат или смесь сложных эфиров с разветвленной цепью, известную как Crodamol CAP. В зависимости от требуемых свойств указанные компоненты можно применять по отдельности или в комбинации. Альтернативно, можно использовать липиды с высокой температурой плавления, такие как мягкий белый парафин и/или вазелиновое масло или другие минеральные масла.

Составы, подходящие для интраназального введения, в которых носитель представляет собой жидкость, включают, например, назальный спрей, назальные капли или средства для введения в форме аэрозоля при помощи небулайзера, и содержат водные или масляные растворы предложенного соединения. В качестве альтернативного способа введения можно применять средство доставки в форме сухого порошка как альтернативу распыляемым аэрозолям.

Составы, подходящие для интраназального введения, в которых носитель представляет собой твердое вещество, включают, например, составы, приготовленные в форме крупного порошка с размером частиц, например, в диапазоне от примерно 20 до примерно 500 мкм, который вводят таким же образом, каким принимают нюхательный табак, т.е. путем быстрого вдыхания через носовые ходы из контейнера с порошком, который держат вблизи носа.

Составы, подходящие для введения пульмональным способом (например, путем ингаляционной или инсuffляционной терапии) включают составы, приготовленные в форме аэрозольного спрея в упаковке под давлением, с применением подходящего пропеллента, такого как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другие подходящие газы. Дополнительно или альтернативно, состав для введения пульмональным способом можно приготовить в форме для введения из небулайзера или ингалятора сухого порошка. Например, предложенный состав можно снабдить носителями или липосомами для обеспечения размера частиц, подходящего для достижения соответствующих частей легкого, для облегчения доставки соответствующей дозы, для улучшения удерживания в легочной ткани.

Составы, подходящие для глазного введения, включают глазные капли, в которых предложенное соединение растворено или суспендировано в подходящем носителе, в частности, в водном растворителе для данного соединения.

Составы, подходящие для ректального введения, могут быть приготовлены в форме суппозитория с подходящей основой, содержащей, например, природные или гидрогенизированные масла, воски, жиры, полутвердые или жидкие многоатомные спирты, например масло какао или салицилат, или в форме раствора или суспензии для лечения с применением клизмы.

Составы, подходящие для вагинального введения, можно приготовить в форме pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пенки или спрея, содержащих, в дополнение к предложенному соединению, подходящие носители, известные в данной области техники.

Составы, подходящие для парентерального введения (например, путем инъекции или инфузии, внутривенно или подкожно), включают водные или неводные, изотонические, апиогенные, стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых предложенное соединение растворено, суспендировано или находится в другом виде (например, в липосоме или другой микрочастице). Такие жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферные растворы, консерванты, стабилизаторы, бактериостатики, суспендирующие вещества, загустители и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным крови (или другой соответствующей физиологической жидкости) предполагаемого реципиента. Примеры вспомогательных веществ включают, например, воду, спирты, сахара, многоатомные спирты, глицерин, растительные масла и т.п. Примеры подходящих изотонических носителей для применения в таких составах включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера или лактатный раствор Рингера для инъекций. Как правило, концентрация предложенного соединения в жидкости составляет от примерно 1 нг/мл до примерно 500 мкг/мл, например, от примерно 1 нг/мл до примерно 100 мкг/мл, например, от примерно 10 нг/мл до примерно 10 мкг/мл, например, от примерно 10 нг/мл примерно до 1 мкг/мл. Составы могут находиться в закрытых однодозных или многодозных контейнерах, например ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Дозировка.

В общем случае способы согласно настоящему изобретению могут включать введение субъекту эффективного количества соединения формулы (I), (II) или (III) для обеспечения противомикробного эффекта. Соединение формулы (I), (II) или (III) можно вводить в количестве, достаточном для усиления

активности второго активного агента. Второй активный агент вводят субъекту в эффективном количестве для обеспечения противомикробного действия.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что соответствующие дозировки соединения формулы (I), (II) или (III) или активного агента и композиций, содержащих соединение формулы (I), (II) или (III) или активный агент, могут меняться от пациента к пациенту. Определение оптимальной дозировки включает в общем случае уравнивание уровня терапевтической пользы относительно любого риска или нежелательных побочных эффектов. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от различных факторов, в том числе, но не ограничиваясь ими, от активности конкретного соединения формулы (I), (II) или (III) или активного агента, пути введения, времени введения, скорости выведения предложенного соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или веществ, применяемых в комбинации, тяжести состояния и вида, пола, возраста, массы, состояния, общего состояния здоровья и предыдущей медицинской истории пациента. Количество соединения формулы (I), (II) или (III) или активного агента и путь введения будут в конечном счете определяться по усмотрению врача, ветеринара или клинициста, хотя в общем случае дозировку выбирают таким образом, чтобы получить в месте приложения действия локальные концентрации, обеспечивающие требуемый эффект без проявления значительных вредных или разрушительных побочных эффектов.

Введение можно осуществлять одной дозой, непрерывно или периодически (например, разделенными дозами через соответствующие интервалы) на протяжении курса лечения. Способы определения наиболее эффективного средства и дозировки для введения хорошо известны специалистам в данной области техники и будут меняться в зависимости от состава, применяемого для терапии, цели терапии, клетки(клеток)-мишени, подвергаемой лечению, и субъекта, подвергаемого лечению. Можно осуществлять однократное или многократные введения, при этом величину дозы и схему введения выбирает лечащий врач, ветеринар или клиницист.

В общем случае подходящая доза соединения формулы (I), (II) или (III) или активного агента составляет от примерно 10 мкг до примерно 250 мг (в более типичном случае от примерно 100 мкг до примерно 25 мг) на 1 кг массы тела субъекта в день. В случае, когда соединение формулы (I), (II) или (III) или активный агент представляют собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство и т.п., вводимое количество рассчитывают на основе исходного соединения и, таким образом, фактически применяемую массу увеличивают пропорционально.

#### Наборы.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к набору, включающему (а) соединение формулы (I), (II) или (III) или композицию, содержащую соединение, определенное в любой из формул (I), (II) или (III), например, обычно поставляемые в подходящем контейнере и/или с подходящей упаковкой; и (б) инструкции по применению, например, письменные инструкции относительно того, как вводить соединение или композицию.

Письменные инструкции могут также включать список показаний, для которых соединение формулы (I), (II) или (III) является подходящим средством лечения.

Согласно одному из вариантов реализации набор дополнительно включает (с) второй активный агент или композицию, содержащую второй активный агент. В этом случае письменные инструкции могут также включать список показаний, для которых второй активный агент вместе с соединением формулы (I), (II) или (III) подходит для лечения.

#### Пути введения.

Соединение формулы (I), (II) или (III), второй активный агент или фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I), (II) или (III) или второй активный агент, можно вводить субъекту посредством любого удобного пути введения, либо системного/периферического, либо местного (т.е. в место приложения требуемого действия).

Пути введения включают, но не ограничиваются ими, пероральное (например, путем проглатывания), буккальное, подъязычное, трансдермальное (в том числе, например, с применением пластыря, повязки и т.д.), трансмукозальное (в том числе, например, с применением пластыря, повязки и т.д.), интраназальное (например, с применением назального спрея), глазное (например, посредством глазных капель) введение, введение пульмональным способом (например, путем ингаляционной или инсuffляционной терапии с применением, например, аэрозоля, например, через рот или нос), ректальное (например, с применением суппозитория или клизмы), вагинальное (например, с применением пессария), парентеральное введение, например, путем инъекции или инфузии, в том числе подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисуставной, интратекальной, интраспинальной, интракапсулярной, субкапсулярной, интраорбитальной, внутрибрюшинной, интратрахеальной, подэпидермисной, внутрисуставной, субарахноидальной и чрескожной; посредством имплантирования депо или резервуара, например, подкожно или внутримышечно.

#### Субъект/пациент.

Субъект/пациент может представлять собой хордовое, позвоночное, млекопитающее, плацентарное млекопитающее, сумчатое (например, кенгуру, вомбат), грызуна (например, морскую свинку, хомяка, крысу, мышь), представителя подсемейства мышиных (например, мышь), зайцеобразное (например, кро-

лика), пернатого (например, птицу), представителя семейства псовых (например, собаку), представителя семейства кошачьих (например, кошку), представителя семейства лошадиных (например, лошадь), представителя подотряда свинообразных (например, свинью), представителя рода баранов (например, овцу), жвачное животное (например, корову), примата, представителя обезьянообразных (например, обезьяну или человекообразную обезьяну), обезьяну (например, игрунку, бабуина), человекообразную обезьяну (например, гориллу, шимпанзе, орангутанга, гиббона) или человека. Кроме того, субъект/пациент может находиться на любой стадии своего развития, например представлять собой плод.

Согласно одному из предпочтительных вариантов реализации субъект/пациент представляет собой человека.

Также предполагается, что настоящее изобретение можно применять для животного с микробной инфекцией, не являющегося человеком. Не являющееся человеком млекопитающее может представлять собой грызуна. Грызуны включают крыс, мышей, морских свинок, шиншилл и других близких по размеру мелких грызунов, применяемых в лабораторных исследованиях.

Другие варианты.

Практически каждая совместимая комбинация вариантов реализации, приведенных выше, описана в настоящем документе в явном виде, как если бы все и каждая комбинации были указаны отдельно и в явном виде.

Различные дополнительные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники на основании настоящего описания.

В настоящем документе "и/или" следует понимать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе друг с другом или друг без друга. Например, "А и/или В" следует понимать как конкретное описание каждого из следующих вариантов: (i) А, (ii) В и (iii) А и В, просто как если бы каждый из таких вариантов был приведен в настоящем документе отдельно.

Если контекст не указывает на иное, описания и определения приведенных выше признаков не ограничены каким-либо конкретным аспектом или вариантом реализации настоящего изобретения и в равной степени применимы ко всем описанным аспектам и вариантам реализации. В случае, когда возможно объединение технически подходящих вариантов реализации, настоящее описание, соответственно, распространяется на все перестановки и комбинации вариантов реализации, представленных в настоящем документе.

Некоторые аспекты и варианты реализации настоящего изобретения проиллюстрированы ниже с применением примеров и со ссылкой на описанные выше фигуры.

### Примеры

Следующие примеры приведены исключительно для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема изобретения, описанного в настоящем документе.

Сокращения:

РМВН - нонапептид полимиксина В;

РМВ - полимиксин В;

Thr - треонин;

Ser - серин;

DSer - D-серин;

Leu - лейцин;

Ile - изолейцин;

Phe - фенилаланин;

Dphe - D-фенилаланин;

Val - валин;

Dab -  $\alpha,\gamma$ -диаминомасляная кислота;

DIPEA - N,N-диизопропилэтиламин;

НАТУ - 2-(7-аза-1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1-3,3-тетраметилурония гексафторфосфат;

ДХМ - дихлорметан;

ТФУК - трифторуксусная кислота;

Н/О - не определено;

Н/П - не применимо;

ДМФА - N,N-диметилформамид;

РМВН - гептапептид полимиксина В (3-10);

РМВД - декапептид полимиксина В;

Pro - пролин;

Dap -  $\alpha,\beta$ -диаминопропионовая кислота;

Gly - глицин;

NorLeu - норлейцин;

Ruphos - 2-дициклогексилфосфино-2',6'-диизопропоксибифенил;

Xrphos - 2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропилбифенил;



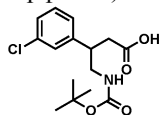
SFC - сверхкритическая флюидная хроматография;  
 Fmoc - флуоренилметилоксикарбонил;  
 Cbz - бензилоксикарбонил;  
 HCTU - O-(1H-6-хлорбензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуруния гексафторфосфат;  
 Boc - трет-бутилоксикарбонил;  
 PyBOP - (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфоний гексафторфосфат;  
 NMM - N-метилморфолин;  
 THF - тетрагидрофуран;  
 ivDde - 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутил;  
 DPPA - дифенилфосфорилазид;  
 TIS - триизопропилсилан;  
 HOBT - 1-гидроксибензотриазол;  
 IPA – изопропанол.

### Примеры синтеза

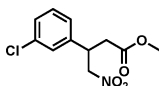
Синтез кислот с N-концевой группой.

В настоящей работе 3-замещенные 4-аминомасляные кислоты использовали в подходящей защищенной форме. Синтез нестандартных аминокислот подробно описан ниже вместе с методологией разделения энантиомеров.

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляная кислота - изомер 1 и изомер 2



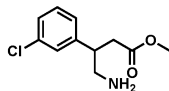
(i) Метил-3-(3-хлорфенил)-4-нитробутаноат



Смесь 3-хлоркоричной кислоты (10 г), метанола (100 мл) и концентрированной серной кислоты (4 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч. Полученную смесь выпаривали до сухости, при этом остатки распределялись между дихлорметаном (ДХМ) и водой. Водную фазу отделяли и экстрагировали с применением дополнительного количества ДХМ. Органические экстракты объединяли, высушивали с помощью сульфата магния, фильтровали и выпаривали до сухости с получением метилового эфира в виде белого твердого вещества (10,19 г). Полученное твердое вещество растворяли в нитрометане (32 мл) и обрабатывали с помощью 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ена (DBU) (8,5 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч, затем выпаривали до сухости, при этом остатки распределялись между водным 0,5 М HCl и диэтиловым эфиром. Водную фазу отделяли и экстрагировали с помощью дополнительного количества диэтилового эфира. Органические экстракты объединяли, промывали соевым раствором, высушивали с помощью сульфата магния, фильтровали и выпаривали до сухости. Остатки очищали на силикагеле, используя для элюирования гексан и этилацетат (0-100%). Соответствующие фракции объединяли и выпаривали до сухости с получением требуемого продукта в виде желтого масла (9,93 г, выход 70%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 2,71-2,79 (2H, m), 3,66 (3H, s), 3,93-4,01 (1H, m), 4,62 и 4,73 (2H, ABq, выглядит как 2x dd, J=12,8, 8,0 Гц), 7,11-7,28 (4H, m).

(ii) Метил-4-амино-3-(3-хлорфенил)бутаноат



К раствору метил-3-(3-хлорфенил)-4-нитробутаноата (9,93 г) в уксусной кислоте (90 мл), который перемешивали примерно при 0°C, порциями добавляли цинковую пыль (20,1 г) (осторожно: замедленный экзотермический эффект). Смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры при перемешивании в течение 19 ч. Смесь выпаривали до сухости, при этом остатки распределялись между водным NaHCO<sub>3</sub> и этилацетатом. Затем смесь фильтровали через целит и разделяли водную и органическую фазы. Водную фазу повторно экстрагировали с применением дополнительного количества этилацетата. Органические экстракты объединяли, промывали соевым раствором, высушивали с помощью сульфата магния, фильтровали и выпаривали до сухости с получением требуемого продукта в виде оранжевого масла (4,80 г).

(iii) Указанное в заголовке соединение - рацемическое.

Смесь метил-4-амино-3-(3-хлорфенил)бутаноата (4,80 г), ди-трет-бутилдикарбоната (5,28 г) и дихлорметана (100 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Полученную смесь выпаривали до сухости и очищали остатки на силикагеле, используя для элюирования петролейный эфир 40-60 и этилацетат (0-100%). Соответствующие фракции объединяли и выпаривали до сухости с получением Boc-защищенного сложного эфира метил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)бутаноата

в виде кремообразного твердого вещества (2,59 г).

Смесь метил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)бутаноата (2,49 г), гидроксида лития (546 мг), 1,4-диоксана (40 мл) и воды (40 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 64 ч. Затем смесь выпаривали до сухости. Остатки растворяли в воде, нейтрализовали с применением водного 1 М HCl и экстрагировали этилацетатом (×2). Органические экстракты объединяли, промывали соевым раствором, высушивали с помощью сульфата магния, фильтровали и выпаривали до сухости с получением требуемого продукта в виде желтого масла (2,51 г).

$m/z$  314 ( $MH^+$ )  $C_{15}H_{20}ClNO_4$  соответствует 313,11.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) 1,40 (9H, s), 2,42-2,73 (2H, m), 3,24-4,49 (4,4H, m, включает  $CH_3OD$ ,  $CH_2$  и  $CH$ ), 7,17-7,38 (4H, m).

(iv) Указанное в заголовке соединение - разделение изомеров - способ 1.

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляную кислоту (2,09 г) растворяли в метаноле до получения концентрации 60 мг/мл и затем очищали посредством SFC с применением условий, описанных ниже (условия препаративного разделения 1). Объединенные фракции, содержащие обогащенный изомер 1 (быстрее элюирующийся) и изомер 2 (медленнее элюирующийся), объединяли, концентрировали и каждую фракцию повторно очищали по отдельности в одних и тех же хроматографических условиях.

Затем объединенные фракции каждого из изомера 1 и изомера 2 выпаривали с применением роторного испарителя почти до сухости, переносили в конечные сосуды с ДХМ, который удаляли в потоке азота при 40°C перед размещением на хранение в вакуумной печи при 40°C и 5 мбар в течение 16 ч.

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляная кислота (изомер 1).

Белое твердое вещество, 883 мг, энантиомерный избыток 95,6%. Время удерживания в аналитической системе 1 2,89 мин.

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляная кислота (изомер 2).

Белое твердое вещество, 876 мг, энантиомерный избыток 98,6%. Время удерживания в аналитической системе 1 3,29 мин.

Условия препаративного разделения 1: Berger Multigram II SFC:

Параметры колонки: Lux A1 (Phenomenex, 21,2×250 мм, 5 мкм).

Температура колонки: 40°C.

Скорость потока: 50 мл/мин.

Регулятор обратного давления: 125 бар изб.

Длина волны детектора: 210 нм.

Объем введенной пробы: 300 мкл (18 мг).

Изократические условия: 12:88 EtOH:CO<sub>2</sub> (0,1% об./об. NH<sub>3</sub>).

Условия анализа 1: Waters UPC2:

Параметры колонки: Lux C4 (Phenomenex, 4,6×250 мм, 5 мкм).

Температура колонки: 40°C.

Скорость потока: 4 мл/мин.

Длина волны детектора: 210-400 нм.

Объем введенной пробы: 1,0 мкл.

Регулятор обратного давления: 125 бар изб.

Изократические условия: 10:90 EtOH:CO<sub>2</sub> (0,1% об. NH<sub>3</sub>).

(v) Указанное в заголовке соединение - разделение изомеров - способ 2.

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляную кислоту очищали посредством SFC с применением условий, описанных ниже (условия препаративного разделения 2). После разделения фракции высушивали на роторном испарителе при температуре бани 40°C с получением требуемых разделенных энантиомеров. Медленнее элюирующийся энантиомер дополнительно очищали на такой же колонке, используя для элюирования 20% В.

Условия препаративного разделения 2:

Прибор: Thar 200 preparative SFC (SFC-10)

Колонка: ChiralPak AY, внутренний диаметр 300×50 мм, 10 мкм.

Подвижная фаза: А для CO<sub>2</sub> и В для изопропанола

Градиент: В 25%

Скорость потока: 200 мл/мин.

Противодавление: 100 бар.

Температура колонки: 38°C.

Длина волны: 220 нм.

Время цикла: ~4,5 мин.

Аналитические условия 2:

Прибор: Waters UPC2 analytical SFC (SFC-H).

Колонка: ChiralPak AY, внутренний диаметр 150×4,6 мм, 3 мкм.

Подвижная фаза: А для CO<sub>2</sub> и В для изопропанола (0,05% диэаноламина).

Градиент: В 5-40%.

Скорость потока: 2,5 мл/мин.

Противодавление: 100 бар.

Температура колонки: 40°C.

Длина волны: 220 нм.

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляная кислота (изомер 1).

Время удерживания 2,796 мин. Приписана (R)-стереохимия путем сравнения с изомером (2), приведенным ниже.

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляная кислота (изомер 2).

Время удерживания 3,264 мин. Приписана (S)-стереохимия с помощью кристаллографии малых молекул вещества, незащищенного ВОС-группой, как описано ниже.

(vi) Подтверждение стереохимии.

Трифторацетатная соль (S)-4-амино-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты.

К охлажденному ледяной водой раствору изомера 2, представляющему собой 4-(трет-бутоксикарбониламино)-3-(3-хлорфенил)масляную кислоту, (время удерживания 3,264 мин согласно способу анализа 2) (1,5 г, 4,78 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (5 мл). После добавления смесь перемешивали при такой температуре в течение 4 ч. Затем реакционную смесь концентрировали. Неочищенную смесь растворяли в воде (10 мл) и лиофилизировали с получением продукта; ТФУК соль (S)-4-амино-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты (1,5 г, выход 95%).

ЖХ-МС: m/z 214 (M+H)<sup>+</sup>.

(S)-4-Амино-3-(3-хлорфенил)масляная кислота.

К раствору соли трифторуксусной кислоты (S)-4-амино-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты (0,5 г, 1,53 ммоль) в воде (10 мл) добавляли разбавленный водный гидроксид аммония до достижения pH 7. Полученный раствор хранили в открытой колбе объемом 25 мл и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 дня. После кристаллизации маточный раствор декантировали и твердые кристаллы подвергали рентгеноструктурным исследованиям.

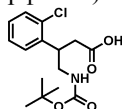
Рентгеноструктурные исследования показали, что указанное соединение имеет (S) стереохимию.

Условия дифракции рентгеновских лучей:

Использовали дифрактометр Bruker APEX-II CCD.

Во время сбора данных кристалл держали при 302,71 К (29,56°C). Путем применения Olex2 (Dolomanov et al.) с помощью программы расчета структур ShelXT [2] (Sheldrick A71) при использовании внутреннего фазирования была определена структура, которая была откорректирована путем применения пакета детализации ShelXL [3] при использовании минимизации методом наименьших квадратов (Sheldrick C71).

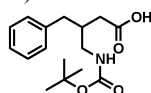
4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(2-хлорфенил)масляная кислота



Указанное соединение получали из 2-хлоркоричной кислоты согласно методологии получения 4((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты, описанной выше, на стадиях (i)-(iii). Соединение было получено в виде бесцветного масла.

m/z 314 (MH<sup>+</sup>), точная масса C<sub>15</sub>H<sub>2</sub>OCINO<sub>4</sub> 313,11.

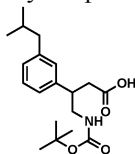
3-Бензил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)масляная кислота



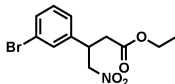
Метил-3-бензил-4-нитробутаноат (Tetrahedron Asymmetry, 19, 2008, 945) превращали в указанное в заголовке соединение согласно методологии получения 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты, описанной выше, на стадиях (i)-(iii).

m/z 294 (MH<sup>+</sup>), точная масса C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> 293,16.

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)масляная кислота



(i) Этил-3-(3-бромфенил)-4-нитробутаноат

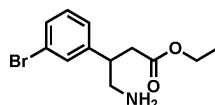


Смесь гидрида натрия (60%) в минеральном масле (394,26 мг, 9,86 ммоль) и 1,2-диметоксиэтана (22,5 мл) (ДМЭ) охлаждали до 0°C. По каплям добавляли триэтилфосфоноацетат (10,2 мл, 51,43 ммоль) и перемешивали полученную смесь в течение 10 мин. По каплям добавляли раствор 3-бромбенальдегида (1,0 мл, 8,57 ммоль) в ДМЭ (5 мл). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч.

Смесь выпаривали до сухости, при этом остатки распределялись между гексаном и водой. Водную фазу отделяли и экстрагировали с помощью дополнительного количества гексана. Органические экстракты объединяли, промывали водой, высушивали с помощью  $MgSO_4$ , фильтровали и выпаривали до сухости. Остатки очищали на силикагеле, используя для элюирования петролейный эфир 40-60 и этилацетат (0-100%). Соответствующие фракции объединяли и выпаривали до сухости с получением этил-(E)-3-(3-бромфенил)проп-2-еноата в виде белого твердого вещества (1,44 г, 65%). Указанное вещество превращали в этил-3-(3-бромфенил)-4-нитробуаноат, используя условия нитрования при получении 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты на стадии (i), как описано выше, с получением продукта с выходом 60%.

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

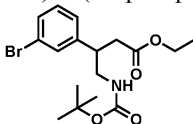
(ii) Этил-4-амино-3-(3-бромфенил)буаноат



Этил-3-(3-бромфенил)-4-нитробуаноат (1,08 г) превращали в этил-4-амино-3-(3-бромфенил)буаноат, используя условия, описанные выше для получения 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты на стадии (ii), с получением продукта с выходом 67%.

$m/z$  286 и 288 ( $MH^+$ ), точная масса  $C_{12}H_{16}BrNO_2$  285,04.

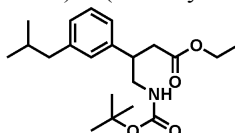
(iii) Этил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-бромфенил)буаноат



Этил-4-амино-3-(3-бромфенил)буаноат (655 мг) превращали в этил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-бромфенил)буаноат в условиях, описанных выше для получения 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты на стадии (iii), с получением продукта с выходом 72%.

$m/z$  386 и 388 ( $MH^+$ ), точная масса  $C_{17}H_{24}BrNO_4$  385,09.

(iv) Этил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)буаноат



Смесь Rurhos (48,3 мг, 0,1 ммоль), трехосновного фосфата калия (330 мг, 1,55 ммоль), этил-3-(3-бромфенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)буаноата (200 мг, 0,52 ммоль) и изобутилбороновой кислоты (132 мг, 1,29 ммоль) в толуоле (9 мл) дегазировали четыре раза путем вакуумирования/продувки азотом перед добавлением ацетата палладия (II) (5,8 мг, 0,03 ммоль). Смесь перемешивали при 110°C в течение 100 мин. Реакционной смеси давали охладиться перед ее фильтрованием через целит и оставляли на ночь в растворе. Смесь выпаривали до сухости и очищали на силикагеле, используя для элюирования петролейный эфир 40-60 и этилацетат (0-100%). Соответствующие фракции объединяли и выпаривали до сухости с получением этил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)буаноата в виде бесцветного масла (74 мг, 39%).

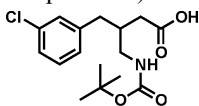
$m/z$  364 ( $MH^+$ ). Точная масса  $C_{21}H_{33}NO_4$  363,24.

(v) Указанное в заголовке соединение.

Смесь этил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)буаноата (74 мг, 0,2 ммоль) и гидроксида лития (15 мг, 0,6 ммоль) в 1,4-диоксане (3 мл) и воде (3 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Смесь выпаривали до сухости, при этом остатки распределялись между этилацетатом и водой. Органическую фазу отделяли и отбрасывали. Водную фазу подкисляли с помощью 1 M HCl (водной) и экстрагировали этилацетатом (x2). Органические экстракты объединяли, высушивали с помощью  $MgSO_4$ , фильтровали и выпаривали до сухости с получением 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)масляной кислоты в виде бесцветного масла (65 мг).

$m/z$  336 ( $MH^+$ ), точная масса  $C_{19}H_{29}NO_4$  335,21.

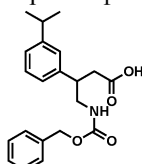
## 4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорбензил)масляная кислота



2-(3-Хлорфенил)ацетальдегид превращали в этил-3-(3-хлорбензил)-4-нитробуаноат, как описано для получения 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)масляной кислоты на стадии (i), описанной выше. Восстановление и защита, как на стадии (ii) и (iii), с последующим гидролизом, как на описанной выше стадии (v), позволили получить указанное в заголовке соединение в виде бесцветного масла.

$m/z$  328 ( $MH^+$ ). Точная масса  $C_{16}H_{22}ClNO_4$  327,12.

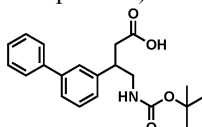
## 4-((Бензилокси)карбонил)амино)-3-(3-изопропилфенил)масляная кислота



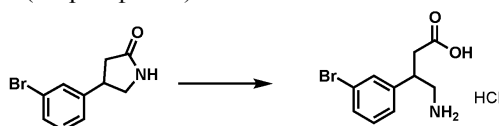
Смесь этил-4-амино-3-(3-изопропилфенил)буаноата (1,55 г, 6,21 ммоль) (полученного с применением методологии получения 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)масляной кислоты на стадиях (i)-(ii), описанных выше), и бикарбоната натрия (0,783 г, 9,32 ммоль) растворяли в воде (10 мл) и 1,4-диоксане (5 мл). Смесь охлаждали на ледяной бане и обрабатывали раствором бензилхлорформиата (0,98 мл, 6,84 ммоль). Смесь перемешивали при 10°C в течение 1 ч, затем оставляли нагреваться до комнатной температуры. После перемешивания в течение 20 ч смесь выпаривали до сухости, при этом остатки распределялись между диэтиловым эфиром и водным 0,5 М HCl. Водную фазу отделяли и экстрагировали с помощью дополнительного количества диэтилового эфира. Органические экстракты объединяли, промывали соевым раствором, высушивали над безводным  $MgSO_4$  и выпаривали. Неочищенный продукт очищали на силикагеле, используя для элюирования петролейный эфир 40-60 и этилацетат (0-100%). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали до получения бледно-желтого масла (1,74 г, 73%). Этиловый эфир подвергали гидролизу с применением гидроксида лития, как описано ранее на стадии (iii) получения 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)масляной кислоты, с последующим применением хроматографии на силикагеле, используя для элюирования петролейный эфир 40-60 и этилацетат (0-100%), что позволило получить указанное в заголовке соединение в виде белого твердого вещества (60%).

$m/z$  356 ( $MH^+$ ). Точная масса  $C_{21}H_{25}NO_4$ : 355,18.

## 4-([1,1'-Бифенил]-3-ил)-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)масляная кислота



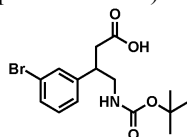
## (i) Гидрохлорид 4-амино-3-(3-бромфенил)масляной кислоты



Смесь 4-(3-бромфенил)пирролидин-2-она (1,0 г, 4,16 ммоль) и водного 6 М HCl (15,0 мл, 90 ммоль) нагревали при 100°C в течение 16 ч. Смесь выпаривали до сухости, выпаривали совместно с водой, с последующим выпариванием с этилацетатом и затем с дихлорметаном (ДХМ) с получением требуемого продукта в виде белого твердого вещества с расчетным количественным выходом.

$m/z$  258 и 260 ( $MH^+$ ), точная масса  $C_{10}H_{12}BrNO_2$ : 257,01.

## (ii) 3-(3-Бромфенил)-4-(трет-бутоксикарбониламино)масляная кислота



Смесь гидрохлорида 4-амино-3-(3-бромфенил)масляной кислоты (1,31 г, 4,45 ммоль), трет-бутоксикарбонил-трет-бутилкарбоната (Вос-О-Вос, 1,41 г, 6,45 ммоль), 1,4-диоксана (8 мл) и водного 1 М NaOH (8,0 мл, 8 ммоль) перемешивали при комнатной температуре в течение 64 ч. Смесь выпаривали до сухости. Остатки растворяли в воде, нейтрализовали с помощью водного 1 М HCl и экстрагировали этилацетатом ( $\times 2$ ). Органические экстракты объединяли, высушивали с помощью  $MgSO_4$ , фильтровали и выпаривали до сухости с получением требуемого продукта (1,60 г, 86%) в виде бесцветного

масла.

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

(iii) Указанное в заголовке соединение.

Смесь 3-(3-бромфенил)-4-(трет-бутоксикарбониламино)масляной кислоты (2,69 г, 7,51 ммоль), фенилбороновой кислоты (2,3 г, 18,8 ммоль), ацетата палладия(II) (84 мг, 0,38 ммоль), Xphos (716 мг, 1,5 ммоль) и трехосновного фосфата калия (4781,9 мг, 22,53 ммоль) в 1,4-диоксане (130 мл) перемешивали при 100°C в атмосфере азота в течение 2 ч. Затем смеси давали охладиться до комнатной температуры, фильтровали через целит, промывали этилацетатом и выпаривали до сухости. Остатки очищали на силикагеле, используя для элюирования петролейный эфир и этилацетат (0-100%). Соответствующие фракции объединяли и выпаривали до сухости с получением 1,44 г требуемого продукта в виде серого твердого вещества (выход 42%).

$m/z$  355 ( $M^+$ ), видимый. Точная масса  $C_{21}H_{25}NO_4$ : 355,18.

(iv) Хиральное разделение.

4-([1,1'-Бифенил]-3-ил)-3-(((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)масляную кислоту (1,44 г) растворяли в MeOH до получения концентрации 30 мг/мл и затем очищали с помощью SFC, используя способ, описанный ниже. Затем объединенные фракции каждого из изомера 1 (быстрее элюирующегося) и изомера 2 (медленнее элюирующегося) выпаривали с применением роторного испарителя почти до сухости, переносили в конечные сосуды с ДХМ, который удаляли под потоком сжатого воздуха при 40°C перед размещением на хранение в вакуумной печи при 40°C и 5 мбар до достижения постоянной массы.

Изомер 1, представляющий собой 4-([1,1'-бифенил]-3-ил)-3-(((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)масляную кислоту. Белое твердое вещество, 523 мг. Время удерживания: (условия анализа 3) 2,70 мин. Энантиомерный избыток 99,8%.

Изомер 2, представляющий собой 4-([1,1'-бифенил]-3-ил)-3-(((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)масляную кислоту. Белое твердое вещество 537 мг. Время удерживания: (условия анализа 3) 3,46 мин. Энантиомерный избыток 99,8%.

Условия очистки 3: Berger Multigram II SFC.

Параметры колонки: Lux A1 (Phenomenex, 21,2×250 мм, 5 мкм).

Температура колонки: 40°C.

Скорость потока: 50 мл/мин.

Регулятор обратного давления: 100 бар изб.

Длина волны детектора: 215 нм.

Объем введенной пробы: 1000 мкл (30 мг).

Изократические условия: 15:85 EtOH:CO<sub>2</sub> (0,2% об./об. NH<sub>3</sub>).

Условия анализа 3: Waters UPC2

Параметры колонки: Amy-C (YMC GmbH, 4,6×250 мм, 5 мкм).

Температура колонки: 40°C.

Скорость потока: 4 мл/мин.

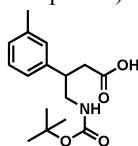
Длина волны детектора: 210-400 нм.

Объем введенной пробы: 1,0 мкл.

Регулятор обратного давления: 125 бар изб.

Изократические условия: 15:85 EtOH:CO<sub>2</sub> (0,2% об./об. NH<sub>3</sub>).

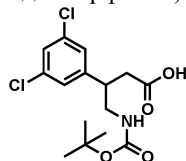
4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-метилфенил)масляная кислота



4-(3-Метилфенил)пирролидин-2-он превращали в указанное в заголовке соединение, используя методологию, описанную выше для получения 4-([1,1'-бифенил]-3-ил)-3-(((трет-бутоксикарбонил)амино)метил)масляной кислоты на стадиях (i)-(ii). Указанное в заголовке соединение было получено в виде бесцветного масла.

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

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3,5-дихлорфенил)масляная кислота

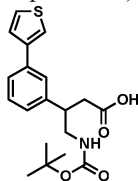


3,5-Дихлорбензальдегид превращали в указанное в заголовке соединение, используя методологию, описанную выше для получения 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-изобутилфенил)масляной кислоты на стадиях (i)-(iii). Этиловый эфир гидролизovali, как описано для стадии (v) при получении

(3-изобутилфенил)масляной кислоты, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла.

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

4-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-3-(3-(тиофен-3-ил)фенил)масляная кислота



Этил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-бромфенил)бутаноат (207 мг, 0,54 ммоль) подвергли взаимодействию с 3-тиенилбороновой кислотой с применением методологии, описанной выше для получения (3-изобутилфенил)масляной кислоты на стадии (iv). Продукт гидролизovali, как описано на стадии (v), с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла.

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

Промежуточные нонапептиды полимиксина и конечные соединения.

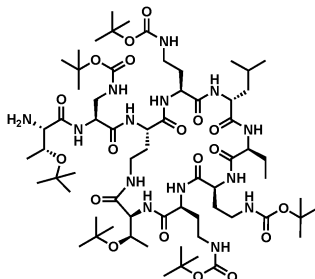
Промежуточное соединение 1: H-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Cyclo[Dab-Dab(Boc)-DPhe-Leu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr].

Ранее описано в WO 2015/135976 как промежуточное соединение 11 - Гептапептид тетра-(N-Бос)-L-Thr(O-tBu)-L-Var-полимиксина В.

Промежуточное соединение 2: H-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Cyclo[Dab-Dab(Boc)-Leu-Leu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr].

Ранее описано в WO 2015/135976 как промежуточное соединение 14 - Гептапептид тетра-(N-Бос)-L-Thr(O-tBu)-L-Var-полимиксина Е.

Промежуточное соединение 3: H-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Cyclo[Dab-Dab(Boc)-Dleu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)]



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

Линейный пептид CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Dab(ivDde)-Dab(Boc)-Dleu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu) получали на смоле посредством твердофазного пептидного синтеза с применением Fmoc-химии, используя методологию общего способа 3, описанную выше. Последовательность выполнения начиналась с хлортритилхлоридной (СТС)-смолы (2,0 г), предварительно нагруженной Fmoc-Thr(tBu)-OH при нагрузке 0,75 ммоль/г. Связанный смолой пептид (3,93 г, что соответствует 1,5 ммоль) помещали в коническую колбу объемом 500 мл и обрабатывали 4% гидразином в диметилформамиде (ДМФА) (100 мл). Смесь помещали на встряхивающее устройство и осторожно встряхивали в течение 30 мин. Смесь запускали в спеченную колонку (sintered column), затем промывали ДМФА (3×100 мл). Для удаления последних следов ДМФА применяли сжатый воздух. Затем процедуру повторяли с ТГФ и ДХМ.

Затем смолу обрабатывали смесью 4:1 ДХМ:гексафторизопропанол (100 мл) для отщепления от смолы пептида. Через 30 мин колонку дренировали и повторяли описанную процедуру. Затем смолу трижды промывали ДХМ (100 мл). Объединенные элюенты и промывные жидкости выпаривали при пониженном давлении и высушивали в вакууме в течение ночи. Получали 724 мг белого твердого вещества (2,35 г, количественно).

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

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

Неочищенный CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Dab-Dab(Boc)-DLeu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)-OH (724 мг, 0,466 ммоль) растворяли в ДМФА (75 мл), обрабатывали диизопропилэтиламином (DIPEA) (361 мг, 0,49 мл, 2,8 ммоль), затем охлаждали на ледяной бане. По каплям добавляли дифенилфосфорилазид (256 мг, 0,2 мл, 0,93 ммоль), затем смесь перемешивали в течение 2 ч при охлаждении в ледяной бане. Ледяную баню убирали и перемешивали раствор при комнатной температуре в течение дополнительных 2 ч. Выпаривали растворитель и остаток наносили на  $SiO_2$  колонку ISCO (40 г) и хроматографировали с применением 0-10% MeOH в ДХМ. Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали до получения белой пены. Получали 418 мг (58%).

$m/z$  1534,  $C_{73}H_{124}N_{14}O_{21}$  соответствует 1532.91.

(iii) Указанное в заголовке соединение CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-cyclo[Dab-Dab(Boc)-DLeu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)] (531 мг, 0,346 ммоль) растворяли в метаноле (50 мл) и обрабатывали формиатом аммония (545 мг, 8,6 ммоль) и 10% Pd/C (173 мг). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакционную смесь фильтровали через целит и промывали остаток MeOH. Растворитель выпаривали и растворяли остаток в EtOAc, содержащем 10% MeOH, промывали водой  $\times 3$  и высушивали с помощью сульфата магния. Растворитель выпаривали, после чего оставалось белое твердое вещество. Для удаления любых следов формиата твердое вещество растворяли в метаноле (160 мл) и встряхивали со смолой Ambersep 900 (12 мл) в течение 30 мин. Смесь фильтровали и выпаривали до сухости с получением 464 мг белого твердого вещества (96%).

$m/z$  1400,  $C_{65}H_{118}N_{14}O_{19}$  соответствует 1398.87.

Общие способы.

Полный синтез нонапептидных производных полимиксина проводили следующим образом.

Линейный пептид с ортогональной защитой  $\gamma$ -аминогруппы остатка Dab, участвующего в циклизации, собирали на смоле, при этом C-концевую аминокислоту (обычно Thr) присоединяли к твердой фазе. После частичного снятия защиты с Dab, участвующей в циклизации (остаток 4 в системе нумерации полимиксинов), с последующим удалением из смолы, полученные линейные пептиды подвергали циклизации вне смолы (off-resin cyclization). Использовали два общих способа, описанных ниже.

Общий способ 1: Полный синтез с применением защиты аминогрупп с помощью CBZ-группы.

Синтез защищенного линейного пептида (остатки 2-10 и N-концевая группа) осуществляли на автоматическом синтезаторе пептидов с применением стандартного твердофазного синтеза пептидов на основе Fmoc-химии. В частности, синтез проводили с применением смолы Fmoc-Thr(tBu)-PEG-PS в качестве исходного материала. Реакцию сочетания Fmoc-аминокислот с CBZ-защитной группой на концевых аминогруппах проводили с применением 5 молярных эквивалентов (относительно нагрузки смолы) Fmoc-аминокислоты и HATU в ДМФА путем активации *in situ*, используя 10 молярных эквивалентов DIPEA. Удаление защитной группы Fmoc проводили с применением 20% пиперидина в диметилформамиде. Boc использовали в качестве ортогональной защитной группы в Dab, участвующей в циклизации.

Связанный смолой линейный пептид обрабатывали TФУК/TIS/ $H_2O$  (96/2/2 об./об.) в течение 2 ч для обнаружения остатка Dab, участвующего в циклизации, и для отщепления пептида от смолы. Указанное вещество подвергали циклизации с применением PyBop/NOBt/NMM (4/4/8 молярных эквивалентов относительно исходной загрузки) в ДМФА в течение 3 ч. Неочищенный материал частично выпаривали, удаляли ацетонитрил/воду и лиофилизировали в течение ночи. Затем удаляли CBZ-группы, используя 10% Pd/C в уксусной кислоте/MeOH/воде (5/4/1 об./об.).

Неочищенный продукт очищали и разделяли диастереомеры с помощью препаративной ВЭЖХ (табл. 3). Следует отметить, что конкретные условия были оптимизированы для каждой пары диастереомеров.

Общий способ 2: Полный синтез с применением защиты аминогрупп с помощью Boc-группы.

Синтез защищенного линейного пептида (остатки 2-10 и N-концевая группа) осуществляли на автоматическом синтезаторе пептидов с применением стандартного твердофазного синтеза пептидов на основе Fmoc-химии. В частности, синтез проводили с применением хлортритилхлоридной (CTC)-смолы, предварительно нагруженной Fmoc-Thr(tBu)-OH (нагрузка  $\sim 0,78$  ммоль/г) на уровне от 0,05 до 0,1 ммоль. Реакцию сочетания Fmoc-аминокислот проводили с применением 5 молярных эквивалентов (относительно нагрузки смолы) Fmoc-аминокислоты и HATU в ДМФА путем активации *in situ*, используя 10 молярных эквивалентов DIPEA. Удаление защитной группы Fmoc осуществляли с применением 20% пиперидина в диметилформамиде. Защитную группу ivDde использовали в качестве ортогональной защиты остатка Dab, участвующего в циклизации.

Для удаления группы ivDde линейный пептид обрабатывали 3% гидразином в ДМФА (100 мл на 100 мкмоль, повторяли дважды) с последующей промывкой с помощью ДМФА  $\times 3$ , EtOH  $\times 3$  и диэтилового эфира  $\times 3$ . Затем линейный пептид, частично лишенный защиты, отщепляли от смолы путем промывания смолы 20% HFIP в ДХМ. Полученный остаток растворяли в 50% ацетонитриле/воде и высушивали путем сублимации в течение ночи. Защищенный линейный пептид растворяли в ДМФА (20 мл/ммоль смолы), проводили его циклизацию с DPPA (3 молярных эквивалента относительно загрузки смолы) и DIPEA (6 молярных эквивалентов относительно загрузки смолы). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Группы Boc удаляли с помощью TФУК и лиофилизировали неочищенный пептид.

Неочищенный продукт очищали и разделяли диастереомеры посредством препаративной ВЭЖХ, используя условия 4 препаративной ВЭЖХ, описанные ниже. Следует отметить, что конкретные условия были оптимизированы для каждой пары диастереомеров.

Общий способ 3: Реакция сочетания кислоты с нонапептидом и разделение.

Способы сочетания N-конца нонапептида с аминокислотой описаны ниже применительно к иллюстративным соединениям 5 и 6. Описанные условия можно адаптировать для других комбинаций нона-



пептида и аминокислоты.

Стадия 1.

H-Thr(O<sup>1</sup>Bu)-Dap(BOC)-Cyclo[Dab-Dab(BOC)-DPhe-Leu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr] (промежуточное соединение 1) (0,07 ммоль) растворяли в дихлорметане (4 мл) и обрабатывали с помощью 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты (1,5 эквивалента относительно полимиксинового субстрата), N,N-диизопропилэтиламина (3,0 эквивалента), а затем HATU (2,0 эквивалента). Через 16 ч завершение реакции подтверждали с помощью жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ЖХМС), и выпаривали реакционную смесь до сухости. Добавляли воду (приблизительно 10 мл) и полученную смесь растирали в порошок, затем интенсивно перемешивали в течение 1 ч. Полученный осадок собирали посредством фильтрации и высушивали в вакууме в течение ночи.

Стадия 2.

Вос-защищенное производное, полученное на стадии 1, растворяли в дихлорметане (3 мл) и обрабатывали с помощью ТФУК (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока ЖХМС не подтвердила полное снятие защиты. Растворитель выпаривали и хроматографировали остаток посредством препаративной ВЭЖХ, используя условия, соответствующие условиям 4 препаративной ВЭЖХ, для разделения диастереомеров. Фракции, содержащие рано элюирующийся диастереомер, объединяли, выпаривали до небольшого объема и лиофилизировали с получением примера 5 в виде соли ТФУК. Фракции, содержащие позже элюирующийся диастереомер, объединяли, выпаривали до небольшого объема и лиофилизировали с получением примера 6 в виде соли ТФУК.

Следует отметить, что конкретные условия были оптимизированы для каждой пары диастереомеров.

Условия 4 препаративной ВЭЖХ:

Колонка: Waters Sunfire C18 OBD 5 мкм, 19×150 мм.

Подвижная фаза:

А: вода/ацетонитрил 90/10, об./об., 0,15% ТФУК.

В: ацетонитрил/вода 90/10, об./об., 0,15% ТФУК.

Скорость потока: 10 мл/мин.

Градиент:

Время (мин)	% подвижной фазы А
0	100%
3	100%
8	85%
13,5	85%
15	75%
18	0%
23	100%
25	100%

Детектирование: 210 нм.

Условия 4 аналитической ВЭЖХ:

Колонка: Phenomenex Hyperclone C18 BDS 5 мкм, 4,6×150 мм.

Подвижная фаза:

А: вода/ацетонитрил 90/10, об./об., 0,15% ТФУК.

В: ацетонитрил/вода 90/10, об./об., 0,15% ТФУК.

Скорость потока: 1 мл/мин.

Градиент:

Время (мин)	% подвижной фазы А
0	100%
20	40%
21	0%
23	0%
23,5	100
25	100

Детектирование: 210, 254 нм.

Объем введенной пробы: 20 мкл.

Общий способ 3b: Реакция сочетания отдельных энантиомеров с нонапептидом Энантиомерно чистые аминокислоты присоединяли к N-концу нонапептидных соединений с применением тех же условий,

которые описаны выше в общем способе 3а для энантиомерной смеси аминокислот.

Примеры соединений 5 и 6.

В результате реакции сочетания 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты (изомер 2) (время удерживания 3,46 мин при применении аналитического способа 1 или 3,264 мин при применении аналитического способа 2) в условиях общего способа 3а с последующим снятием защиты получали пример 5. После рентгенографического определения абсолютной конфигурации 4-амино-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты, полученной из 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты (изомер 2), примеру (5) была приписана (S) стереохимия.

В результате реакции сочетания 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты (изомер 1, время удерживания 2,89 мин при применении аналитического способа 1 или 2,796 мин при применении аналитического способа 2) в условиях общего способа 3а с последующим снятием защиты получали пример 6. После рентгенографического определения абсолютной конфигурации 4-амино-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты, полученной из 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлорфенил)масляной кислоты (изомер 1), примеру (6) была приписана (R) стереохимия.

Общий способ 4: Превращение в ацетатную соль.

Ацетатную форму смолы AG1-X2 (Bio-Rad Laboratories Ltd) 200-4-меш регенерировали путем промывания 10% водным раствором уксусной кислоты с последующим промыванием 1% водным раствором уксусной кислоты и помещали во фриттовый картридж. Раствор указанного соединения в виде соли ТФУК в воде наносили на колонку, используя загрузку 30 г смолы на 1 г соли ТФУК, и оставляли колонку капать под действием силы тяжести, используя для элюирования воду. Фракции, содержащие продукт, объединяли и лиофилизировали до получения белого твердого вещества.

Анализ конечных соединений проводили с помощью ВЭЖХ в условиях, описанных выше (условия аналитической ВЭЖХ).

Типичные аналитические данные для соединений, представляющих собой примеры 5 и 6, в виде ацетатных солей приведены ниже.

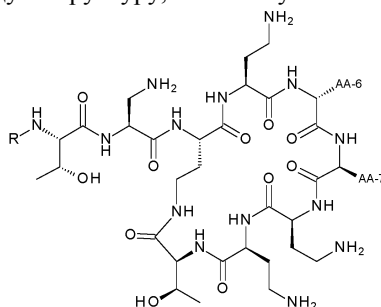
Пример 5: (более быстрый изомер)  $^1\text{H}$  ЯМР ацетатной соли (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  (ppm) 0,70 (3H, d,  $J=6,1$  Гц), 0,77 (3H, d,  $J=6,3$  Гц), 0,78-0,90 (1H, m), 1,13 (3H, d,  $J=6,3$  Гц), 1,17 (3H, d,  $J=6,4$  Гц), 1,36-1,52 (2H, m), 1,75-2,06 (17H, m, включает 1,91, s, OAc), 2,10-2,30 (4H, m), 2,72-2,91 (4H, m), 3,02-3,49 (14H, m), 4,12-4,32 (8H, m), 4,48 (1H, dd,  $J=5,6, 9,0$  Гц), 4,54-4,60 (1H, m), 4,63-4,68 (1H, m), 7,25-7,41 (9H, m).  $m/z$  1145  $[\text{M}^+]$ , 573  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ .

Пример 6: (более медленный изомер)  $^1\text{H}$  ЯМР ацетатной соли (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  (ppm) 0,60-0,67 (6H, m), 0,69-0,84 (4H, m), 1,16 (3H, d,  $J=6,4$  Гц), 1,33-1,50 (2H, m), 1,76-2,04 (19H, m, включает 1,88, s, OAc), 2,06-2,26 (4H, m), 2,67-2,86 (4H, m), 3,00-3,46 (14H, m), 3,98-4,04 (1H, m), 4,14-4,30 (7H, m), 4,45 (1H, dd,  $J=5,6, 9,0$  Гц), 4,54 (1H, выглядит как t,  $J=8,3$  Гц), 4,72 (1H, dd,  $J=5,0, 8,9$  Гц), 7,20-7,40 (9H, m).  $m/z$  1145  $[\text{M}^+]$ , 573  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ .

Во всех примерах диастереомеры были приписаны на основе времени удерживания при ВЭЖХ (быстро и медленно элюируемые изомеры) вместе с химическим сдвигом остатка Thr, который смещается от 1,13 ppm в быстро элюируемом изомере до примерно 0,65 ppm в медленно элюируемом изомере.

Иллюстративные соединения.

В табл. 1 приведен перечень иллюстративных соединений, предложенных в настоящем изобретении. Это соединения, имеющие общую структуру, показанную ниже:



Группа R соответствует  $-\text{X-R}^{15}$  в соединениях согласно настоящему изобретению, при этом указанная группа показана в таблице вместе с аминокислотными остатками в положениях 6 и 7 (AA-6 и AA-7 соответственно, при применении системы нумерации полимиксинов), которые соответствуют группам  $-\text{R}^1$  и  $-\text{R}^2$  соответственно, когда они присутствуют вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому они присоединены.

В таких иллюстративных соединениях группа  $-\text{R}^3$ , взятая вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому она присоединена, представляет собой L-Thr,  $-\text{R}^4$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой L-Asp (таким образом,  $-\text{R}^4$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), и  $-\text{R}^8$  вместе с карбонильной группой и атомом азота в положении альфа по отношению

к атому углерода, к которому он присоединен, представляет собой L-Thr (таким образом, -R<sup>8</sup> представляет собой метил).

Абсолютная стереохимия в боковой цепи -R была приписана путем сравнения с примером 5 и примером 6, которые коррелировали с веществом с известной абсолютной стереохимией.

В примерах 1-6 и 15-33 указанное определение проводили путем сравнения относительных времен удерживания и спектра <sup>1</sup>H ЯМР диастереомеров (например, с учетом химического сдвига остатка Thr в положении 2).

В примерах 7-14 указанное определение проводили путем сравнения относительных времен удерживания диастереомеров при ВЭЖХ.

В таблице указаны времена удерживания при ВЭЖХ для указанных иллюстративных соединений. Условия ВЭЖХ, применяемые для анализа, приведены ниже.

Колонка: Phenomenex Hupergclone BDS C18, 4,6×150 мм, 5 мкм.

Скорость потока: 1 мл/мин.

Элюент:

A = 10% AcN/90% воды/0,15% ТФУК.

B = 90% AcN/10% воды/0,15% ТФУК.

Градиент:

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

Детектирование: 210, 254 нм.

Таблица 1

Иллюстративные соединения

Пример	Название	-R	AA-6	AA-7	Общий способ	Формула	Масса	ВЭЖХ <i>t<sub>R</sub></i> (мин)	m/z
1	(S)-4-амино-3-(4-хлорфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C <sub>52</sub> H <sub>82</sub> Cl N <sub>15</sub> O <sub>12</sub>	1143,6	9,6	1145 [MH <sup>+</sup> ] 573 [M+2H] <sup>2+</sup>
2	(R)-4-амино-3-(4-хлорфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C <sub>52</sub> H <sub>82</sub> Cl N <sub>15</sub> O <sub>12</sub>	1143,6	9,7	1145 [MH <sup>+</sup> ] 573 [M+2H] <sup>2+</sup>
3	(S)-4-амино-3-(2-хлорфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C <sub>52</sub> H <sub>82</sub> Cl N <sub>15</sub> O <sub>12</sub>	1143,6	9,1	1145 [MH <sup>+</sup> ] 573 [M+2H] <sup>2+</sup>

4	( <i>R</i> )-4-амино-3-(2-хлорфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82Cl N15O12	1143,6	9,4	1145 [MH+] 573 [M+2H] <sup>2+</sup>
5	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3-хлорфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a, 3b	C52H82Cl N15O12	1143,6	9,6	1145 [MH+] 573 [M+2H] <sup>2+</sup>
6	( <i>R</i> )-4-амино-3-(3-хлорфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a, 3b	C52H82Cl N15O12	1143,6	9,8	1145 [MH+] 573 [M+2H] <sup>2+</sup>
7	( <i>R</i> )-4-амино-3-бензилбутаноил -Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Изомер 1</i>		Leu	Leu	3a	C50H87N1 5O12	1089,7	8,8	1091 [MH+] 546 [M+2H] <sup>2+</sup>
8	( <i>S</i> )-4-амино-3-бензилбутаноил -Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Изомер 2</i>		Leu	Leu	3a	C50H87N1 5O12	1089,7	9,1	1091 [MH+] 546 [M+2H] <sup>2+</sup>
9	( <i>R</i> )-4-амино-3-бензилбутаноил -Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Изомер 1</i>		Phe	Leu	3a	C53H85N1 5O12	1123,7	10,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
10	( <i>S</i> )-4-амино-3-бензилбутаноил -Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Изомер 2</i>		Phe	Leu	3a	C53H85N1 5O12	1123,7	11,0	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
11	( <i>R</i> )-4-амино-3-(3-хлорбензил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Изомер 1</i>		Phe	Leu	3a	C53H84Cl N15O12	1157,6	11,0	1159 [MH+] 580 [M+2H] <sup>2+</sup>
12	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3-хлорбензил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Изомер 2</i>		Phe	Leu	3a	C53H84Cl N15O12	1157,6	11,4	1159 [MH+] 580 [M+2H] <sup>2+</sup>

13	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3-хлорбензил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Изомер 2</i>		Leu	Leu	3a	C50H86Cl N15O12	1123,6	10,4	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
14	( <i>R</i> )-4-амино-3-(3-хлорбензил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Изомер 1</i>		Leu	Leu	3a	C50H86Cl N15O12	1123,6	9,9	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
15	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3-изопропилфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Leu	3a	C52H91N1 5O12	1117,7	10,7	1119 [MH+] 560 [M+2H] <sup>2+</sup>
16	( <i>R</i> )-4-амино-3-(3-изопропилфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Leu	3a	C52H91N1 5O12	1117,7	10,9	1119 [MH+] 560 [M+2H] <sup>2+</sup>
17	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3-изопропилфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Abu	1	C53H85N1 5O12	1123,7	9,2	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
18	( <i>R</i> )-4-амино-3-(3-изопропилфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Abu	1	C53H85N1 5O12	1123,7	9,4	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
19	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3-изопропилфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Thr-Dab-Dab-Thr]		Leu	Thr	1	C50H87N1 5O13	1105,7	7,6	1107 [MH+] 554 [M+2H] <sup>2+</sup>
20	( <i>R</i> )-4-амино-3-(3-изопропилфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Thr-Dab-Dab-Thr]		Leu	Thr	1	C50H87N1 5O13	1105,7	7,8	1107 [MH+] 554 [M+2H] <sup>2+</sup>
21	( <i>S</i> )-4-амино-3-( <i>m</i> -толил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C53H85N1 5O12	1123,7	8,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>

22	( <i>R</i> )-4-амино-3-( <i>m</i> -толил)бутаноил- Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C53H85N1 5O12	1123,7	8,9	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
23	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3-хлорфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	2	C47H80Cl N15O12	1081,6	9,2	1083 [MH+] 542 [M+2H] <sup>2+</sup>
24	( <i>S</i> )-3-([1,1'-бифенил]-3-ил)-4-аминобутаноил- Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3b	C53H85N1 5O12	1123,7	8,5	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
25	( <i>R</i> )-3-([1,1'-бифенил]-3-ил)-4-аминобутаноил- Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3b	C53H85N1 5O12	1123,7	8,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] <sup>2+</sup>
26	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3-изобутилфенил)бутаноил-Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H89N1 5O12	1103,7	8,9	1105 [MH+] 553 [M+2H] <sup>2+</sup>
27	( <i>R</i> )-4-амино-3-(3-изобутилфенил)бутаноил-Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H89N1 5O12	1103,7	9,1	1105 [MH+] 553 [M+2H] <sup>2+</sup>
28	( <i>S</i> )-4-амино-3-(3,5-дихлорфенил)бутаноил--Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DnorLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Norleu	Abu	2	C47H79Cl2 N15O12	1115,5	8,0	1117 [MH+] 559 [M+2H] <sup>2+</sup>
29	( <i>R</i> )-4-амино-3-(3,5-дихлорфенил)бутаноил--Thr- Дар-цикло[Dab-Dab-DnorLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Norleu	Abu	2	C47H79Cl2 N15O12	1115,5	8,1	1117 [MH+] 559 [M+2H] <sup>2+</sup>

30	(S)-4-амино-3-(3-(тиофен-3-ил)фенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H83N1 5O12S	1129,6	8,4	1131 [MH+] 566 [M+2H] <sup>2+</sup>
31	(R)-4-амино-3-(3-(тиофен-3-ил)фенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H83N1 5O12S	1129,6	8,5	566 [M+2H] <sup>2+</sup>
32	(S)-4-амино-3-(3-бромфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C47H80Br N15O12	1125,5	7,1	1128 [MH+] 564 [M+2H] <sup>2+</sup>
33	(R)-4-амино-3-(3-бромфенил)бутаноил-Thr-Дар-цикло[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C47H80Br N15O12	1125,5	7,5	1128 [MH+] 564 [M+2H] <sup>2+</sup>

#### Результаты биологических исследований.

Были исследованы соединения, предложенные в настоящем изобретении, и проведено сравнение результатов со сравнительными примерами, включающими соединения, ранее описанные в данной области техники.

#### Определение МИС.

Инокулят готовили путем получения прямой суспензии выделенных колоний (отобранных с чашки с агаром Мюллера-Хинтона через 18-24 ч), доведенной до мутности 0,5 по стандарту МакФаранда. Определение МИС проводили с применением двукратных серийных разведений антибиотиков в бульоне Мюллера-Хинтона со стандартизированным содержанием катионов в стерильных 96-луночных микротитрационных планшетах в общем объеме 170 мкл (150 мкл бульона, содержащего противомикробный агент, 20 мкл инокулята). Исследования проводили в двух параллельных испытаниях. Планшеты инкубировали в аэробных условиях без встряхивания в течение от 18 до 20 ч при 35°C, при этом МИС определяли как самую низкую концентрацию лекарственного средства, предотвращающую видимый рост. Некоторые из соединений подвергали многократным исследованиям, и в этом случае приведенное значение МИС представляет собой полученное среднее значение. Значения МИС указаны в мкг/мл.

#### Анализ нефротоксичности in vitro.

Анализ нефротоксичности in vitro проводили согласно следующему протоколу.

Клетки НК-2 поддерживали и анализировали в бессывороточной среде, содержащей кератиноцитарный фактор роста (Keratinocyte-SFM media), дополненной 5 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) и 50 мкг/мл экстракта гипофиза быка (BPE). Клетки высевали из расчета 7500 клеток на лунку в 96-луночные планшеты и оставляли для прилипания на ночь. Полимиксин В (РМВ) и исследуемые соединения растворяли в 10% ДМСО в воде с получением маточного раствора с концентрацией 20 и 60 мг/мл соответственно. Исследуемые соединения разбавляли до обеспечения максимальной концентрации 3000 или 1000 мкг/мл посредством полулогарифмических разведений с получением диапазона концентраций в 9 точках плюс контроль носителем. РМВ также разбавляли до получения максимальной концентрации 1000 мкг/мл посредством полулогарифмических разведений. Содержание воды и ДМСО поддерживали постоянным на уровне 5 и 0,5% соответственно. Исследуемые соединения инкубировали с клетками в течение 24 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере. CellTiter-Blue разбавляли в ФСБ (фосфатно-солевом буфере) (1:4), добавляли 20% (об./об.) и инкубировали при 37°C в течение 2 ч перед обнаружением флуоресцентного продукта.

Перед анализом данных с применением GraphPad Prism вычитали фоновые значения для среды. Отдельные значения для каждого соединения нормализовали относительно лунок, применяемых для контроля носителем. Строили график значений концентрации соединения в виде логарифмических значений для аппроксимации кривой доза-ответ. Нижнюю часть кривой ограничивали нулевым значением и опре-

деляли значения  $IC_{50}$ .

Значения  $IC_{50}$  выражены относительно значения  $IC_{50}$  для РМВ в том же эксперименте. При проведении многократных определений приведены медианные значения.

Измерения уровня содержания в почках через 4 ч.

Соединения вводили мышам подкожно в расчете 17,2 мг/кг свободного основания (n=2 или 3). Через 4 ч после введения дозы животных умерщвляли и почки удаляли, очищали от жира и соединительной ткани, взвешивали и сразу же быстро замораживали. После оттаивания при комнатной температуре пары почек каждого животного помещали в конические пробирки объемом 2 мл, содержащие предварительно взвешенные шарики оксида циркония, стабилизированного церием. Добавляли трифторуксусную кислоту, ТФУК (0,25 мл, 0,15% об./об. в воде) и загружали пробирки в гомогенизатор FastPrep-24 (MP Biomedicals Europe) и подвергали 3 циклам по 30 с каждый со скоростью 6 м/с. Аликвоту (200 мкл) гомогената разбавляли рассчитанным объемом раствора ТФУК (0,15% об./об. в воде) с получением конечной концентрации 0,167 г почки/грамм гомогената.

Гомогенаты почек (100 мкл) смешивали с метанолом (190 мкл) и ТФУК (110 мкл, 10% об./об. в воде) и хранили в течение ночи при  $-20^{\circ}C$  для осаждения белка. После 10 мин центрифугирования при 13000 об/мин и  $6^{\circ}C$  200 мкл супернатантов переносили в стеклянные вставки и анализировали посредством жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС-МС).

Таблица 2

## Результаты биологических исследований

Пример	AlogP	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>		НК-2 в отношении РМВ	Уровень в почках через 4 часа (мкг/г)*	Уровень в почках через 4 ч/относительно НК-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
1	-6,3	4	0,125	8	0,125	0,25	0,06	0,06	0,06	8,8	267	30
2	-6,3	8	0,25	2	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	7,2	538	75
3	-6,3	32	1	65	0,5	0,5	0,5	1	2	Н/О	Н/О	Н/О
4	-6,3	16	0,5	16	0,25	0,5	0,25	1	1	Н/О	Н/О	Н/О
5	-6,3	8	0,125	16	0,125	0,25	0,25	0,06	0,125	11,6	170	15
6	-6,3	8	0,125	8	0,125	0,5	0,125	0,5	0,5	7,8	381	49
7	-6,9	16	0,25	32	Н/О	0,25	0,125	0,125	0,125	Н/О	Н/О	Н/О
8	-6,9	16	0,125	32	Н/О	0,5	0,06	0,25	0,125	Н/О	Н/О	Н/О
9	-6,5	8	0,25	64	0,25	0,5	0,125	0,125	0,25	12,0	159	13
10	-6,5	8	0,125	16	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25	8	346	43
11	-5,9	4	0,5	16	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	5,2	163	32
12	-5,9	4	0,5	8	0,5	0,5	0,125	0,25	0,25	Н/О	Н/О	Н/О
13	-6,2	8	0,5	16	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	Н/О	Н/О	Н/О
14	-6,2	8	1	32	0,5	1	0,5	0,5	0,5	Н/О	Н/О	Н/О
15	-6,1	4	0,125	16	0,125	0,5	0,25	0,06	0,06	52,1	443	8,5
16	-6,1	16	0,5	8	0,25	1	0,5	0,5	0,5	Н/О	Н/О	Н/О
17	-6,5	8	0,125	16	0,125	0,25	0,125	0,06	0,06	29,0	231	8
18	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	32,8	535	16,3
19	-7,9	32	0,25	64	0,25	1	0,25	0,25	0,25	101,4	386	4



20	-7,9	64	1	64	2	2	0,5	1	2	Н/О	Н/О	Н/О
21	-6,5	16	0,125	32	0,25	0,5	0,25	0,125	0,125	26,7	209	8
23	-7,4	32	0,125	64	0,125	0,5	0,25	0,125	Н/О	>41	263	<6,4
22	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,5	0,25	1	1	Н/О	Н/О	Н/О
24	-6,5	4	0,125	16	0,25	0,25	0,125	0,06	0,03	21,8	203	9
25	-6,5	16	0,25	2	0,5	0,5	0,25	0,125	0,125	Н/О	Н/О	Н/О
26	-6,4	8	0,06	8	0,5	0,5	0,25	0,03	0,06	>58	353	<6,1
27	-6,4	16	0,25	2	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	Н/О	Н/О	Н/О
28	-6,5	16	0,125	8	0,125	0,25	0,25	0,06	0,125	68,5	408	6,0
29	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,5	0,25	0,125	0,125	Н/О	Н/О	Н/О
30	-6,8	8	0,125	16	0,125	0,5	0,25	0,06	Н/О	37,5	252	6,7
31	-6,8	16	0,125	4	0,25	0,25	0,25	0,125	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
32	-7,3	32	0,25	32	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125	Н/О	Н/О	Н/О
33	-7,3	64	0,5	16	0,5	0,5	0,5	1	1	Н/О	Н/О	Н/О

Н/О - не определено (не исследовано).

Дополнительные биологические данные.

Сравнение нефротоксичности - пример 5 и эталонные примеры D77 и 38.

Мышам (n=6) подкожно три раза в день вводили дозу полимиксина В, сульфата колистина, эталонного примера D77, эталонного примера 38 или примера 5 из расчета 17,2 мг свободного основания/кг. Начиная сразу же после введения первой дозы на день 4, мышей переводили в отдельные метаболические клетки и в течение следующих 24 ч собирали мочу для определения уровней биомаркеров (альбумина, цистатина С, КИМ-1). Средние геометрические уровни биомаркеров приведены ниже в таблице.

Соединение	Альбумин (мкг/24 ч)	Цистатин С (нг/24 ч)	КИМ-1 (нг/24 ч)
РМВ	1154 - 1912	1155 - 1400	4 - 22
Колистин	2353 - 2548	1266 - 1678	42 - 89
Эталонный пример D77	3639	7542	130
Эталонный пример 38	2362	14015	79
Пример 5	1004	827	3

Значения для РМВ показывают диапазон из 4 экспериментов и для колистина из 2 экспериментов.

Повышение уровня альбумина, цистатина С или КИМ-1 в моче являются признаком поражения почек. Пример 5 продемонстрировал самые низкие уровни всех трех биомаркеров нефротоксичности.

Эталонный пример D77 описан в WO 2015/135976. Эталонный пример 38 описан в WO 2016/083531.

Сравнение нефротоксичности - примеры 5, 9 и 17.

Мышам (n=6) вводили подкожно РМВ, пример 5, пример 9 или пример 17 из расчета 25 мг свободного основания/кг для четырех доз через 8-часовые интервалы. После четвертой дозы животных переводили в отдельные метаболические клетки и в течение 24 ч собирали мочу для определения в моче биомаркеров. После сбора мочи мышей умерщвляли и собирали почки для гистопатологического исследования.

Соединение	Альбумин (мкг/24 ч)	Цистатин С (нг/24 ч)	КИМ-1 (нг/24 ч)
РМВ	1147	1425	58
Пример 5	343	448	1
Пример 9	749	754	2

Согласно гистопатологическим исследованиям ни одно из животных в группах, принимавших пример 5 или пример 9, не показало каких-либо признаков дегенерации или регенерации. Напротив, все 6 животных, получавших РМВ, продемонстрировали минимальную регенерацию канальцев.

В отдельном эксперименте пример 17 сравнивали с РМВ.

Соединение	Повышение по сравнению с контролем носителем		
	Альбумин	Цистатин С	КИМ-1
РМВ	29 ×	2 ×	771 ×
Пример 17	2,7 ×	1,8 ×	4,7 ×

Также была проведена оценка гистопатологических признаков.

	РМВ	Пример 17
Тубулярная дегенерация/некроз	4 в нормальном состоянии/1 минимальное повреждение	Все в нормальном состоянии
Базофильные каналцы	4 минимальное повреждение/1 легкое повреждение	3 в нормальном состоянии/2 минимальное повреждение

Сравнение нефротоксичности примера 5 и РМВ у яванского макака Самцам яванского макака (n=3) внутривенно вводили пример 5 инфузией в течение 1 ч из расчета 20 мг/кг/доза 3 раза в день в течение 7 дней. В отдельном эксперименте самцам обезьян (n=3) вводили РМВ в течение такого же периода времени из расчета 4 мг/кг/доза. В обоих экспериментах контрольным животным 3 раза в день вводили физиологический раствор.

В конце 7-дневного периода отбирали пробы крови и определяли уровни азота мочевины и креатинина в сыворотке крови в качестве индикаторов повреждения почек. В случае примера 5 средние уровни АМК (азота мочевины в крови) и креатинина были повышены менее чем на 50% по сравнению с контрольными животными, получавшими физиологический раствор. Однако у животных, которым вводили дозу РМВ, уровень АМК был повышен на 76% по сравнению с контрольными животными, а уровень креатинина был в 2,6 выше.

В конце 7-дневного периода дозирования почки собирали и исследовали под микроскопом. Из трех животных, получавших РМВ, у 2 животных наблюдалась легкая дегенерация каналцев, а у 1 животного - минимальная. Из животных, которым вводили пример 5, у 1 животного наблюдалась легкая дегенерация каналцев, а у 2 животных - минимальная дегенерация.

В описанных экспериментах доза примера 5 была в 5 раз выше, чем доза РМВ, но признаки нефротоксичности уменьшились. Экспозиция лекарственного средства для одного цикла дозирования на день 7 дозирования (AUC<sub>0-8 ч</sub>) составляла 234 мкг·ч/мл для примера 5 и 117 мкг·ч/мл для РМВ.

Эффективность соединений в модели бедра мышцы с нейтропенией, инфицированной *E. coli* ATCC 25922

После развития нейтропении (циклофосфамид 150 мг/кг день-4, 100 мг/кг день-1) мышам CD-1 (n=5) инокулировали в каждое бедро приблизительно 105 КОЕ *E. coli* ATCC25922. Мышам внутривенно вводили 0,125, 0,5 и 3 мг/кг сульфата РМВ или исследуемого соединения (в виде свободного основания с эквивалентной массой) через 1, 3,5 и 6 ч после инфицирования. Через 9 ч после инфицирования мышей умерщвляли и подготавливали бедра для определения количества колоний микроорганизмов.

Уменьшение количества колоний микроорганизмов по сравнению с контролем носителем показано ниже в таблице. В каждом случае уменьшение, наблюдаемое при применении РМВ в том же эксперименте, показано в скобках.

Соединение	Логарифмическое падение КОЕ по сравнению с контролем носителем		
	0,125 мг/кг	0,5 мг/кг	3 мг/кг
Пример 5	0,1 (0,4)	2,2 (2,6)	3,4 (3,5)
Пример 9	0,1 (0,4)	0,5 (0,6)	3,7 (3,9)
Пример 17	0 (0,1)	1,3 (1,1)	3,7 (3,7)
Пример 24	0 (0)	0,4 (0,5)	2,4 (2,9)

Все соединения были так же эффективны, как и РМВ.

Эффективность соединений в модели бедра мышцы с нейтропенией, инфицированной *K. pneumoniae* ATCC 43816

После развития нейтропении (циклофосфамид 150 мг/кг день-4, 100 мг/кг день-1) мышам CD-1 (n=5) инокулировали в каждое бедро приблизительно 105 КОЕ *K. pneumoniae* ATCC43816. Мышам внутривенно вводили соответствующие дозы сульфата РМВ или исследуемого соединения (в виде свободного основания с эквивалентной массой) через 2, 6 и 10 ч после инфицирования. Через 16 ч после инфици-

рования мышей умерщвляли и подготавливали бедра для определения количества колоний микроорганизмов.

Уменьшение количества колоний микроорганизмов по сравнению с контролем носителем показано ниже в таблице. В каждом случае уменьшение, наблюдаемое при применении РМВ в том же эксперименте, показано в скобках.

Доза (мг/кг)	Логарифмическое падение КОЕ по сравнению с контролем носителем	
	Пример 5	Пример 24
0,125	0 (0,2)	0 (0,2)
0,25	Н/О	0,2 (0,2)
0,5	4,8 (4,9)	0,2 (0,9)
1	4,8 (5,2)	Н/О
2	Н/О	4,7 (4,0)
4	5,3 (5,6)	Н/О

Н/О = не определено.

Оба соединения были так же эффективны, как и РМВ.

Эффективность соединений в модели бедра мыши с нейтропенией, инфицированной *A. baumannii* NCTC13301

После развития нейтропении (циклофосфамид 150 мг/кг день-4, 100 мг/кг день-1) мышам CD-1 (n=5) инокулировали в каждое бедро приблизительно 105 КОЕ *A. baumannii* NCTC13301. Мышам внутривенно вводили 0,125, 0,5, 1 и 4 мг/кг сульфата РМВ или исследуемого соединения (в виде свободного основания с эквивалентной массой) через 2, 6 и 10 ч после инфицирования. Через 16 ч после инфицирования мышей умерщвляли и подготавливали бедра для определения количества колоний микроорганизмов.

Уменьшение количества колоний микроорганизмов по сравнению с контролем носителем показано ниже в таблице. В каждом случае уменьшение, наблюдаемое при применении РМВ в том же эксперименте, показано в скобках.

Доза (мг/кг)	Логарифмическое падение КОЕ по сравнению с контролем носителем	
	Пример 5	Пример 24
0,125	0,4 (0,3)	0,1 (0,1)
0,5	3,1 (4,2)	2,2 (4,1)
1	6,7 (5,8)	5,5 (5,0)
4	7,4 (6,5)	5,7 (5,3)

Оба соединения были так же эффективны, как и РМВ.

Эффективность соединений в модели легких мышей с нейтропенией, инфицированных *A. baumannii* NCTC13301

После развития нейтропении (циклофосфамид 200 мг/кг день-4, 150 мг/кг день-1) мышей CD-1 (n=8) инокулировали интраназально с применением приблизительно 107 КОЕ на легкое *A. baumannii* NCTC13301. Мышам вводили подкожно сульфат РМВ (20 мг/кг) или соответствующие дозы исследуемого соединения (в виде свободного основания с эквивалентной массой) через 2, 6 и 10 ч после инфицирования. Через 16 ч после инфицирования мышей умерщвляли и подготавливали легкие для определения количества колоний микроорганизмов.

Уменьшение количества колоний микроорганизмов по сравнению с контролем носителем показано ниже в таблице. В каждом случае уменьшение, наблюдаемое при применении РМВ в том же эксперименте, показано в скобках.

Доза (мг/кг)	Логарифмическое падение КОЕ по сравнению с контролем носителем	
	Пример 5	Пример 24
2,5	0	0,9
10	0	1,6
20	2,5 (0)	2,7 (0)
30	4,0	3,9

РМВ не был эффективен в этой модели при максимально переносимой дозе. Пример 5 был более эффективен при 20 мг/кг, и благодаря пониженной токсичности его также можно было вводить при более высоких уровнях с достижением большего эффекта.

Эффективность соединений в модели легких мышей с нейтропенией, инфицированных *P. aeruginosa* ATCC 27853

После развития нейтропении (циклофосфамид 200 мг/кг день-4, 150 мг/кг день-1) мышей CD-1 (n=8) инокулировали интраназально с применением 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> КОЕ на легкое *P. aeruginosa* ATCC27853. Мышам подкожно вводили соответствующие дозы сульфата РМВ или исследуемого соединения (в виде свободного основания с эквивалентной массой) через 2, 6 и 10 ч после инфицирования. Через 16 ч после инфицирования мышей умерщвляли и подготавливали легкие для определения количества колоний микроорганизмов.

Уменьшение количества колоний микроорганизмов по сравнению с контролем носителем показано ниже в таблице. В каждом случае уменьшение, наблюдаемое при применении РМВ в том же эксперименте, показано в скобках.

Доза (мг/кг)	Логарифмическое падение КОЕ по сравнению с контролем носителем	
	Пример 5	Пример 24
2,5	0 (0)	0,8 (0,3)
5	0 (0)	Н/О
7,5	Н/О	3,2 (1,0)
10	2 (0,7)	Н/О
20	3,6 (2,6)	4,4 (3,7)
40	Н/О	5,7

Н/О = не определено.

Оба соединения показали в этой модели эффективность, превышающую эффективность РМВ.

Значения МИС для примера 5 в присутствии рифампицина

Организм	№ коллекции штамма	Известный резистентный генотип	Полимиксин В (РМВ)	РМВ +рифампицин (1 мкг/мл)	Пример 5	Пример 5 +рифампицин (1 мкг/мл)
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	NA	0,25	≤0,015	0,125	≤0,015
	CDF-1	MCR-1	4	0,06	8	0,06
	ИНМА 940398	NA	16	0,06	32	0,125
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13882	NA	0,25	0,06	0,125	0,06
	ИНМА 580884	NA	8	0,06	16	0,125
	ИНМА 520329	SHV-12, KPC-2	64	0,125	>64	0,06
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	NA	0,5	0,125	0,25	0,125
	ИНМА 517175	NA	8	0,25	8	0,5
	ИНМА 644636	NA	32	0,5	32	1
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	OXA-23	0,25	≤0,015	0,06	≤0,015
	ИНМА 851735	OXA-23	8	0,03	0,25	≤0,015
	ИНМА 517303	NA	>64	0,125	>64	0,03

Значения МИС (мкг/мл) определяли путем микроразведения бульона в условиях согласно CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute (Институт клинических и лабораторных стандартов)).

Как РМВ, так и пример 5 продемонстрировали сильный синергизм с рифампицином даже против штаммов с пониженной чувствительностью к полимиксинам.

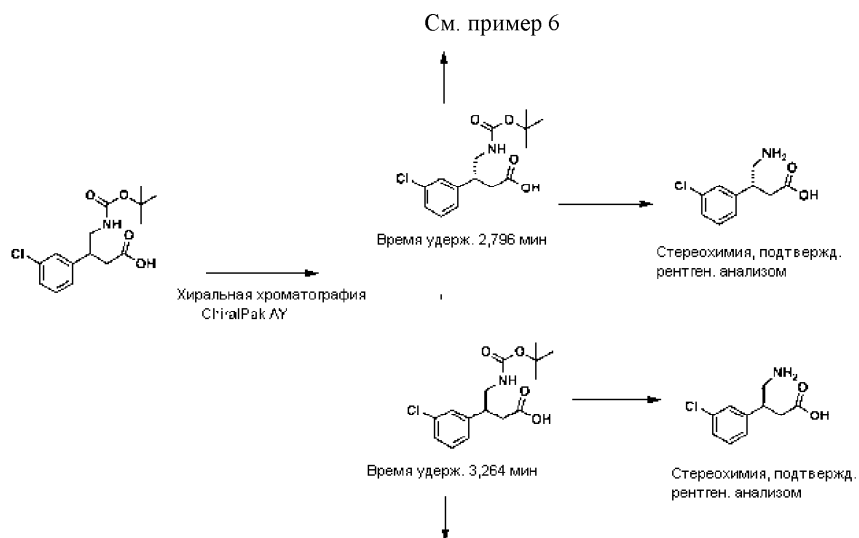
Стереохимическое исследование.

Соединения согласно настоящему изобретению содержат стереоцентр в β-положении γ-аминопропильной группы в N-концевом фрагменте. Неожиданно было обнаружено, что один из стереоизомеров в этом положении обычно связан с более низкой цитотоксичностью и более низкими уровнями лекарственного средства в почках. Это тот самый стереоизомер, который более быстро элюируется при обращенно-фазовой хроматографии.

Например, в паре диастереоизомеров, относящихся к примерам 5 и 6, диастереомер, который элюируется из колонки при обращенно-фазовой ВЭЖХ быстрее, демонстрирует меньшее воздействие на почки и более низкую цитотоксичность, чем соответствующий более медленный изомер. Более быстрый диастереомер (пример 5) получают из (S)-4-амино-3-(3-хлорфенилмасляной кислоты) согласно рентгеновскому анализу малых молекул соответствующей аминокислоты (как показано на схеме ниже).

## Схема 1

Медленный изомер при ОФ-ВЭЖХ



Быстрый изомер при ОФ-ВЭЖХ

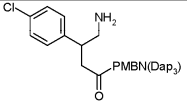
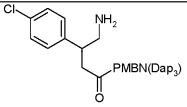
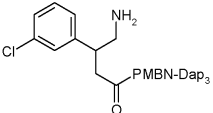
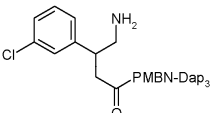
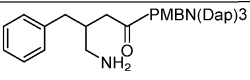
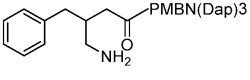
См. пример 5

Результаты дальнейшего сравнения показаны ниже в табл. 3. Диастереомеры (эпимеры в N-концевой группе), которые элюируются быстрее при обращенно-фазовой хроматографии и которые имеют химические сдвиги ЯМР, аналогичные сдвигам, приведенным для примера 5, вероятно, должны иметь такую же абсолютную стереохимию, что и пример 5, описанный выше.

Абсолютная стереохимия, приписанная каждому из соединений, приведенных в табл. 3, показана в табл. 1.

Таблица 3

## Результаты определения стереохимии

Пример	Структура	Цитотоксичность	Уровень лекарственного средства в почках	Уровень в почках через 4 ч/относительная цитотоксичность
1	 «Быстрый» изомер	8,8	268	30
2	 «Медленный» изомер	7,2	538	75
5	 «Быстрый» изомер	11,6	170	15
6	 «Медленный» изомер	7,8	381	49
9	 «Быстрый» изомер	12,0	159	13
10	 «Медленный» изомер	8,0	346	43

Цитотоксичность относится к измеренной  $IC_{50}$  относительно  $IC_{50}$ , зафиксированной для полимиксина В в отношении клеточной линии НК-2.

Уровень лекарственного средства относится к количеству соединения, обнаруженному в почках через 4 ч после подкожного введения в модели мыши дозы 17,2 мг/кг (мкг/г).

Дополнительная информация.

Нефротоксичность примера 24 по сравнению с РМВ после введения четырех дозу мышей

Группам мышей-самцов CD-1 (n=5) вводили подкожно четыре раза через 8-часовые интервалы либо полимиксин В (РМВ) из расчета 12,5 или 25 мг свободного основания/кг, либо соединение из примера 24 из расчета 25, 50 или 75 мг свободного основания/кг. Сразу же после введения четвертой дозы мышей переводили в метаболические клетки и в течение 24 ч собирали мочу для определения биомаркеров в моче. После сбора мочи мышей умерщвляли для проведения гистопатологического анализа почек. Средние уровни биомаркеров показаны в табл. 4.

Таблица 4

## Биомаркеры в моче

Соединение	Доза (мг/кг)	Биомаркеры в моче				
		Цистатин С	$\beta$ -2 микроглобулин	Kim-1	NGAL	Альбумин
Носитель	-	22,24	0,05	17,01	0,00	3,44
РМВ	12,5	29,45	3,43	21,89	0,30	3,75
РМВ	25	44,51	43,83	3446,42	4,37	7,73
Пример 24	25	31,04	0,05	27,61	0,00	4,78
Пример 24	50	33,97	13,22	171,59	0,63	6,95
Пример 24	75	81,44	68,51	1203,41	3,71	10,93

Содержание биомаркеров в моче нормализовали относительно содержания креатинина в моче.

Для всех пяти биомаркеров экспрессия при введении примера 24 в дозе 50 мг/кг была ниже, чем при введении РМВ в дозе 25 мг/кг, а для двух (Kim-1, NGAL) из пяти биомаркеров экспрессия при дозе 75 мг/кг была ниже, чем экспрессия при дозе РМВ 25 мг/кг.

Результаты гистопатологического анализа показаны в табл. 5.

Таблица 5

Результаты гистопатологического анализа

Соединение	Доза (мг/кг)	Гистопатология		
		Дегенерация/некроз канальцев	Базофильные канальцы (корковое вещество)	Увеличенные фигуры митоза
Носитель	-	0/5	0/5	0/5
РМВ	12,5	0/5	0/5	0/5
РМВ	25	5/5 (2 минимальное повреждение/2 легкое повреждение/1 умеренное повреждение*)	5/5 (1 минимальное повреждение/2 легкое повреждение/2 умеренное повреждение*)	3/5 (2 минимальное повреждение/1 легкое повреждение)
Пример 24	25	0/5	0/5	0/5
Пример 24	50	2/5 (2 минимальное повреждение)	2/5 (2 минимальное повреждение)	2/5 (2 минимальное повреждение)
Пример 24	75	5/5 (1 минимальное повреждение/3 легкое повреждение/1 умеренное повреждение))	5/5 (2 минимальное повреждение/1 легкое повреждение/1 умеренное повреждение/1 заметное повреждение)	5/5 (5 минимальное повреждение)

\* Во время исследования одно животное умерло.

Гистопатология почек при введении примера 24 в дозе 50 мг/кг была менее серьезной, чем в случае РМВ при дозе 25 мг/кг, при этом гистопатология почек была похожей при введении примера 24 в дозе 75 мг/кг по сравнению с дозой РМВ, составляющей 25 мг/кг.

#### Цитируемые источники

Все документы, упоминаемые в настоящем описании, полностью включены в него посредством ссылки.

de Visser *et al. J. Peptide Res*, **61**, 2003, 298

Dolomanov *et al. J. Appl. Cryst.* **42**, 2009, 339

Felluga *et al. Tetrahedron Asymmetry*, **19**, 2008, 945

Sheldrick *Acta Cryst. A* **71**, 2015, 3-8

Sheldrick *Acta Cryst. C* **71**, 2015, 3-8

Vaara *et al. Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, **52**, 2008. 3229

Velkov *et al. ACS Chem. Biol.* **9**, 2014, 1172

Velkov *et al. ACS Chem. Biol.* **9**, 2014, 1172

WO 2014/188178

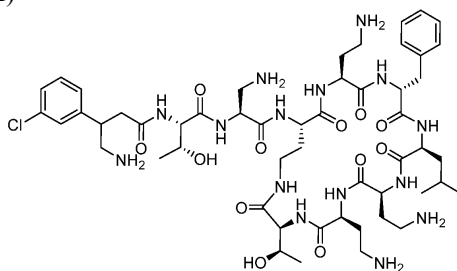
WO 2016/083531

WO 2013/072695

WO 2015/135976

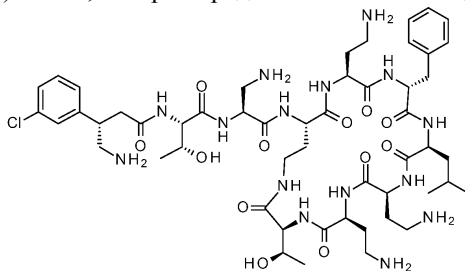
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. Соединение формулы (II)



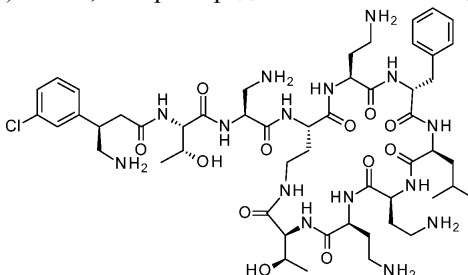
и его соли и сольваты.

## 2. Соединение формулы (II) по п.1, которое представляет собой соединение



и его соли и сольваты.

## 3. Соединение формулы (II) по п.1, которое представляет собой соединение



и его соли и сольваты.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-3, вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

5. Применение соединения по любому из пп.1-3 или фармацевтической композиции по п.4 для лечения или профилактики бактериальной и/или грибковой инфекции.

6. Применение соединения по любому из пп.1-3 или фармацевтической композиции по п.4 для лечения микробной инфекции.

7. Применение по п.6, где микробная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию.

8. Применение по п.7, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную грамотрицательной бактерией.

9. Применение по п.8, где грамотрицательная бактерия выбрана из *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Yersinia pseudotuberculosis* и других энтеробактерий, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Vdellovibrio*, уксуснокислых бактерий, *Legionella* и альфа-протеобактерий.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2