



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.07

(21) Номер заявки
201990710

(22) Дата подачи заявки
2017.09.13

(51) Int. Cl. *A61K 39/385* (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(54) НОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 1615560.8; 1707076.4

(32) 2016.09.13; 2017.05.04

(33) GB

(43) 2019.08.30

(86) PCT/GB2017/052699

(87) WO 2018/051085 2018.03.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕНТАУРИ ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Глоссоп Мелани, Уотсон Кристин,
Вестби Майкл (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2004185054
SASCHA A. KRISTIAN ET AL.: "Retargeting pre-existing human antibodies to a bacterial pathogen with an alpha-Gal conjugated aptamer", JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE., vol. 93, no. 6, 5 May 2015 (2015-05-05), pages 619-631, XP55327406, DE ISSN: 0946-2716, DOI: 10.1007/s00109-015-1280-4, abstract, page 623, column 2, line 11 - line 15
LI JUN ET AL.: "Bacteria targeted by human natural antibodies using alpha-Gal conjugated

receptor-specific glycopolymers", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 7, no. 8, 1 August 1999 (1999-08-01), pages 1549-1558, XP002404043, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/50968-0896(99)00099-1, abstract

KANNAN P. NAICKER ET AL.: "Design and synthesis of alpha-Gal-conjugated peptide T20 as novel antiviral agent for HIV-immunotargeting", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 2, no. 5, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 660-664, XP55025921, ISSN: 1477-0520, DOI: 10.1039/B313844E, abstract

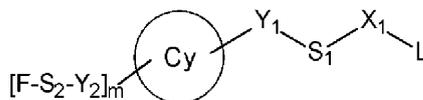
WO-A1-2017060729

WO-A1-2017060728

FERGUSON ELAINE L. ET AL.: "Dextrin-colistin conjugates as a model bioresponsive treatment for multidrug resistant bacterial infections.", MOLECULAR PHARMACEUTICS 01 DEC 2014, vol. 11, no. 12, 1 December 2014 (2014-12-01), pages 4437-4447, XP002775530, ISSN: 1543-8392, abstract

H. TSUBERY ET AL.: "Neopeptide Antibiotics That Function as Opsonins and Membrane-Permeabilizing Agents for Gram-Negative Bacteria", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 49, no. 8, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 3122-3128, XP55083865, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.49.8.3122-3128.2005, abstract

(57) Изобретение относится к новым соединениям со способностью связывать иммунный ответ с патогеном, к применению указанных соединений при заболевании или расстройстве, опосредованном и/или вызванном инфекционным агентом, к композициям, содержащим указанные соединения, способам их получения и к новым промежуточным соединениям, используемым в указанном способе.



(I)

Область, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новым соединениям со способностью связывать иммунный ответ с патогеном, к применению указанных соединений при заболевании или расстройстве, опосредованном и/или вызванном инфекционным агентом, к композициям, содержащим указанные соединения, способам их получения и к новым промежуточным соединениям, используемым в указанном способе.

Предпосылки создания изобретения

Необходимо найти новые способы мобилизации иммунной системы человека для борьбы с болезнями. Иммунная система человека постоянно осуществляет надзор за организмом в поисках чужеродных сигналов для выявления потенциально вредных патогенов или мутировавших клеток человека (которые могут стать причиной злокачественного роста) и нацеливается на них для уничтожения. Существуют природные антитела, которые могут быть рекрутированы к указанным патогенам или мутировавшим клеткам человека для направления иммунной системы на устранение угрозы. Изобретение детально рассматривает использование нового набора линкерных молекул, которые предназначены для привлечения этих природных антител таким образом, чтобы можно было максимизировать эффективность рекрутирования клеток иммунной системы при минимизации потенциальных побочных эффектов.

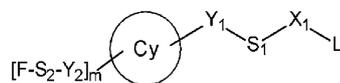
Существует острая необходимость в выявлении новых способов лечения бактериальных, вирусных и грибковых инфекций. Лекарственная резистентность становится главной угрозой здоровью во всем мире. Например, более 2 млн человек в США были инфицированы бактериями, резистентными по меньшей мере к одному классу антибиотиков (Центры по контролю и профилактике заболеваний, 2013). В целом, выявление новых антибиотиков, нацеленных на резистентные штаммы грамотрицательных организмов, является особенно трудным, отчасти из-за сложной и эволюционирующей стратегии, которую эти бактерии используют для предотвращения действия антибиотиков (например, продукция инактивирующих антибиотиков ферментов, способность передавать резистентность между штаммами, эффлюксные насосы для предотвращения внутриклеточного действия), вместе с их природно непроницаемыми клеточными мембранами, которые затрудняют идентификацию лекарственных средств, которые проникают в клетку и ингибируют ключевые мишени. Кроме того, многие штаммы используют механизмы множественной резистентности, которую трудно преодолеть с использованием только одного антибиотика.

Инновационный подход к лечению инфекционного заболевания был раскрыт в заявке WO 01/45734, которая описывает набор новых линкеров иммунитета. Примеры указанных линкерных молекул включают соединения или агенты, которые распознаются иммунной системой указанного индивидуума как чужеродные и которые, следовательно, будут вызывать иммунный ответ. Одним из таких примеров является молекула углевода, способная связываться с человеческим анти-альфа-галактозил-антителом (то есть галактозил-альфа-1,3-галактозил-бета-1,4-N-ацетилглюкозамином), что приводит к перенаправлению природного человеческого сывороточного антитела анти-альфа-галактозила. Получаемый эффект указанной молекулы линкера иммунитета состоит в том, что иммунный ответ индивидуума отклоняется от ранее существовавшего иммунного ответа указанного индивидуума в направлении к мишени, т.е. патогену.

Следовательно, существует потребность в альтернативных линкерных молекулах иммунитета для лечения заболевания или расстройства, опосредованного и/или вызванного инфекционным агентом.

Сущность изобретения

В соответствии с первым аспектом изобретения обеспечивается соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль



(I)

где

L представляет собой полимиксин;

S₁ представляет собой связь или спейсер, выбранный из -(CH₂)_a- или -(CH₂)_b-(CH₂-CH₂-O)_c-(CH₂)_d- группы, где от одной до пяти указанных -CH₂- групп необязательно могут быть замещены -C(O)NH- или -NHC(O)- группой;

a представляет собой целое число, выбранное из 1-40;

b представляет собой целое число, выбранное из 0-25;

c представляет собой целое число, выбранное из 1-20;

d представляет собой целое число, выбранное из 1-15;

S₂ представляет собой спейсер, выбранный из -(CH₂)_e- или -(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h- группы, где от одной до трех указанных -CH₂- групп необязательно могут быть замещены -C(O)NH- или -NHC(O)- группой;

e представляет собой целое число, выбранное из 1-20;

f представляет собой целое число, выбранное из 1-10;

g представляет собой целое число, выбранное из 1-15;

h представляет собой целое число, выбранное из 1-5;

X₁ представляет собой связь или -C(O)-;

Y₁ и Y₂ независимо представляют собой связь, -O-, -S-, -NH-, -C(O)-, -NHC(O)- или -C(O)NH- группу;

F представляет собой молекулу углевода, выбранную из галактозил-альфа-1,3-галактозил-бета-1,4-N-ацетилглюкозамина, альфа 1-3 галактобиозы, альфа 1-3-бета-1-4-галактотриозы или галилипентасахарида;

m представляет собой целое число, выбранное из 1-5; и

Sy представляет собой фенил, бифенил или трифенил, таким образом, что, когда Sy представляет собой бифенил или трифенил, указанная -Y₁-S₁-X₁-L группа может присутствовать на любом из указанных фенильных колец и указанная [F-S₂-Y₂]_m- группа или группы могут присутствовать на любом из указанных фенильных колец.

Краткое описание чертежей

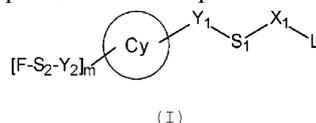
Фиг. 1: Вытеснение DPMB, связанного с LPS E. coli, показанное для 'PMB_std', 'PMB_nona' и примера 1. Интенсивность флуоресценции в процентах наносили на график как функцию концентрации испытываемого соединения. 100% интенсивность флуоресценции была определена для положительного контроля DPMB+LPS. 0% интенсивность флуоресценции была определена для отрицательного контроля DPMB+вода. Образцы анализировали в трех повторах для 'PMB_std'. Образцы анализировали в двух повторах для 'PMB_nona' и примера 1. "Усы" означают стандартное отклонение (SD).

Фиг. 2: Вытеснение DPMB, связанного с LPS E. coli или LPS P. aeruginosa. Интенсивность флуоресценции в процентах наносили на график как функцию концентрации испытываемого соединения. 100% интенсивность флуоресценции была определена для положительного контроля DPMB+LPS. 0% интенсивность флуоресценции была определена для отрицательного контроля DPMB+вода. Образцы анализировали в трех повторах для 'PMB_std' и 'PMB_int'. Образцы анализировали в двух повторах для 'PMB_nona' и примера 1. "Усы" означают стандартное отклонение (SD).

Фиг. 3: Результаты, полученные методом проточной цитометрии, для рекрутинга C3b из человеческой сыворотки к поверхности E.coli для примеров 4, 5, 6, 7 и 9.

Подробное описание изобретения

В соответствии с одним конкретным аспектом изобретения, который может быть указан, обеспечивается соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль:



где

L представляет собой полимиксин;

S₁ представляет собой связь или спейсер, выбранный из -(CH₂)_a- или -(CH₂)_b-(CH₂-CH₂-O)_c-(CH₂)_d- группы, где от одной до пяти указанных -CH₂- групп необязательно могут быть замещены -C(O)NH- или -NHC(O)- группой;

a представляет собой целое число, выбранное из 1-40;

b представляет собой целое число, выбранное из 0-25;

c представляет собой целое число, выбранное из 1-20;

d представляет собой целое число, выбранное из 1-15;

S₂ представляет собой спейсер, выбранный из -(CH₂)_e- или -(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h- группы, где от одной до трех указанных -CH₂- групп необязательно могут быть замещены -C(O)NH- или -NHC(O)- группой;

e представляет собой целое число, выбранное из 1-20;

f представляет собой целое число, выбранное из 1-10;

g представляет собой целое число, выбранное из 1-15;

h представляет собой целое число, выбранное из 1-5;

X₁ представляет собой связь или -C(O)-;

Y₁ и Y₂ независимо представляют собой связь, -O-, -S-, -NH-, -C(O)-, -NHC(O)- или -C(O)NH- группу;

F представляет собой молекулу углевода, выбранную из галактозил-альфа-1,3-галактозил-бета-1,4-N-ацетилглюкозамина, альфа-1-3 галактобиозы, альфа-1-3-бета-1-4-галактотриозы или галилипентасахарида;

m представляет собой целое число, выбранное из 1-5; и

Sy представляет собой фенил, бифенил или трифенил, таким образом, что, когда Sy представляет собой бифенил или трифенил, указанная -Y₁-S₁-X₁-L группа может присутствовать на любом из указанных фенильных колец и указанная [F-S₂-Y₂]_m- группа или группы могут присутствовать на любом из указанных фенильных колец.

Изобретение включает конъюгат катионного пептида (который специфически связывается с бактериями) и одного или нескольких звеньев молекулы углевода, способных связываться с человеческим анти-альфа-галактозил антителом (т.е. альфа-Gal трисахарид), связанных через линкер. Примером катионного пептида является полимиксин В (или полимиксин нонапептид, колистин или его производное). Это семейство катионных пептидов связывается с липидом А на поверхности бактериальных клеток и, будучи конъюгированными с альфа-gal линкерами, будут представлять альфа-Gal, приводя к рекрутингу анти-Gal антител и киллингу клеток. Уровни резистентности по-видимому должны быть низкими, поскольку липид А является важным в выживании грамотрицательных бактерий. На самом деле, даже полимиксин-резистентные штаммы сохраняют сайты связывания для катионных пептидов и как такового пептид-альфа-Gal конъюгата. Таким образом, изобретение может поддерживать эффективность даже против этих штаммов.

Очевидно, что новые инновационные терапии, которые работают через новые механизмы и на которые не действуют механизмы резистентности к антибиотикам, являются особенно привлекательными. Решение, предлагаемое настоящим изобретением, т.е. комбинация способности катионного пептида связываться с широким спектром бактерий с уникальной способностью специфически рекрутировать природные анти-Gal антитела к поверхности бактерий и перенаправлять эти антитела для промотирования активации комплемента, фагоцитоза и киллинга, является очень привлекательным. Изобретение имеет потенциал обеспечивать новую терапию бактериальных инфекций с широким спектром активности. Эффективность, не зависящая от механизмов резистентности к антибиотикам, обладает потенциалом эффективности против штаммов с множественной лекарственной резистентностью. Изобретение может работать как отдельное средство, а также с препаратами стандартного лечения для уменьшения дозы и продолжительности лечения.

В одном варианте осуществления S_1 представляет собой связь или спейсер, выбранный из $-(CH_2)_a-$, где одна или пять из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-C(O)NH-$ группой; или

$-(CH_2)_b-(CH_2-CH_2-O)_c-(CH_2)_d-$, где две из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-C(O)NH-$ группой.

В другом варианте осуществления S_1 представляет собой связь или спейсер, выбранный из $-(CH_2)_a-$, где одна из указанных $-CH_2-$ групп замещена $-C(O)NH-$ группой; или $-(CH_2)_b-(CH_2-CH_2-O)_c-(CH_2)_d-$.

Должно быть понятно, что a, b, c, d, e, f, g и h выбраны так, чтобы поддерживать подходящую длину линкера между группами F и L. Примеры подходящих длин линкера между F и L варьируются от около 5Å до около 50Å или больше в длину, от около 6Å до около 45Å, от около 7Å до около 40Å, от около 8Å до около 35Å, от около 9Å до около 30Å, от около 10Å до около 25Å, от около 11Å до около 20Å, от около 12Å до около 15Å. Таким образом, в одном варианте осуществления a, b, c, d, e, f, g и h представляют собой целое число в общей сложности не больше 30, например между 5 и 30, такое как между 7 и 29.

В другом варианте осуществления a представляет собой целое число, выбранное из 10-35.

В одном варианте осуществления b представляет собой целое число, выбранное из 0-24.

В одном варианте осуществления c представляет собой целое число, выбранное из 1-10.

В одном варианте осуществления d представляет собой целое число, выбранное из 1 или 2.

В одном варианте осуществления Y_1 представляет собой $C(O)NH-$ или $-C(O)-$. Еще в одном варианте осуществления Y_1 представляет собой $-C(O)NH-$.

В одном варианте осуществления S_2 представляет собой спейсер, выбранный из

$-(CH_2)_e-$, где одна или три из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-NHC(O)-$ группой; или $-(CH_2)_f-(CH_2-CH_2-O)_g-(CH_2)_h-$, где две из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-NHC(O)-$ группой.

В другом варианте осуществления S_2 представляет собой спейсер, выбранный из

$-(CH_2)_e-$, где три из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-NHC(O)-$ группой.

В одном варианте осуществления e представляет собой целое число, выбранное из 5-17.

В одном варианте осуществления f представляет собой целое число, выбранное из 2-6.

В одном варианте осуществления g представляет собой целое число, выбранное из 1-5. Еще в одном варианте осуществления g представляет собой целое число, выбранное из 1-4. Еще в одном варианте осуществления g представляет собой целое число, выбранное из 1-4.

В одном варианте осуществления h представляет собой целое число, выбранное из 1-4.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой $-C(O)-$.

В одном варианте осуществления Y_2 представляет собой $-O-$.

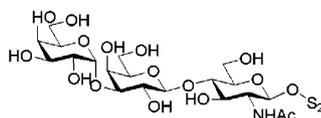
В одном варианте осуществления m представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3.

В одном варианте осуществления S_u представляет собой фенил или бифенил. Еще в одном варианте осуществления S_u представляет собой бифенил.

В настоящей заявке термин "молекул углевода, способная связываться с человеческим анти-альфа-галактозил антителом" включает группы сахара (т.е. углеводов), способные связываться с компонентом иммунного ответа (т.е. анти-альфа-галактозил антителом) указанного человека и, таким образом, вызы-

вать иммунный ответ у человека. Примеры таких молекул углеводов включают альфа-галактозилные соединения и их модифицированные производные. Другие примеры подходящих молекул углеводов включают альфа-gal эпитопы, указанные в US 2012/0003251 как подходящие для использования в селективном таргетировании и киллинге опухолевых клеток, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки. В одном варианте осуществления F выбран из галактозил-альфа-1,3-галактозил-бета-1,4-N-ацетилглюкозамина, альфа1-3 галактобиозы, альфа1-3-бета1-4-галактотриозы или галилипентасахарида.

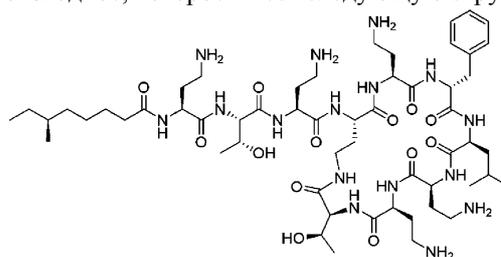
В одном конкретном варианте осуществления F имеет структуру, показанную в следующей формуле:



где S_2 обозначает точку присоединения к S_2 группе.

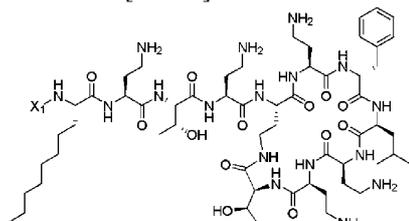
В настоящей заявке термин "связывающийся фрагмент" относится к любому подходящему фрагменту, который способен связываться с другим компонентом. Изобретение требует, чтобы связывающимся фрагментом был катионный антимикробный пептид, связанный с X_1 посредством амина.

В одном варианте осуществления L представляет собой полимиксин. Примеры подходящего полимиксина и его производных описаны в Velkov et al. (2016) Future Med Chem 8(10), 1017-1025, полимиксины и их производные включены в настоящую заявку посредством ссылки. В одном варианте осуществления полимиксин или его производное выбраны из Полимиксина В, Полимиксина В₂, Нонапептида Полимиксина, Колистина А, Колистина В, СВ-182, 204 (Cubist Pharmaceuticals), 5a (Pfizer), 5x (Pfizer), СА 14 (Cantab Anti-Infectives) CA824 (Cantab Anti-Infectives), NAB739 (Northern Antibiotics), NAB741 (Northern Antibiotics), NAB7061 (Northern Antibiotics), 38 (University of Queensland), FADDI-002 (Monash University), FADDI-100 (Monash University). Еще в одном варианте осуществления полимиксин представляет собой Полимиксин В или производное, которое имеет следующую структуру:

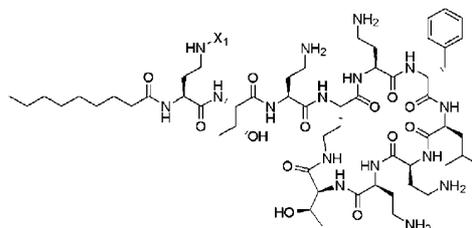


Еще в одном варианте осуществления производное Полимиксина В включает следующие структуры (где точка присоединения показана как X_1):

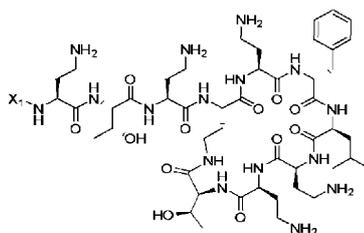
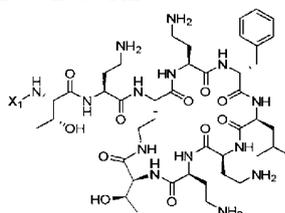
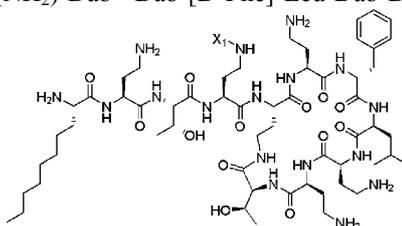
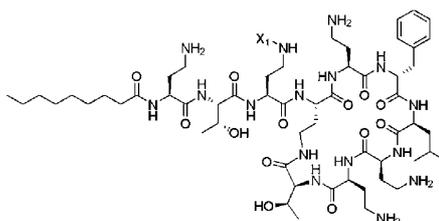
H_2N -[L-ОктилGly]-Dab-Thr-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*



Нонанамид-Dab (NH₂)-Thr-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*



H_2N -Dab-Thr-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*

H₂N-Thr-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*H₂N-[L-ОктилGly]-Dab-Thr-Dab(NH₂)-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*Нонанамид-Dab-Thr-Dab(NH₂)-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*H₂N-Thr-[D-Ser]-Pab*-Pab-[D-Phe]-Leu-Pab-Pab-Thr*

Должно быть понятно, что катионные антимикробные пептиды по настоящему изобретению должны быть сконфигурированы так, чтобы они связывались со специфическим патогеном или инфекционным агентом.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает соединение формулы (I), которое включает соединение примеров 1-25 или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает соединение формулы (I), которое включает соединение примеров 1-25 или его фармацевтически приемлемую соль.

Соединения формулы (I) могут существовать в форме солей, например, кислотно-аддитивных солей или, в некоторых случаях, солей органических и неорганических оснований, таких как карбоксилатные, сульфатные и фосфатные соли. Все такие соли охватываются объемом настоящего изобретения, и ссылки на соединения формулы (I) включают солевые формы соединений.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит щелочную группу, обычными химическими способами, такими как способы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Обычно такие соли можно получить путем взаимодействия основных форм этих соединений с соответствующим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе, или в смеси таких двух растворителей; обычно используют неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил.

Кислотно-аддитивные соли (моно- или ди-соли) могут быть образованы с широким спектром ки-

слот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотно-аддитивных солей включают моно-или ди-соли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+)камфорной, камфорсульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламиновой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогенводородными кислотами (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (\pm)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (\pm)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, пирувиновой, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также с ацилированными аминокислотами и катионообменными смолами.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных из уксусной, хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, метансульфоновой (мезилат), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, уксусной, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислот. Одна конкретная соль представляет собой гидрохлоридную соль. Другая конкретная соль представляет собой гидросульфатную соль, также известную как гемисульфатная соль.

Когда соединения формулы (I) содержат функциональную аминогруппу, они могут образовывать четвертичные аммониевые соли, например, путем взаимодействия с алкилирующим агентом в соответствии со способами, хорошо известными специалистам в данной области. Такие четвертичные аммониевые соединения входят в объем формулы (I).

Соединения по изобретению могут существовать в виде моно- или ди-солей в зависимости от рКа кислоты, из которой образуется соль.

Солевые формы соединений по изобретению, как правило, представляют собой фармацевтически приемлемые соли, и примеры фармацевтически приемлемых солей обсуждаются в Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts", J. Pharm. Sci., Vol. 66, стр. 1-19. Однако соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут быть получены в виде промежуточных форм, которые затем могут быть преобразованы в фармацевтически приемлемые соли. Такие формы солей, не являющиеся фармацевтически приемлемыми, которые могут быть полезны, например, при очистке или разделении соединений по изобретению, также составляют часть изобретения.

Соединения формулы (I) могут существовать в нескольких различных геометрических изомерных формах и таутомерных формах, и ссылки на соединения формулы (I) включают все такие формы. Во избежание сомнений, когда соединение может существовать в одной из нескольких геометрических изомерных или таутомерных формах, и только одна конкретно описана или показана, все другие, тем не менее, охватываются формулой (I).

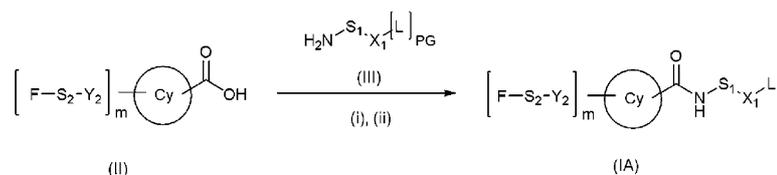
Способы получения соединений формулы (I)

В этом разделе, как и во всех других разделах настоящей заявки, если только из контекста явно не следует иное, ссылки на формулу (I) также включают все другие ее подгруппы и примеры, как определено в настоящей заявке.

Соединения, относящиеся к изобретению, описанному в настоящей заявке, можно получить постадийным способом синтеза, как проиллюстрировано на схемах ниже. Способы синтеза включают получение различных центральных конструкций (C_y), которые обеспечивают возможность выбора валентности для F и выбора пептида для L в молекуле. Соединения формулы (I) можно получить в соответствии со способами синтеза, хорошо известными специалистам в данной области. Например, специалистам в данной области должно быть понятно, что для успешного синтеза можно регулировать химические стадии и выбор защитных групп.

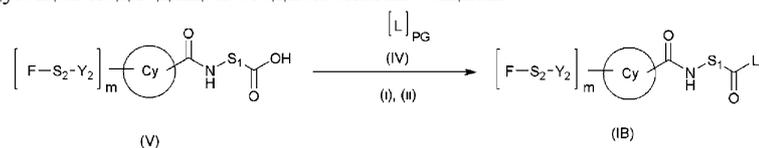
В соответствии с другим аспектом изобретения обеспечивается способ получения соединения формулы (I), определенного выше, который включает:

(а) получение соединения формулы (I), где Y₁ представляет собой -CONH- (т.е. соединения формулы (IA)) путем взаимодействия соединения формулы (II) с соединением формулы (III) с последующей подходящей стадией снятия защиты



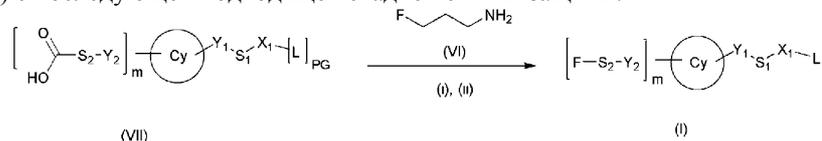
где S₂, Y₂, m, Cy, S₁, X₁, L и F имеют значения, определенные выше, и PG представляет собой подходящую пептид-защитную группу, такую как Dde; или

(b) получение соединения формулы (I), где Y₁ представляет собой -CONH- и X₁ представляет собой -C(O)- (т.е. соединения формулы (IB)), путем взаимодействия соединения формулы (IV) с соединением формулы (V) с последующей подходящей стадией снятия защиты



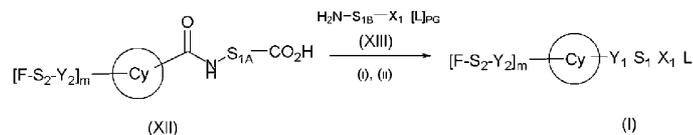
где S₂, Y₂, m, Cy, S₁, L и F имеют значения, определенные выше, и PG представляет собой подходящую пептид-защитную группу, такую как Dde; или

(c) получение соединения формулы (I) путем взаимодействия соединения формулы (VI) с соединением формулы (VII) с последующей подходящей стадией снятия защиты:



где S₂, Y₂, m, Cy, S₁, X₁, L и F имеют значения, определенные выше, PG представляет собой подходящую пептид-защитную группу, такую как Dde; или

(d) получение соединения формулы (I) путем взаимодействия соединения формулы (XII) с соединением формулы (XIII) с последующей подходящей стадией снятия защиты, где Y₁ представляет собой CONH группу



где S₂, Y₂, m, Cy, X₁, L и F имеют значения, определенные выше, S_{1A} и S_{1B} вместе образуют S₁ группу, и PG представляет собой подходящую пептид-защитную группу, такую как Dde; или

(e) взаимопреобразование соединения формулы (I) или его защищенного производного в другое соединение формулы (I) или его защищенное производное.

Стадия (i) в способах (a)-(d) типично включает реакцию образования амидной связи, которая типично включает активацию карбоновой кислоты либо фосфат-содержащими реагентами, реагентами на основе триазина, либо карбодимид-содержащими реагентами в присутствии органического основания в органическом растворителе. Предпочтительные условия включают HATU ((1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний 3-оксидегексафторфосфат) с диизопропилэтиламином в DMF.

Стадия (ii) в способах (a)-(d) типично включает любую подходящую реакцию удаления защитных групп, условия которой будут зависеть от природы защитной группы. Когда защитная группа включает Dde, в этом случае процедура удаления защиты типично включает использование гидразина в DMF. Когда защитная группа включает Cbz или бензил, в этом случае процедура удаления защиты типично включает гидрирование над подходящим катализатором, таким как палладий на углеводе. Когда защитная группа включает трет-бутоксикарбонил или трет-бутил, в этом случае удаление защиты будет кислотно-опосредованным и типично будет включать TFA в DCM.

Способ (e) типично включает процедуры взаимопреобразования, известные специалистам в данной области. Например, в соединениях формулы (I) первый заместитель можно преобразовать способами, известными специалистам в данной области, во второй, альтернативный заместитель. Множество различных взаимопреобразований хорошо известных функциональных групп известны специалистам в данной области для преобразования соединения-предшественника в соединение формулы (I), и они описаны в *Advanced Organic Chemistry*, Jerry March, 4th Edition, John Wiley & Sons, 1992. Например, возможные катализируемые металлом функционализации, например, с использованием оловоорганических реагентов (реакция Стилле), реагентов Гриньяра и реакций с азотными нуклеофилами описаны в *Palladium Reagents and Catalysts* [Jiro Tsuji, Wiley, ISBN 0-470-85032-9] и в *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis* [Volume 1, Edited by Ei-ichi Negishi, Wiley, ISBN 0-471-31506-0].

Если необходимо, до или после реакций, описанных выше в способах (a), (b), (c), (d) и (e), осуществ-

включают одну или несколько реакций, известных специалистам в данной области, и их осуществляют в соответствующем порядке для достижения необходимых замещений на S_2 , Y_2 , m , Cy , S_1 , X_1 , Y_1 , L и F , определенных выше, с получением других соединений формулы (I). Неограничивающие примеры таких реакций, условия которых можно найти в литературе, включают

защиту реакционноспособных функциональных групп,
удаление защиты реакционноспособных функциональных групп,
галогенирование,
дегалогенирование,
деалкилирование,
алкилирование и арилирование амина, анилина, спирта и фенола,
реакцию Мицунобу на гидроксильных группах,
реакции циклоприсоединения на соответствующих группах,
восстановление нитро, сложных эфиров, циано, альдегидов,
катализируемые переходными металлами реакции сочетания,
ацилирование,
сульфонилирование/введение сульфонильных групп,
омыление/гидролиз сложноэфирных групп,
амидирование или переэтерификацию сложноэфирных групп,
этерификацию или амидирование карбоксильных групп,
обмен галогенов,
нуклеофильное замещение амином, тиолом или спиртом,
восстановительное аминирование,
образование оксима на карбонильных и гидроксилминовых группах,
S-окисление,
N-окисление,
солеобразование.

Соединения формулы (II) можно получить в соответствии со способами, описанными на схеме 1, из соединений формулы (VIII) и (VI) в соответствии со способами стадии (i) и (ii), как описано выше.

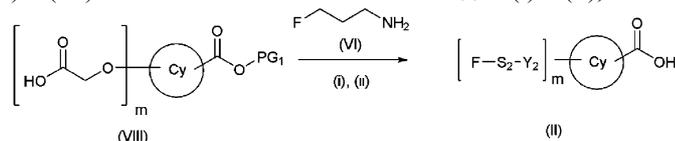


Схема 1

где m , Cy , Y_2 , S_2 и F имеют значения, определенные выше, и PG_1 представляет собой защитную группу, включающую бензил.

Кроме того, соединения формулы (V) можно получить из соединений формулы (II) в соответствии со стадиями способа (i) и (ii), описанными выше, с использованием подходящего выбранного линкера (S_1), включающего подходящую защитную группу, такую как бензил, который либо является коммерчески доступным, либо получен, как описано в литературе, специалистом в данной области.

Соединения формулы (VII) можно получить в соответствии со способами, описанными на схеме 2, из соединений формулы (III) и (IX) в соответствии со стадиями способа (i) и (ii), как описано выше.

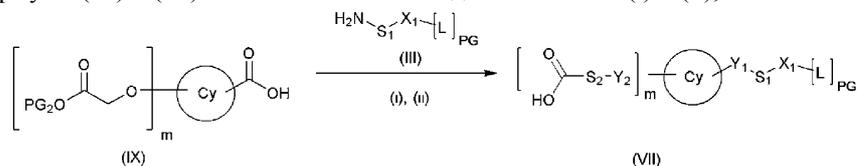


Схема 2

где m , Cy , Y_2 , S_1 , S_2 , X_1 и F имеют значения, определенные выше, Y_1 представляет собой $-CONH-$, PG_2 представляет собой защитную группу, включающую трет-бутил, и PG представляет собой подходящую пептид-защитную группу, такую как Dde.

Соединения формулы (VIII) можно получить в соответствии со способами, описанными на схеме 3, из соединений формулы (X) и (XI) в соответствии со стадиями способа (iii) и (ii), с использованием реакции алкилирования, а затем реакции удаления защитных групп, как описано выше, соответственно.

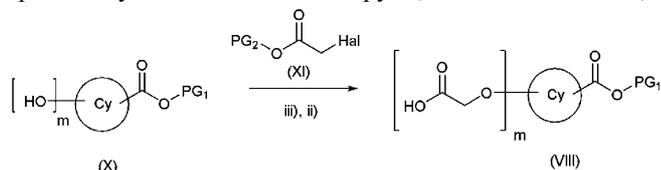


Схема 3

где m и S_u имеют значения, определенные выше, PG_2 представляет собой защитную группу, включающую трет-бутил, PG_1 представляет собой защитную группу, включающую бензил, и Hal представляет собой галогенид, такой как Cl , Bg или I .

Стадия (iii) типично включает условия алкилирования с соединениями формулы (XI) в неорганическом основании в полярном органическом растворителе при комнатной температуре.

Предпочтительные условия включают карбонат калия в DMF.

Подобным образом, соединения формулы (IX) также можно получить в соответствии со схемой 3, где можно использовать альтернативные условия снятия защиты. После стадии алкилирования, где PG_1 представляет собой бензил, PG_1 можно удалить предпочтительно в условиях гидрирования, описанных выше.

Когда S_u представляет собой бифенил, соединения формулы (X) можно получить с использованием реакции Сузуки для образования бифенильного звена. Предпочтительные условия включают тетракистрифенилфосфинпалладий (0) с карбонатом натрия в диоксане и воде при $100^\circ C$. Когда используют подходящие требуемые защитные группы, такие как TBS, такие защитные группы можно удалить с использованием фторид-опосредованной реакции снятия защиты. Предпочтительные условия включают TBAF в THF при комнатной температуре.

Соединения формулы (XII) и (XIII), где S_1 содержит S_{1A} или S_{1B} , можно получить в соответствии со схемой 1 в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, или в соответствии со способами, описанными в литературе.

Соединения формулы (III), (IV), (VI) и (XI) либо являются коммерчески доступными, либо могут быть получены в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке, или получены в соответствии с описанными в литературе способами.

Фармацевтические композиции

Хотя соединение формулы (I) можно вводить отдельно, предпочтительно, чтобы оно было представлено в виде фармацевтической композиции (например, препарата).

Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом, изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию и способы получения фармацевтической композиции, включающие (например, смешивание) по меньшей мере одно соединение по изобретению, где L представляет собой катионный антимикробный пептид, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами и необязательно другими терапевтическими или профилактическими средствами, описанными в настоящей заявке.

Фармацевтически приемлемый эксципиент(эксципиенты) может быть выбран, например, из носителей (например, твердого, жидкого или полутвердого носителя), адъювантов, разбавителей, наполнителей или объемообразующих агентов, гранулирующих агентов, покрывающих агентов, агентов, контролирующего высвобождение, связующих, разрыхлителей, смазывающих веществ, консервантов, антиоксидантов, буферных агентов, суспендирующих агентов, загустителей, отдушек, подсластителей, маскирующих вкус веществ, стабилизаторов или любых других эксципиентов, обычно используемых в фармацевтических композициях. Примеры эксципиентов для различных типов фармацевтических композиций описаны более подробно ниже.

Термин "фармацевтически приемлемый" в контексте настоящей заявки относится к соединениям, веществам, композициям и/или лекарственным формам, которые, в соответствии со взвешенной медицинской оценкой, являются подходящими для использования в контакте с тканями субъекта (например, человека) без чрезмерной токсичности (т.е. общепризнаны как безопасные (GRAS)), раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерно с разумным соотношением польза/риск. Каждый носитель, эксципиент и т.д. также должны быть "приемлемыми" в том смысле, что они должны быть совместимы с другими ингредиентами композиции.

Фармацевтические композиции, содержащие соединения по изобретению, могут быть сформулированы в соответствии с известными методами, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA.

Фармацевтические композиции могут быть в любой форме, подходящей для парентерального, интраназального, интрабронхиального, сублингвального, внутриглазного, внутримышечного, ректального, интравагинального или чрескожного введения. Когда композиции предназначены для парентерального введения, они могут быть сформулированы для внутривенного, внутримышечного, интраперитонеального, подкожного введения или для прямой доставки в являющийся мишенью орган или ткань путем инъекции, инфузии или других способов доставки. Доставку можно осуществлять посредством болюсной инъекции, кратковременной инфузии или более длительной инфузии, и ее можно осуществлять в виде пассивной доставки или с использованием подходящего инфузионного насоса или шприцевого инфузионного насоса.

Фармацевтические композиции, адаптированные для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, соразтворители, поверхностно-активные вещества, смеси органических растворителей, циклодекстриновые комплексообразующие агенты, эмульгаторы (для образования и стабилизации эмульси-

онных составов), липосомные компоненты для образования липосом, гелеобразующие полимеры для образования полимерных гелей, защитные средства для лиофилизации и комбинации веществ для, среди прочего, стабилизации активного ингредиента в растворимой форме и придания композиции изотоничности с кровью предполагаемого реципиента.

Фармацевтические композиции для парентерального введения могут также принимать форму водных и неводных стерильных суспензий, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители (R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, *Pharmaceutical Research*, Vol. 21(2) 2004, p. 201-230).

Композиции могут быть представлены в однодозовых и многодозовых контейнерах, например, в герметичных ампулах, флаконах и предварительно заполненных шприцах, и могут храниться в высушенных замораживанием (лиофилизированных) формах, требующих только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед использованием.

Фармацевтическую композицию можно получить лиофилизацией соединения по изобретению. Лиофилизация относится к процедуре сушки замораживанием композиции. Поэтому сушка замораживанием и лиофилизация используются в настоящей заявке как синонимы.

Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии можно получить из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению для парентеральной инъекции также могут включать фармацевтически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, а также стерильные порошки для восстановления в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед применением.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или наполнителей включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), карбоксиметилцеллюлозу и ее подходящие смеси, растительные масла (такие как подсолнечное масло, сафлоровое масло, кукурузное масло или оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем использования загустителей или покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Композиции по настоящему изобретению могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечить путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательно включить агенты для регулирования тоничности, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может достигаться путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для внутривенного (в/в) введения, например, путем инъекции или инфузии. Для внутривенного или подкожного введения раствор можно вводить как есть, или его можно ввести в инфузионный пакет (содержащий фармацевтически приемлемый наполнитель, такой как 0,9% физиологический раствор или 5% раствор декстрозы) перед введением.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для подкожного (п/к) введения.

Соединение по изобретению можно сформулировать с носителем и вводить в форме наночастиц, при этом увеличенная площадь поверхности наночастиц способствует их абсорбции. Кроме того, наночастицы обеспечивают возможность непосредственного

проникновения в клетку. Системы на основе наночастиц для доставки лекарственных средств описаны в "Nanoparticle Technology for Drug Delivery", под редакцией Ram B Gupta, и в Uday B. Kompella, Informa Healthcare, ISBN 9781574448573, опубликованном 13^{го} марта 2006 г. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны в *J. Control. Release*, 2003, 91 (1-2), 167-172, и в Sinha et al., *Mol. Cancer Ther.* 1 августа (2006) 5, 1909.

Фармацевтические композиции типично включают от приблизительно 1% (мас./мас.) до приблизительно 95% (мас./мас.) активного ингредиента и от 99% (мас./мас.) до 5% (мас./мас.) фармацевтически приемлемого эксципиента или комбинации эксципиентов. Предпочтительно композиции включают от приблизительно 20% (мас./мас.) до приблизительно 90% (мас./мас.) активного ингредиента и от 80% (мас./мас.) до 10% фармацевтически приемлемого эксципиента или комбинации эксципиентов. Фармацевтические композиции включают от приблизительно 1 до приблизительно 95%, предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 90%, активного ингредиента. Фармацевтические композиции по изобретению могут быть, например, в стандартной лекарственной форме, такой как ампулы, флаконы, суспензии, предварительно заполненные шприцы, драже, таблетки или капсулы.

Фармацевтически приемлемый эксципиент(эксципиенты) может быть выбран в соответствии с желаемой физической формой препарата и может, например, быть выбран из разбавителей (например, твердых разбавителей, таких как наполнители или объемобразующие агенты; и жидких разбавителей,

таких как растворители и соразтворители), разрыхлителей, буферных агентов, смазывающих веществ, агентов, улучшающих текучесть, агентов, контролирующих высвобождение (например, замедляющих или задерживающих высвобождение полимеров или восков), связующих, гранулирующих агентов, пигментов, пластификаторов, антиоксидантов, консервантов, отдушек, агентов, маскирующих вкус, агентов, регулирующих тоничность, и покрывающих агентов.

Специалист в данной области должен уметь выбирать подходящие количества ингредиентов для использования в композициях. Например, таблетки и капсулы обычно содержат 0-20% разрыхлителей, 0-5% смазывающих веществ, 0-5% добавок, регулирующих текучесть и/или 0-99% (мас./мас.) наполнителей/или объемобразующих агентов (в зависимости от дозы лекарственного средства). Они также могут содержать 0-10% (мас./мас.) полимерных связующих, 0-5% (мас./мас.) антиоксидантов, 0-5% (мас./мас.) пигментов. Таблетки с медленным высвобождением дополнительно могут содержать 0-99% (мас./мас.) контролирующих (например, задерживающих) высвобождение полимеров (в зависимости от дозы). Пленочные покрытия таблетки или капсулы обычно содержат 0-10% (мас./мас.) полимеров, 0-3% (мас./мас.) пигментов и/или 0-2% (мас./мас.) пластификаторов.

Парентеральные или подкожные композиции обычно содержат 0-20% (мас./мас.) буферов, 0-50% (мас./мас.) соразтворителей и/или 0-99% (мас./мас.) воды для инъекций (WFI) (в зависимости от дозы и использования лиофилизации). Композиции внутримышечных депо-препаратов могут также содержать 0-99% (мас./мас.) масел.

Соединения по изобретению также могут быть сформулированы в виде твердых дисперсий. Твердые дисперсии представляют собой гомогенные чрезвычайно тонкодисперсные фазы двух или более твердых веществ. Твердые растворы (молекулярно-дисперсные системы), один тип твердой дисперсии, хорошо известны для использования в технологии получения фармацевтических композиций (см. (Chiou and Riegelman, J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971)) и полезны для увеличения скорости растворения и повышения биодоступности плохо растворимых в воде лекарственных средств.

Фармацевтические композиции могут предоставляться пациентам в "упаковках для пациентов", содержащих полный курс лечения в одной упаковке, обычно в блистерной упаковке. Упаковки для пациентов имеют преимущество по сравнению с традиционными отпускаемыми по рецепту средствами, когда фармацевт выделяет предназначенное для пациента количество препарата из нерасфасованного препарата, состоящее в том, что у пациента всегда есть доступ к вкладышу, содержащемуся в упаковке для пациента, который обычно отсутствует в препаратах, отпускаемых пациентам по рецепту. Было показано, что включение вкладыша в упаковку улучшает соблюдение пациентом инструкций врача. Один пример упаковки для пациента включает предварительно заполненный шприц. Такие предварительно заполненные шприцы уже содержат лекарственное вещество. Передняя концевая часть предварительно заполненного шприца, к которой должна присоединиться игла, закрыта колпачком. Перед инъекцией колпачок снимают с передней концевой части и прикрепляют к ней иглу. Затем прокладка скользит, толкая поршневым стержнем к передней концевой части, выводя таким образом лекарственное средство.

Композиции для назальной доставки включают мази, кремы, спреи, пластыри, гели, жидкие капли и вкладыши (например, глазные вкладыши). Такие композиции могут быть сформулированы в соответствии с известными способами.

Примеры композиций для ректального или интравагинального введения включают pessaries и суппозитории, которые могут быть, например, образованы из сформованного или воскообразного вещества, содержащего активное соединение. Растворы активного соединения также можно использовать для ректального введения.

Композиции для введения путем ингаляции могут принимать форму вдыхаемых порошковых композиций или жидких или порошковых спреев, и их можно вводить в стандартной форме с использованием порошковых ингаляторов или аэрозольных распылителей. Такие устройства хорошо известны. Для введения путем ингаляции порошкообразные композиции обычно включают активное соединение вместе с инертным твердым порошкообразным разбавителем, таким как лактоза.

Соединение по изобретению в основном будет представлено в стандартной лекарственной форме и, как таковое, будет обычно содержать достаточное количество соединения для обеспечения желаемого уровня биологической активности. Например, композиция может содержать от 1 нг до 2 г активного ингредиента, например от 1 нг до 2 мг активного ингредиента. В этих диапазонах конкретные поддиапазоны соединения составляют от 0,1 мг до 2 г активного ингредиента (более типично от 10 мг до 1 г, например от 50 до 500 мг) или от 1 мкг до 20 мг (например, от 1 мкг до 10 мг, например, от 0,1 до 2 мг активного ингредиента).

Активное соединение можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом (например, человеку или животному), в количестве, достаточном для достижения желаемого терапевтического эффекта.

Терапевтические применения

В соответствии с еще одним аспектом изобретения обеспечивается соединение формулы (I), определенное в настоящей заявке, для применения в терапии.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения обеспечивается соединение формулы (I), определенное в настоящей заявке, для применения в лечении заболевания или расстройства, опосредованного

и/или вызванного инфекционным агентом.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения обеспечивается применение соединения формулы (I), определенного в настоящей заявке, для получения лекарственного средства для применения в лечении заболевания или расстройства, опосредованного и/или вызванного инфекционным агентом.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения обеспечивается способ лечения заболевания или расстройства, опосредованного и/или вызванного инфекционным агентом, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения формулы (I), определенного в настоящей заявке.

Примеры инфекционных агентов включают любой патоген, такой как бактерии, грибок, паразит или вирус. Таким образом, в одном варианте осуществления заболевание или расстройство, опосредованное и/или вызванное инфекционным агентом, представляет собой бактериальную инфекцию.

Примеры такой бактериальной инфекции включают инфекционные заболевания, вызываемые следующими бактериями: *Staphylococcus* sp., такой как *Staphylococcus aureus* (включая метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA)), *Clostridium* sp (например, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani* и *Clostridium botulinum*), вид *Enterobacter*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella* sp., такой как *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter* sp., такой как *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus* sp., такой как *Enterococcus faecalis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Bordetella pertussis*, стрептококки, *Salmonella thyphimurim*, *Salmonella enterica*, вид *Chlamydia*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Borrelia burgdorferi*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Helicobacter pylori*, грамотрицательные патогены, такие как *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* (и включая штаммы, которые резистентны к одному или нескольким классам антибиотиков, особенно штаммы с множественной лекарственной резистентностью (MDR)).

Соединение по изобретению обычно вводят субъекту, нуждающемуся в таком введении, например пациенту, такому как человек или животное, предпочтительно человеку.

Соединение по изобретению обычно вводят в количествах, которые являются терапевтически или профилактически полезными и которые обычно нетоксичны. Однако в некоторых ситуациях (например, в случае угрожающих жизни заболеваний) преимущества введения соединения по изобретению могут перевешивать недостатки, связанные с любыми токсическими эффектами или побочными эффектами, и в этом случае может считаться желательным введение соединения по изобретению в количествах, которые ассоциированы с определенной степенью токсичности.

Соединение по изобретению можно вводить в течение длительного периода времени (т.е. хроническое введение) для поддержания полезных терапевтических эффектов или можно вводить только в течение короткого периода времени (т.е. неотложное введение). Альтернативно, соединения можно вводить непрерывным способом или способом, который обеспечивает прерывистую дозировку (например, пульсирующим образом).

Типичная суточная доза соединения по изобретению может находиться в диапазоне от 100 пг до 100 мг на килограмм массы тела, более типично от 5 нг до 25 мг на килограмм массы тела и более типично от 10 нг до 15 мг на килограмм (например, от 10 нг до 10 мг и, более типично от 1 микрограмма на килограмм до 20 миллиграммов на килограмм, например, от 1 микрограмма до 10 миллиграммов на килограмм) на килограмм массы тела, хотя при необходимости можно вводить более высокие или более низкие дозы. Соединение по изобретению можно вводить, например, ежедневно или повторяющимся образом, например, через каждые 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 10, или 14, или 21, или 28 дней. Альтернативно, соединение по изобретению можно вводить путем инфузии несколько раз в день.

Соединение по изобретению можно вводить в диапазоне доз, например от 1 до 1500 мг, от 2 до 800 мг или от 5 до 500 мг, например от 2 до 200 мг или от 10 до 1000 мг, при этом конкретные примеры доз включают 10, 20, 50 и 80 мг. Соединение по изобретению можно вводить один или несколько раз в день. Соединение по изобретению можно вводить непрерывно (т.е. принимать каждый день без перерыва в течение всего курса лечения). Альтернативно, соединение по изобретению можно вводить периодически (т.е. принимать непрерывно в течение определенного периода, такого как неделя, затем прервать прием, например на неделю, и затем непрерывно принимать еще в течение некоторого периода, такого как неделя, и так далее в течение всего курса лечения). Примеры схем лечения, включающих прерывистое введение, включают схемы, в которых введение осуществляют циклами одна неделя введения, одна неделя перерыв; или две недели введения, одна неделя перерыв; или три недели введения, одна неделя перерыв; или две недели введения, две недели перерыв; или четыре недели введения, две недели перерыв; или одна неделя введения, три недели перерыв - в течение одного или нескольких циклов, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более циклов.

В одной конкретной схеме введения пациенту будут вводить инфузию соединения по изобретению в течение периодов от одного часа в день до десяти дней, в частности до пяти дней в течение одной недели, и лечение будет повторяться с желаемым интервалом, таким как две-четыре недели, в частности через каждые три недели.

Более конкретно, пациенту можно вводить инфузию соединения по изобретению в течение одного часа в день в течение 5 дней, и лечение повторяют через каждые три недели.

В другой конкретной схеме введения пациенту вводят инфузию в течение от 30 мин до 1 ч с после-

дующими поддерживающими инфузиями переменной продолжительности, такими как от 1 до 5 ч, например 3 ч.

Еще в одной конкретной схеме введения пациенту вводят непрерывную инфузию в течение периода от 12 ч до 5 дней и, в частности, непрерывную инфузию от 24 до 72 ч.

В конечном счете, однако, количество вводимого соединения по изобретению и тип используемой композиции должны быть соразмерны природе заболевания или физиологического состояния, подлежащего лечению, и будут определяться лечащим врачом.

Должно быть понятно, что соединение по изобретению можно использовать в качестве отдельного средства или в комбинации с другими терапевтическими средствами. Эксперименты с комбинированием можно осуществить, например, как описано в Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regulat* 1984; 22: 27-55.

Когда соединение по изобретению вводят в виде комбинированной терапии с одним, двумя, тремя, четырьмя или более другими терапевтическими средствами (предпочтительно с одним или двумя, более предпочтительно с одним), средства можно вводить одновременно или последовательно. В последнем случае два или более средств можно вводить в течение периода времени и в количестве и способом, которые достаточны для обеспечения достижения полезного или синергического эффекта. При последовательном введении их можно вводить с небольшим интервалом (например, в течение 5-10 мин) или с более длительными интервалами (например, с интервалом в 1, 2, 3, 4 или более часов, или даже с более длительными интервалами между их введениями, когда это необходимо), при этом конкретная схема введения должна соответствовать свойствам терапевтического средства(средств). Эти дозы можно вводить, например, один, два или более раз за курс лечения, который может повторяться, например, через каждые 7, 14, 21 или 28 дней.

Понятно, что предпочтительный способ и порядок введения и соответствующие дозы и схемы введения для каждого компонента комбинации будут зависеть от другого конкретного лекарственного средства и соединения по изобретению, которое вводят, пути их введения, конкретной опухоли, подлежащей лечению, и конкретного хозяина, которого лечат. Оптимальный способ и порядок введения, а также дозы и схему введения легко смогут определить специалисты в данной области с использованием обычных способов и с учетом информации, представленной в настоящей заявке.

Массовое соотношение соединения по изобретению и одного или нескольких других терапевтических средств в случае их введения в комбинации сможет определить специалист в данной области. Указанное соотношение, точная дозировка и частота введения зависят от конкретного соединения по изобретению и другого используемого терапевтического средства(средств), конкретного состояния, которое лечат, тяжести состояния, которое лечат, возраста, массы тела, пола, режима питания, времени введения и общего физического состояния конкретного пациента, способа введения, а также других лекарственных средств, которые субъект может принимать, как хорошо известно специалистам в данной области. Кроме того, очевидно, что эффективное суточное количество может быть уменьшено или увеличено в зависимости от ответа субъекта, которого лечат, и/или в зависимости от оценки лечащего врача, назначающего соединение по изобретению. Конкретное массовое соотношение для соединения по изобретению и другого терапевтического средства может составлять от 1/10 до 10/1, более конкретно, от 1/5 до 5/1, еще более конкретно, от 1/3 до 3/1.

Примеры

Изобретение далее проиллюстрировано, но не ограничивается этим, со ссылкой на конкретные варианты осуществления, описанные в следующих примерах. Соединения названы с использованием пакета для автоматического наименования (ChemDraw) или названы поставщиком химических веществ.

Следующие процедуры синтеза представлены для иллюстрации используемых способов; для конкретного получения или стадии используемый предшественник необязательно может быть получен из конкретной синтезированной партии в соответствии со стадией в представленном описании.

Аналитические методы

Когда в примерах и получениях указаны аналитические данные, использовали следующие аналитические методы, если не указано иное:

ЖХМС

Система: LCMS Agilent 1100 (насос для четырехкомпонентных смесей); масс-спектрометр: Waters Micromass ZQ

Колонка: XBridge C18 4,6×50 мм, 5 мкм.

Растворитель: А=вода; В=ацетонитрил, С=10 мМ формиата аммония в воде; D=0,05% муравьиной кислоты в ацетонитриле

Температура колонки: 25°C, объем вводимой пробы: 5 мкл

ЖХМС Метод А: 4,5 мин анализ в кислотных условиях

Время (мин)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Скорость потока (мл/мин)
0	95	0	0	5	2,0
3,5	0	95	0	5	2,0
4,5	0	95	0	5	2,0
4,6	95	0	0	5	2,0

ЖХМС Метод В: 4,5 мин анализ в забуференной среде

Время (мин)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Скорость потока (мл/мин)
0	0	5	95	0	2,0
3,5	0	95	5	0	2,0
4,5	0	95	5	0	2,0
4,6	0	5	95	0	2,0

ЯМР

ЯМР данные получали на Oxford Instruments AS400.

MS

Когда представляют MS данные, для высокомолекулярных соединений обычно указывается отношение массы к заряду (m/z).

Аббревиатуры

Следующие аббревиатуры имеют указанные ниже значения:

Ahx означает аминоксид;

Alloc означает аллилоксикарбонил;

водн. означает водный;

Woc означает трет-бутилоксикарбонил;

шир.с означает широкий синглет;

CDCl₃ означает дейтерохлороформ;

ТСС смола означает хлортритилхлоридную смолу;

д означает дублет;

Dab означает 2,4-диаминомасляную кислоту;

DCM означает дихлорметан;

Dde означает (1,(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-этил);

DIPEA означает диизопропилэтиламин;

DMF означает диметилформамид;

DMSO означает диметилсульфоксид;

d₆-DMSO означает дейтерированный DMSO;

ES означает метод ионизации электрораспылением;

EtOAc означает этилацетат;

Fmoc означает 9-флуоренилметоксикарбонил;

г означает грамм;

Gly означает глицин;

HATU означает O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий гексафторфосфат;

HBTU означает O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий гексафторфосфат;

HCl означает хлористоводородную кислоту;

HOBT означает гидроксibenзотриазол;

ВЭЖХ означает высоко-эффективную жидкостную хроматографию;

KHCO₃ означает гидрокарбонат калия;

л означает литр;

ЖХМС означает жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию;

Leu означает лейцин;

м означает мультиплет;

мг означает миллиграмм;

М означает молярный;

MeCN означает ацетонитрил;

MeOH означает метанол;

MgSO₄ означает сульфат магния;

МГц означает мегаГерц;

мл означает миллилитр;

ммоль означает миллимоль;

MS означает масс-спектрометрию;

NaHCO₃ означает гидрокарбонат натрия;

NaOH означает гидроксид натрия;

NH₃ означает аммиак;

ЯМР означает ядерный магнитный резонанс;

Pd/C означает палладий на углероде;

Pd(PPh₃)₄ означает тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0);

Pd(PPh₃)₂Cl₂ означает палладий(II)бис(трифенилфосфин)

дихлорид

Phe означает фенилаланин;

PhSiH₃ означает фенилсилан;

ф/дюйм² означает фунты на квадратный дюйм;

Rt означает время удерживания;

с означает синглет;

т означает триплет;

TBTU означает O-(бензотриазол-1-ил)-N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат;

TEA означает триэтиламин;

Thr означает треонин;

TIS означает триизопропилсилан;

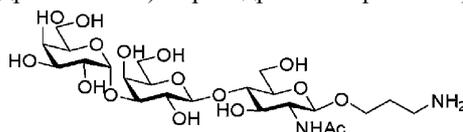
TFA означает трифторуксусную кислоту;

мкл означает микролитр и

об. означает объем.

Когда указано альфа-Gal, это применимо к следующему промежуточному соединению:

3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)пропил)амин



Это промежуточное соединение можно получить в соответствии со способами, описанными Bovin et al. (Mendeleev Communications (2002), (4), 143-145).

Синтез пептидных промежуточных соединений

РМВ каркасы конструировали в соответствии со стандартным твердофазным пептидным синтезом (SPPS) с использованием подходящим образом защищенных аминокислот и СТС смолы. В качестве подходящей исходной точки выбирали либо Fmoc-Dab (Dde) -СТС смолу, либо Fmoc-Thr(OtBu)-СТС смолу, либо Fmoc-Leu-СТС смолу, и каркасы подвергали циклизации в определенный момент в ходе синтеза. Все защищенные аминокислоты и исходные вещества для линкера являются коммерчески доступными или получены в соответствии со ссылочными документами, указанными в настоящей заявке.

С использованием SPPS применяли три альтернативные стратегии получения полимиксинового каркаса:

Способ 1: где полимиксиновый каркас синтезируют без линкера

Способ 2: где полимиксиновый каркас синтезируют с добавлением линкера в фазе раствора после отщепления от смолы

Способ 3: где полимиксиновый каркас синтезируют с добавлением линкера в качестве дополнительной стадии на смоле

Защищенные аминокислоты выбирали из: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-[D-Phe]-OH, Fmoc-Dab(Dde)-OH, Fmoc-Dab(Alloc)-OH, Fmoc-Thr-(OtBu)-OH, Fmoc-[D-Ser(OtBu)]-OH и Boc-Dab(Dde)-OH.

Исходные материалы линкеров выбирали из Boc-PEG₈-OH, Boc-Ahx-Ahx-OH (WO 2008123844), Boc-[L-ОктилGly]-OH, Fmoc-[L-ОктилGly]-OH или их комбинаций.

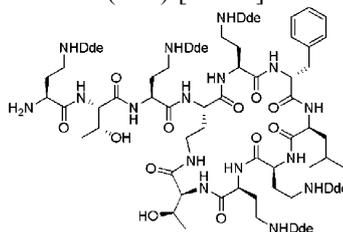
Кроме того, некоторые пептидные каркасы заканчивались нонановой кислотой.

Пептидные каркасы анализировали с использованием ВЭЖХ:

Agilent 1260 ЖХМС: Agilent 1200+6410 MS.

Получение 1.

H_2N -Dab(Dde)-Thr(OH)-Dab(Dde)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*



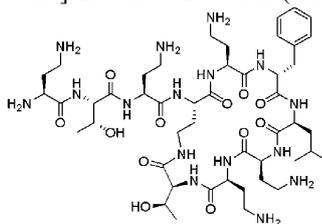
Способ 1.

Пептидную цепь удлиняли на CTC смоле, начиная с Fmoc-Leu-OH [к CTC смоле (1 ммоль, 1 г, 1,0 ммоль/г) и Fmoc-Leu-OH (0,353 г, 1,0 ммоль, 1,0 экв.) в DCM (10,00 мл) добавляли DIPEA (4,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Добавляли MeOH (1,0 мл) и реакционный сосуд закрывали пробкой и перемешивали в течение 30 мин]. Для деблокирования использовали 20% раствор пиперидина в DMF и желаемую аминокислотную последовательность конструировали с использованием HBTU и DIPEA в DMF для всех остатков за исключением Fmoc-Dab(Alloc)-OH, который связывали с использованием HATU и DIPEA в DMF с получением Boc-Dab(Dde)-Thr(OtBu)-Dab(Dde)-Dab(Alloc)-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-O-CTC-смолы. В этой точке смолу обрабатывали при помощи Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,1 экв.) и PhSiH₃ (10 экв.) в DCM с последующей промывкой смолы при помощи DMF и MeOH для удаления защитной группы alloc. Пептид затем далее удлиняли, как описано выше, остальными необходимыми аминокислотами. Пептид отщепляли от смолы с использованием 1% раствора TFA в DCM в течение 2 минут и доводили до pH=7 при помощи DIPEA в DCM. Затем добавляли TBTU (2 экв.) и HOBT (2 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч для осуществления циклизации. Реакционную смесь промывали 5% водным раствором HCl и концентрировали в вакууме с получением Boc-Dab(Dde)-Thr(OtBu)-Dab(Dde)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OtBu)*. Неочищенный пептид обрабатывали TFA/водой (95% TFA, 5% воды, 20 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь обрабатывали холодным изопропиловым эфиром и центрифугировали три раза. Остаток сушили в вакууме и очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии (ВЭЖХ: подвижная фаза: А: 0,1% TFA в H₂O, В: 0,1% TFA в MeCN; Поток: 1,0 мл/мин T=50°C; Колонка: YMC-Pack ODS-A 150×4,6 мм, 5 мкм; Устройство: Agilent 1200 ВЭЖХ (5-521) с последующей лиофилизацией с получением указанного в заголовке соединения (80 мг).

Это промежуточное соединение использовали непосредственно на следующей стадии.

Получение 2.

H_2N -Dab-Thr(OH)-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr(OH)*

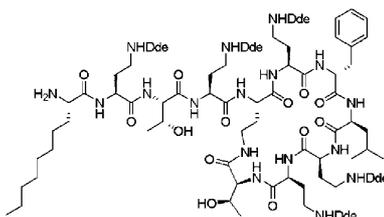


После удаления всех Dde защитных групп из получения 1 (3% гидразин/MeOH) были получены следующие данные:

Rt=14,23 мин, ES⁺ MS m/z 1063,4 [M+1] и 532,2 [M+2]/2; теоретическая масса: 1062,6.

Получение 3.

H_2N -L-октилGly-Dab(Dde)-Thr(OH)-Dab(Dde)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*



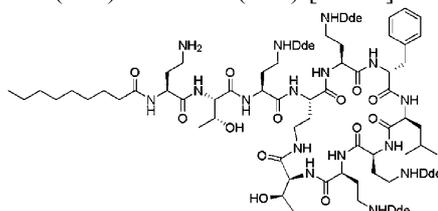
Указанное в заголовке соединение можно получить в соответствии со способом 1 с использованием либо Fmoc-Dab(Dde)-CTC смолы, либо Fmoc-Leu-CTC смолы в качестве исходной точки вместе с Boc-

[L-октилGly]-ОН.

Промежуточное соединение использовали непосредственно на следующей стадии.

Получение 4.

Нонанамид-Dab(NH₂)-Thr(OH)-Dab(Dde)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*

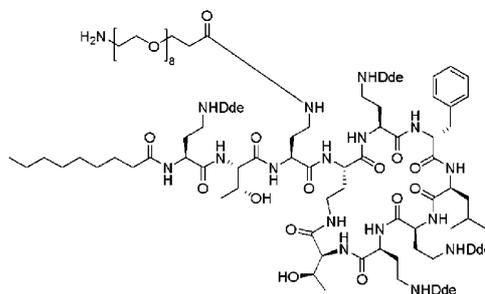


Указанное в заголовке соединение получали в соответствии со способом 1 с использованием Fmoc-Dab(Dde)-CTC смолы или Fmoc-Leu-CTC смолы в качестве исходной точки вместе с нонановой кислотой.

Промежуточное соединение использовали непосредственно на следующей стадии.

Получение 5.

Нонанамид-Dab(Dde)-Thr(OH)-Dab(PEG₈NH₂)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*



Способ 2.

Пептидную цепь удлиняли на CTC смоле, начиная с Fmoc-Thr(OtBu)-ОН [к CTC смоле (0,5 ммоль, 0,5 г, 1,0 ммоль/г) и Fmoc-Thr(OtBu)-ОН (200 мг, 0,5 ммоль, 1,0 экв.) в DCM (5,0 мл) добавляли DIPEA (4,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Добавляли MeOH (0,5 мл) и реакционный сосуд закрывали пробкой и перемешивали в течение 30 мин]. Для деблокирования использовали 20% раствор пиперидина в DMF и желаемую аминокислотную последовательность конструировали с использованием NATU (2,85 экв.) и DIPEA (6,0 экв.) в DMF (2,0 мл) с получением нонанамид-Dab(Dde)-Thr(OtBu)-Dab(Boc)-Dab(Alloc)-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-O-CTC-смолы. В этой точке смолу обрабатывали при помощи Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,1 экв.) и PhSiH₃ (10 экв.) в DCM с последующей промывкой смолы при помощи DMF и MeOH для удаления защитной группы alloc и сушили в атмосфере азота в течение ночи. Пептид далее удлиняли, как описано выше, остальными необходимыми аминокислотами. Пептид отщепляли от смолы при помощи 1%TFA/DCM (2×5 мл) в течение 2 мин и доводили до pH=7 при помощи DIPEA в DCM. Добавляли TBUTU (2 экв.) и HOBT (2 экв.) с последующим добавлением DIPEA (2 экв.) и смесь перемешивали в течение 1 ч для осуществления циклизации. Реакционную смесь промывали 5% водным раствором HCl и концентрировали в вакууме с получением нонанамид-Dab(Dde)-Thr(OH)-Dab(Boc)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*.

Неочищенный пептид обрабатывали при помощи 95%TFA/2,5%H₂O/2,5%TIS (5 мл) при комнатной температуре и перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь осаждали холодным изопропиловым эфиром (50 мл) и центрифугировали (3 мин при 3000 об/мин). Неочищенный пептид промывали изопропиловым эфиром (2×50 мл), центрифугировали и очищали с использованием препаративной ВЭЖХ (подвижная фаза А: 0,1% TFA в H₂O, В: H₂O) с последующей лиофилизацией с получением каркаса без линкера.

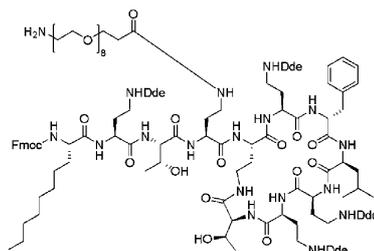
К раствору пептида в DCM добавляли Boc-PEG₈-ОН (1,2 экв.) и HBTU (1,2 экв.) с последующим добавлением DIPEA (2 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали 5% раствором HCl (водн.) два раза и концентрировали в вакууме. Остаток обрабатывали при помощи 20% TFA/DCM в течение 20 мин и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с использованием препаративной ВЭЖХ (подвижная фаза А: 0,1% TFA в H₂O, В: H₂O) и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения.

ES⁺ MS m/z 1142,6 [M+2]²/2 и 762,1 [M+3]³/3; теоретическая масса: 2283,8

Получение 6.

H₂N-PEG₈-[L-октилGly]-Dab(Dde)-Thr(OH)-Dab(Dde)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*

Dab(Dde)-Thr(OH)*

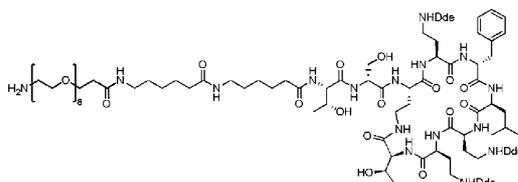


Указанное в заголовке соединение можно получить в соответствии со способом 2 с использованием Fmoc-Thr(OtBu)-CTC смолы в качестве исходной точки вместе с Boc-PEG₈-OH и Fmoc-[L-октилGly]-OH.

Промежуточное соединение использовали непосредственно на следующей стадии.

Получение 10.

H₂N-PEG₈-Ahx-Ahx-Thr(OH)-[D-Ser(OH)]-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*

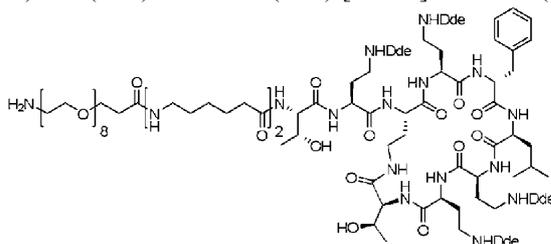


Указанное в заголовке соединение можно получить в соответствии со способом 2 с использованием Fmoc-Dab(Dde)-CTC смолы в качестве исходной точки вместе с Boc-PEG₈-OH и Boc-Ahx-Ahx-OH.

Промежуточное соединение использовали непосредственно на следующей стадии.

Получение 11.

H₂N-PEG₈-Ahx-Ahx-Thr(OH)-Dab(Dde)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*

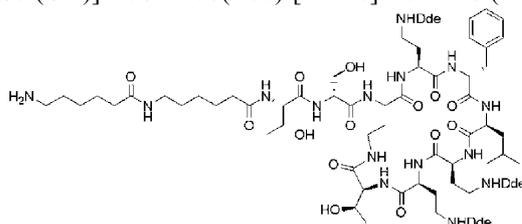


Указанное в заголовке соединение можно получить в соответствии со способом 2 с использованием Fmoc-Dab(Dde)-CTC смолы в качестве исходной точки вместе с Boc-PEG₈-OH и Boc-Ahx-Ahx-OH.

Промежуточное соединение использовали непосредственно на следующей стадии.

Получение 12.

H₂N-Ahx-Ahx-Thr(OH)-[D-Ser(OH)]-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*

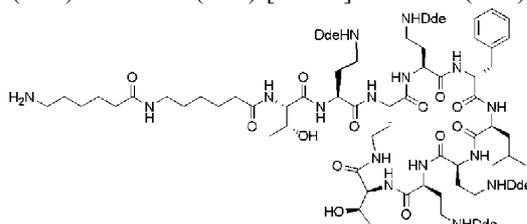


Указанное в заголовке соединение можно получить в соответствии со способом 3 с использованием Fmoc-Dab(Dde)-CTC смолы в качестве исходной точки вместе с Boc-Ahx-Ahx-OH.

Промежуточное соединение использовали непосредственно на следующей стадии.

Получение 13.

H₂N-Ahx-Ahx-Thr(OH)-Dab(Dde)-Dab*-Dab(Dde)-[D-Phe]-Leu-Dab(Dde)-Dab(Dde)-Thr(OH)*



Указанное в заголовке соединение можно получить в соответствии со способом 3 с использованием

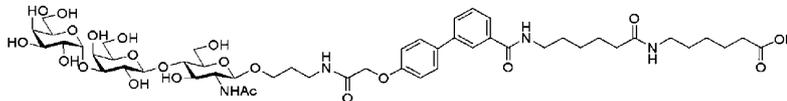
Фмос-Dab(Dde)-СТС смолы в качестве исходной точки вместе с Вос-Аhx-Аhx-ОН.

Промежуточное соединение использовали непосредственно на следующей стадии.

Синтез альфа-Gal промежуточных соединений

Получение 14.

6-(6-(4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-Ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-2-оксоэтокси)-[1,1'-бифенил]-3-илкарбоксамидо)гексанамидо)гексановая кислота



К раствору получения 15 (30 мг, 0,035 ммоль) и бензил 6-(6-аминогексанамидо)гексаноата (JACS 136 (52) 18034-18043 (2014), 14,1 мг, 0,042 ммоль) в DMF (600 мкл) добавляли триэтиламин (17 мкл, 0,123 ммоль) с последующим добавлением HATU (16 мг, 0,042 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, растворяли в DMSO и очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии, элюируя смесью 7-60% MeCN/вода с 0,1% аммиака, с получением желаемого бензил защищенного промежуточного соединения (19,8 мг, 48%).

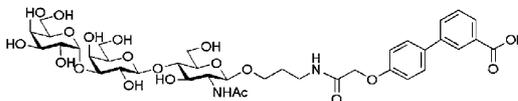
ЖХМС (Метод В) Rt= 2,45 мин; ES⁺ MS m/z 1173,9 [M+H]⁺

Выделенное промежуточное соединение растворяли в MeOH/воде (1:1 об./об., 10 мл) и добавляли Pd/C (10%, 10 мг). Реакционную смесь помещали в атмосферу водорода (50 ф/дюйм² (3,515 кг/см²)) и перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Катализатор удаляли фильтрованием через шприцевой фильтр и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (20,4 мг, >99%).

ЖХМС (Метод В) Rt=1,70 минут; ES⁻ MS m/z 1081,8 [M-H]⁻

Получение 15.

4'-(2-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-Ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-2-оксоэтокси)-[1,1'-бифенил]-3-карбоновая кислота



К 2-((3'-((бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-4-ил)окси)уксусной кислоте (Получение 16, 55 мг, 152 мкмоль) в DMF (7,5 мл) добавляли TEA (63,4 мкл, 455 мкмоль) с последующим добавлением раствора альфа-Gal (119 мг, 197 мкмоль) в DMSO (500 мкл). Добавляли HATU (86,6 мг, 228 мкмоль) в виде раствора в DMF (500 мкл) и реакционную смесь оставляли для перемешивания в течение 16 ч в атмосфере азота при комнатной температуре. Растворитель удаляли в вакууме и остаток очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии, элюируя смесью 7-60% MeCN/вода с 0,1% NH₃, с получением желаемого бензил защищенного промежуточного соединения в виде бесцветного твердого вещества (93,5 мг, 65%).

ЖХМС (Метод В) Rt=2,54 мин, ES⁺ MS m/z 947,6 [M+H]⁺

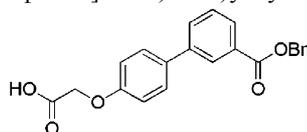
Выделенное промежуточное соединение растворяли в MeOH/воде (1:1 об./об., 5 мл) и к раствору добавляли Pd/C (10%, 10 мг).

Реакционную смесь помещали в атмосферу водорода (50 ф/дюйм² (3,515 кг/см²)) и перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Катализатор удаляли фильтрованием через шприцевой фильтр и растворитель удаляли в вакууме. Остаток очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии, элюируя смесью 5-40% MeCN/вода с 0,1% NH₃, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (71,6 мг, 84%).

ЖХМС (Метод А) Rt=1,83 минут, ES⁺ MS m/z 857,6 [M+H]⁺

Получение 16.

2-((3'-((Бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-4-ил)окси)уксусная кислота



Раствор бензил 4'-(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтокси)-[1,1'-бифенил]-3-карбоксилата (Получение 17, 7,80 г, 18,6 ммоль) в DCM/TFA/воде (10:10:1 об./об./об., 80 мл) перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, подвергали азеотропной перегонке с диоксаном/толуолом (1:1, об./об., 80 мл), растирали в порошок с толуолом, фильтровали и сушили в ва-

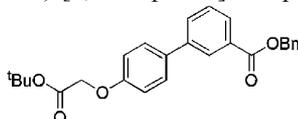
куумной печи с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (6,11 г, 90%).

ЖХМС (Метод В) Rt=2,43 мин, ES⁺ MS m/z 363,2 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMSO): ddd м.д. 13,00 (1H, с), 8,15 (1H, т), 7,95-7,90 (2H, м), 7,65-7,55 (3H, м), 7,50-7,45 (2H, м), 7,45-7,30 (3H, м) 7,05-7,00 (2H, м), 5,40 (2H, с), 4,70 (2H, с).

Получение 17.

Бензил 4'-(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтокси)-[1,1'-бифенил]-3-карбоксилат



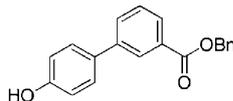
К бензил 4'-гидрокси-[1,1'-бифенил]-3-карбоксилату (Получение 18, 15 г, 49,3 ммоль), растворенному в DMF (150 мл), добавляли трет-бутилбромацетат (10,9 мл, 73,9 ммоль) и карбонат калия (20,4 г, 148 ммоль). Полученную суспензию перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток растворяли в воде (150 мл) и экстрагировали при помощи EtOAc (2×150 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (150 мл), NaOH (2M водн., 150 мл), сушили над MgSO₄ и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с использованием колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью 5-40% EtOAc/гептан, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (17,8 г, 86%).

ЖХМС (Метод В) Rt=4,14 мин, никакой масс-ион не наблюдался.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): ddd м.д. 8,25 (1H, с), 8,00 (1H, д), 7,7 (1H, д), 7,55 (2H, д), 7,50-7,25 (6H, м), 7,00 (2H, д), 5,40 (2H, с), 4,55 (2H, с), 1,50 (9H, с).

Получение 18.

Бензил 4'-гидрокси-[1,1'-бифенил]-3-карбоксилат



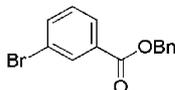
Смесь бензил 3-бромбензоата (Получение 19, 15 г, 51,5 ммоль), карбоната натрия (19,1 г, 180 ммоль) и (4-гидроксифенил)бороновой кислоты (8,53 г, 61,8 ммоль), растворенную в диоксане/воде (5:1 об./об., 450 мл), деоксигенировали в течение 30 мин в атмосфере азота. Добавляли Pd(PPh₃)₄ (5,95 г, 5,15 ммоль) и реакционную смесь нагревали до 100°C в течение 90 мин в атмосфере азота. После охлаждения до комнатной температуры добавляли EtOAc (450 мл) и воду (450 мл) и слои разделяли. Водный слой экстрагировали при помощи EtOAc (2×450 мл) и объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (450 мл). Органический слой сушили над MgSO₄ и растворитель удаляли в вакууме с получением черного остатка. Остаток фильтровали через слой диоксида кремния, промывая смесью EtOAc/гептан (1:1 об./об., 2л), и концентрировали в вакууме. Остаток растирали в порошок с толуолом (75 мл) и фильтровали. Полученное твердое вещество промывали дополнительным количеством толуола (25 мл) и сушили при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения в виде желто-коричневого твердого вещества (12,7 г, 81%).

ЖХМС (Метод В) Rt=3,39 мин, ES⁻ MS m/z 303,3 [M-H]⁻

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): ddd м.д. 8,25 (1H, с), 8,00 (1H, д), 7,70 (1H, д), 7,50-7,30 (8H, м), 6,90 (2H, д), 5,40 (2H, с), 5,00 (1H, шир.с).

Получение 19.

Бензил 3-бромбензоат



К раствору 3-бромбензойной кислоты (20 г, 99,5 ммоль), растворенной в DMF (100 мл), добавляли KHSO₃ (9,96 г, 99,5 ммоль). Добавляли по каплям бензилбромид (11,8 мл, 99,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток распределяли между EtOAc (200 мл) и водой (200 мл). Слои разделяли и органический слой промывали лимонной кислотой (1M, 200 мл), NaHCO₃ (насыщенный водн., 200 мл) и насыщенным соевым раствором (200 мл). Органический слой сушили над MgSO₄ и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения в виде бледно-желтого масла (28,3 г, 97%).

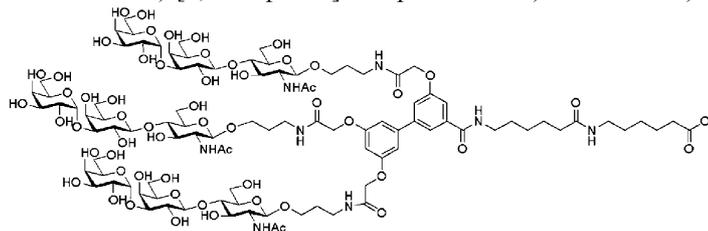
ЖХМС (Метод В) Rt=3,80 мин, ионизация не наблюдалась.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): ddd м.д. 8,20 (1H, с), 8,00 (1H, с), 7,65 (1H, с), 7,50-7,25 (6H, м), 5,35 (2H, с).

Получение 20.

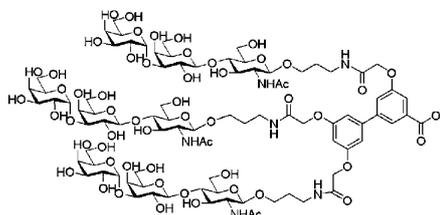
6-(6-(3',5,5'-Трис(2-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-

(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-2-оксоэтоксид)-[1,1'-бифенил]-3-карбоксамидо)гексанамидо)гексановая кислота



Указанное в заголовке соединение получали с использованием получения 21 и бензил 6-(6-аминогексанамидо)гексаноата (JACS 136 (52) 18034-18043 (2014)) в соответствии с Получением 14. ЖХМС (Метод В) Rt=1,47 минут, ES⁺ MS m/z 1201,3 [M+2H]⁺/2; теоретическая масса: 2400,0
Получение 21.

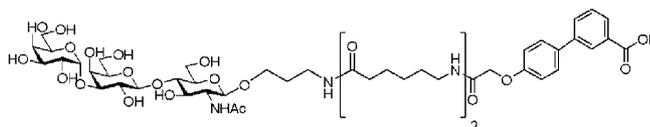
3',5,5'-Трис(2-((3-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-2-оксоэтоксид)-[1,1'-бифенил]-3-карбоновая кислота



Указанное в заголовке соединение получали с использованием альфа-Gal и 2,2',2''-(5'-((бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-3,3',5'-триил)трис(окси)триуксусной кислоты (WO 2017060729) в соответствии с Получением 14.

ЖХМС (Метод В) Rt=1,27 мин, ES⁺ MS m/z 1088,4 [M+2H]⁺/2, теоретическая масса: 2174,0
Получение 22.

4'-(2-((6-(((3-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксид)-[1,1'-бифенил]-3-карбоновая кислота

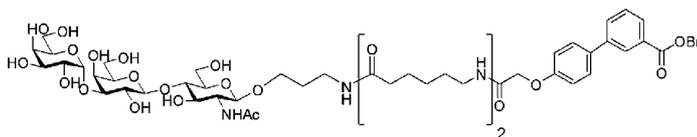


Бензил 4'-(2-((6-(((3-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксид)-[1,1'-бифенил]-3-карбоксилат (Получение 23, 215 мг) растворяли в растворе ТЕА и воды (1:1 об./об., 10 мл) и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии, элюируя смесью 1-30% MeCN/вода с 0,1% NH₃. Полученный остаток, который содержал исходное вещество, снова обрабатывали раствором ТЕА и воды (1:1 об./об., 10 мл) и перемешивали в течение 5 дней. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии, элюируя смесью 1-30% MeCN/вода с 0,1% NH₃, затем смесью 1-20% MeCN/вода с 0,1% NH₃, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (всего=172 мг, 87%).

ЖХМС (Метод В) Rt=1,65 мин, ES⁺ MS m/z 1083,9 [M+H]⁺

Получение 23.

Бензил 4'-(2-((6-(((3-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксид)-[1,1'-бифенил]-3-карбоксилат

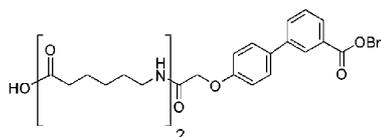


К раствору 6-(6-(2-((3'-((бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-4-ил)окси)ацетида)гексанамидо)гексановой кислоты (Получение 24, 110 мг, 187 мкмоль), растворенной в DMF (2,2 мл), добавляли НАТУ (106 мг, 280 мкмоль) и ТЕА (80 мкл, 560 мкмоль). Добавляли раствор альфа-Gal (146 мг, 243 мкмоль) в DMSO (1 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь сразу очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии, элюируя смесью 10-70% MeCN в воде с 0,1% NH₃, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (215 мг, 98%).

ЖХМС (Метод В) Rt=2,62 мин, ES⁺ MS m/z 1173,7 [M+H]⁺

Получение 24.

6-(6-(2-((3'-((бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-4-ил)окси)ацетида)гексанамидо)гексановая кислота



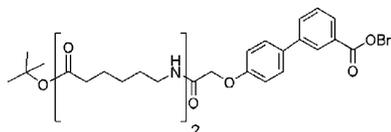
Бензил 4'-(2-((6-((6-(трет-бутокси)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксид)-[1,1'-бифенил]-3-карбоксилат (Получение 25, 320 мг, 496 мкмоль) растворяли в растворе DCM, TFA и воды (10:10:1 об./об./об., 10 мл) и перемешивали в течение 3 ч. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток подвергали азеотропной перегонке с диоксаном/толуолом (1:1 об./об., 3×24 мл). Неочищенное вещество очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии, элюируя смесью 10-80% MeCN/вода с 0,1% муравьиной кислоты, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (168 мг, 66%).

ЖХМС (Метод В) Rt=2,81 минут, ES⁻ MS m/z 589,2 [M]⁻

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): ddd м.д. 8,25 (1H, c), 8,02 (1H, д), 7,72 (1H, д), 7,59 (2H, д), 7,52-7,45 (3H, м), 7,42-7,35 (3H, м), 7,00 (2H, д), 6,74 (1H, шир.с), 5,71 (1H, шир.с), 5,40 (2H, c), 4,56 (2H, c), 3,44-3,39 (2H, м), 3,32-3,28 (2H, м), 2,37 (2H, т), 2,15 (2H, т), 1,68-1,51 (6H, м), 1,41-1,33 (6H, м) м.д.

Получение 25.

Бензил 4'-(2-((6-((6-(трет-бутокси)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксид)-[1,1'-бифенил]-3-карбоксилат



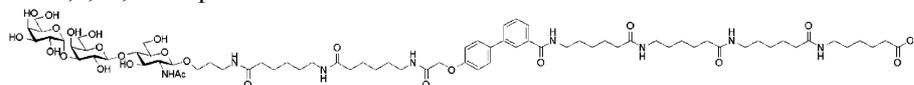
К раствору 2-((3'-((бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-4-ил)окси)уксусной кислоты (Получение 16, 150 мг, 414 мкмоль, 1 экв.), растворенной в DMF (3 мл), добавляли ТЕА (173 мкл, 1,2 ммоль) и раствор трет-бутил 6-(6-аминогексанамидо)гексаноата (Получение 31, 162 мг, 538 мкмоль) в DMF (2 мл). Затем добавляли НАТУ (236 мг, 621 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь сразу очищали с использованием колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью 0-100% EtOAc в гептане, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (320 мг, >100%).

ЖХМС (Метод В) Rt=3,70 мин, ES⁻ MS m/z 645,3 [M]⁻

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): ddd м.д. 8,25 (1H, c), 8,05-8,00 (1H, м), 7,75-7,70 (1H, м), 7,60 (2H, д), 7,50-7,45 (3H, м), 7,40-7,35 (3H, м), 7,00 (2H, д), 6,70 (1H, шир.с), 5,60 (1H, шир.с), 5,40 (2H, c), 4,55 (2H, c), 2,25-2,10 (4H, м), 1,70-1,55 (9H, м), 1,55-1,45 (3H, м), 1,45 (9H, c), 1,40-1,30 (4H, м) м.д.

Получение 26.

1-(4'-(2-((6-((6-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетида)-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксид)-[1,1'-бифенил]-3-ил)-1,8,15,22-тетраоксо-2,9,16,23-тетраазанонакозан-29-овая кислота



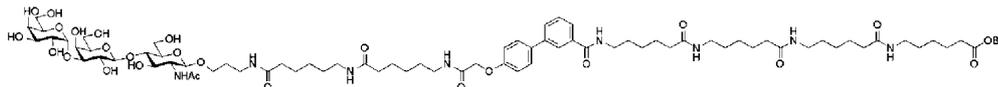
К раствору бензил 1-(4'-(2-((6-((6-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетида)-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-

пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксиде)-[1,1'-бифенил]-3-ил)-1,8,15,22-тетраоксо-2,9,16,23-тетраазаноакозан-29-оата (Получение 27, 50 мг, 30 мкмоль) в MeOH (5 мл) и воде (5 мл) добавляли 5% Pd/C (5 мг). Реакционную смесь дегазировали и перемешивали в атмосфере водорода (баллон) в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали через шприцевой фильтр и раствор концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде бледно-серого твердого вещества (26 мг, 60%).

ЖХМС (Метод В) Rt=1,88 мин, ES⁻ MS m/z 1537,4 [M]⁻

Получение 27.

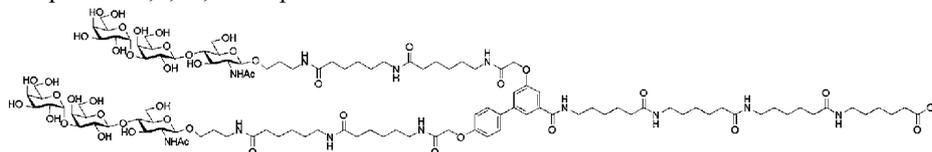
Бензил 1-(4'-(2-(((6-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетиамидо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксиде)-[1,1'-бифенил]-3-ил)-1,8,15,22-тетраоксо-2,9,16,23-тетраазаноакозан-29-оат



К раствору 4'-(2-(((6-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетиамидо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксиде)-[1,1'-бифенил]-3-карбонной кислоты (Получение 22, 50 мг, 46 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли НАТУ (26 мг, 69 мкмоль) и ТЕА (19 мкл, 138 мкмоль). Добавляли раствор гидрохлорида бензил 6-(6-(6-(6-аминогексанамидо)гексанамидо)гексанамидо)гексаноата (WO 2017060729, 36 мг, 60 мкмоль) в DMF (2 мл) и ТЕА (13 мкл, 92 мкмоль) с получением желтого раствора и реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь сразу очищали с использованием обращенно-фазовой колоночной хроматографии, элюируя смесью 2-70% MeCN в воде с 0,1% NH₃, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (50 мг, 66%).

ЖХМС (Метод В) Rt=2,41 мин, ES⁺ MS m/z 1627,5 [M+H]⁺

Получение 28. 1-(4',5-бис(2-(((6-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетиамидо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксиде)-[1,1'-бифенил]-3-ил)-1,8,15,22-тетраоксо-2,9,16,23-тетраазаноакозан-29-овая кислота

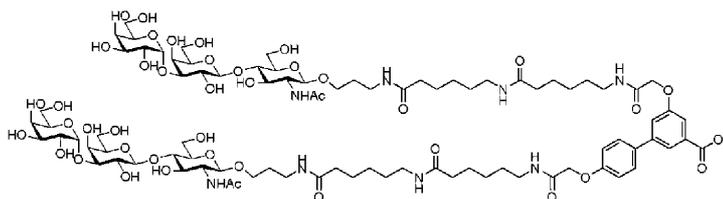


Указанное в заголовке соединение получали в соответствии со способами, описанными для получения 27 и 26, с использованием 4',5-бис(2-(((6-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетиамидо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксиде)-[1,1'-бифенил]-3-карбонной кислоты (Получение 29) и бензил 6-(6-(6-(6-аминогексанамидо)гексанамидо)гексанамидо)гексаноата (WO 2017060729).

ЖХМС (Метод В) Rt=1,72 мин, ES⁺ MS m/z 1211,7 [M+2H]²⁺; теоретическая масса: 2420,7

Получение 29.

4',5-бис(2-(((6-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетиамидо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пропил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтоксиде)-[1,1'-бифенил]-3-карбонная кислота



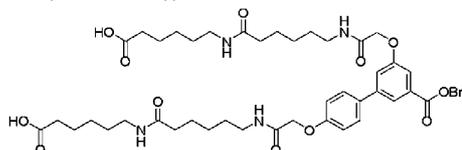
Указанное в заголовке соединение получали в соответствии со способами, описанными для получения 22 и 23, с использованием 6,6'-(6,6'-(2,2'-(((5-(((бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-3,4'-

диил)бис(окси)бис(ацетил)бис(азандиил)бис(гексаноил)бис(азандиил)дигексановой кислоты (Получение 30) и альфа-Gal.

ЖХМС (Метод В) Rt=1,55 мин, ES⁻ MS m/z 1967,3 [M-H]⁻

Получение 30.

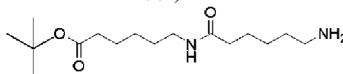
6,6'-((6,6'-((2,2'-((5-((бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-3,4'-диил)бис(окси)бис(ацетил)бис(азандиил)бис(гексаноил)бис(азандиил)дигексановая кислота



Указанное в заголовке соединение получали в соответствии со способами, описанными для получения 25 и 24, с использованием трет-бутил 6-(6-аминогексанамидо)гексаноата (Получение 31) и 2,2'-((5-((бензилокси)карбонил)-[1,1'-бифенил]-3,4'-диил)бис(окси)диуксусной кислоты (WO 2017060729).

ЖХМС (Метод В) Rt=2,67 мин, ES⁻ MS m/z 889,5 [M-H]⁻

Получение 31. трет-Бутил 6-(6-аминогексанамидо)гексаноат

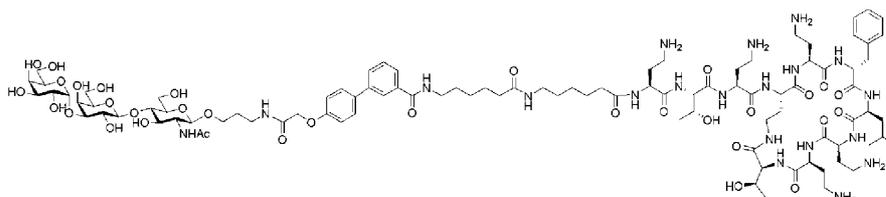


Указанное в заголовке соединение получали в соответствии со способами, описанными для получения 27 и 26, с использованием трет-бутил 6-аминогексаноата и 6-[[бензилокси)карбонил]амино}гексановой кислоты.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): ddd м.д. 5,71 (1H, шир.с), 3,30-3,20 (2H, м), 2,80-2,70 (2H, м), 2,28-2,07 (4H, м), 1,72-1,29 (21H, м).

Синтез примеров

Пример 1.



К раствору получения 14 (1,2 мг, 0,0011 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли DIPEA (4,0 экв.) и раствор получения 1 (2,5 мг, 0,0024 ммоль) в DMF (200 мкл). Затем добавляли HATU (1,2 экв.) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией (C-18, 4 г, 0-70% MeCN/вода) и сушили в вакууме. Остаток растворяли в 3% гидразина/MeOH (0,5 мл) и реакционную смесь встряхивали в течение 30 минут. Это вещество очищали с использованием препаративной ВЭЖХ (колонок: Gemini-NX 5 мкм C18 110A 150×4, 6 мм; Поток: 1,0 мл/мин T=30°C; Подвижная фаза А: 0,1%TFA в H₂O В: 0,1%TFA в MeCN; Устройство: Agilent 1260 HPLC-(5-521) и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения в виде трифторацетатной соли (0,1 мг).

ВЭЖХ (Способ 1) Rt=15,11-15,76 мин;

MS m/z 1064,0 [M+2H]⁺/2 и 710 [M+3H]⁺/3, теоретическая масса: 2127,0.

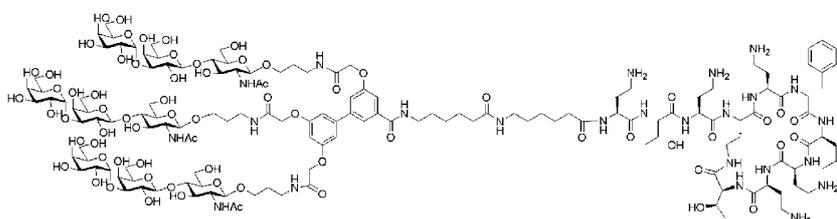
Следующие примеры 2-25 получали с использованием соответствующих получений, описанных в настоящей заявке, и в соответствии с примером 1 (образование амидной связи с последующим гидразинолизом). Примеры выделяли в виде TFA солей и анализировали при помощи ВЭЖХ, как описано ниже:

Способ 1: Gemini-NX 5 мкм, C18, 110A, 150×4,6 мм;

Поток: 1,0 мл/мин. Подвижная фаза А: 0,1%TFA в H₂O В: 0,1%TFA в MeCN; Устройство: Agilent 1200 HPLC-VE (1-614). Градиент: 0 мин (85% А), 20 мин (55% А), 20,1 мин (10% А), 23 мин (10% А).

Способ 2: XBridge C18, 3,5 мкм, 2,1×30 мм. Поток: 1,0 мл/мин. Подвижная фаза А: 0,1% TFA в воде; Подвижная фаза В: MeCN. Градиент: 0 мин (5% В), 6 мин (95% В), 7 мин (95% В), 8 мин (5% В). Темп.: 40°C.

Пример 2.

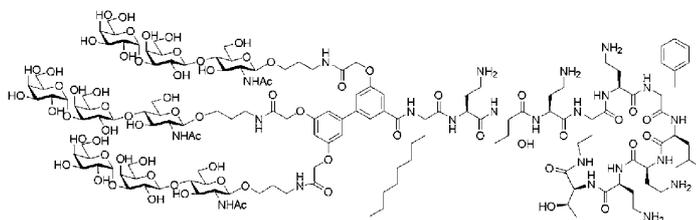


Соединение примера 2 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 20 и получения 1.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=6,31-7,31$ мин

MS m/z 1149,0 $[M+3H]^+/3$, теоретическая масса: 3445,6

Пример 3.

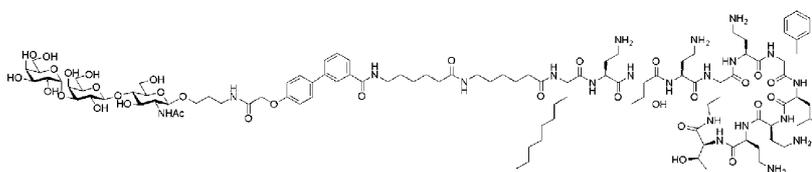


Соединение примера 3 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 21 и получения 3.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=9,66-10,84$ мин

MS m/z 1130 $[M+3H]^+/3$, теоретическая масса: 3388,6

Пример 4.

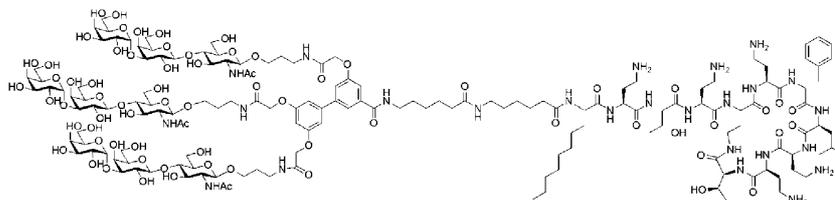


Соединение примера 4 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 14 и получения 3.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=9,82-10,24$ мин

MS m/z 1149,0 $[M+2H]^+/2$, теоретическая масса: 2297,7

Пример 5.

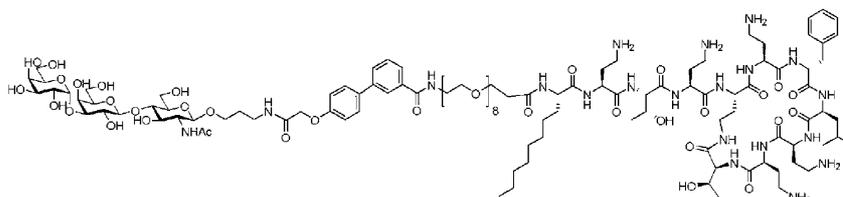


Соединение примера 5 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 20 и получения 3.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=10,23-10,81$ мин

MS m/z 904,0 $[M+4H]^+/4$, теоретическая масса: 3614,9

Пример 6.



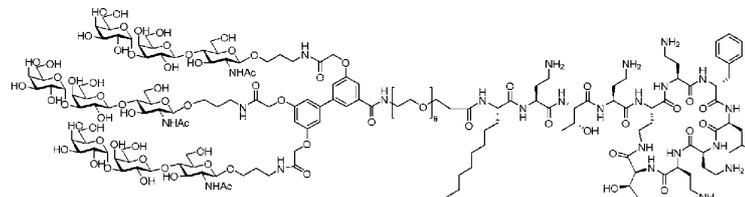
Соединение примера 6 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 15 и получения 6.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=9,71-10,55$ мин

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,953$ мин

MS m/z 832 $[M+3H]^+/3$, теоретическая масса: 2493,0

Пример 7.



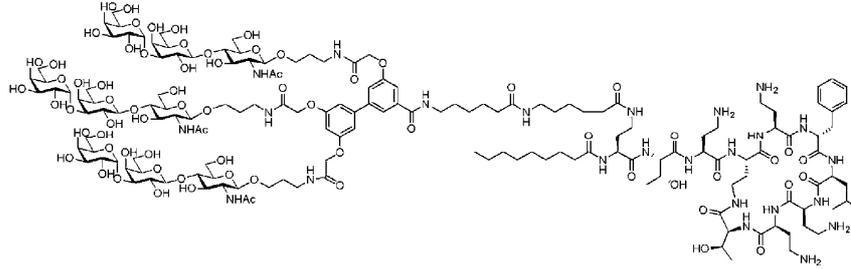
Соединение примера 7 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 21 и получения б.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=10,06-10,98$ минут

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,640$ минут

MS m/z 1271 $[M+3H]^+/3$, теоретическая масса: 3809,0

Пример 8.

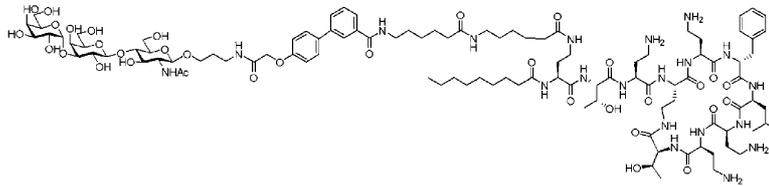


Соединение примера 8 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 20 и получения 4.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=14,43-15,24$ мин

MS m/z 897 $[M+4H]^+/4$, теоретическая масса: 3585,8

Пример 9.

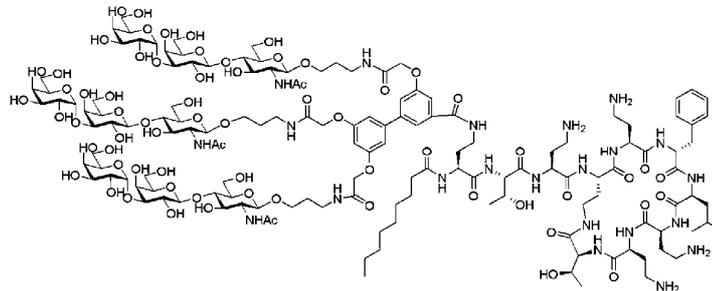


Соединение примера 9 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 14 и получения 4.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=17,57-17,84$ мин

MS m/z 1134 $[M+2H]^+/2$, теоретическая масса: 2268,6

Пример 10.

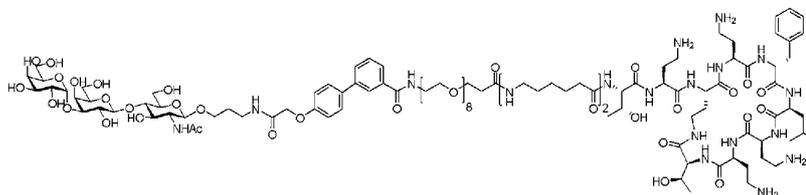


Соединение примера 10 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 21 и получения 4.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=13,70-14,50$ мин

MS m/z 1120 $[M+3H]^+/3$, теоретическая масса: 3359,5

Пример 11.

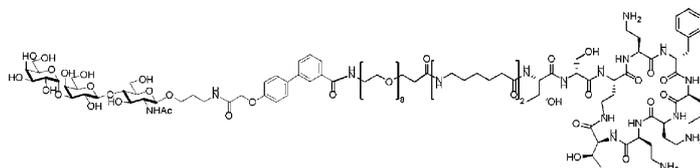


Соединение примера 11 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 15 и получения 11.

ВЭЖХ (Способ 1) $R_t=9,75-10,79$ мин

MS m/z 817,9 $[M+3H]^+/3$, теоретическая масса: 2450,3

Пример 12.



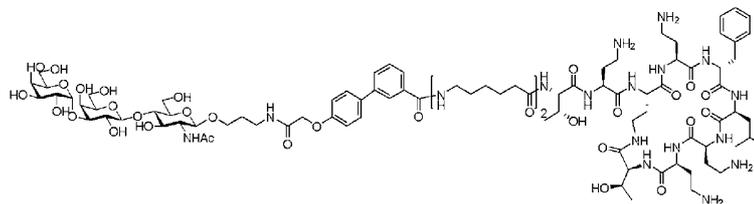
Соединение примера 12 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 15 и получения 10.

ВЭЖХ (Способ 1) Rt=10,77-11,23 мин

ВЭЖХ (Способ 2) Rt=3,065 мин

MS m/z 1219,8 [M+2H]⁺/2, теоретическая масса: 2437,3

Пример 13.

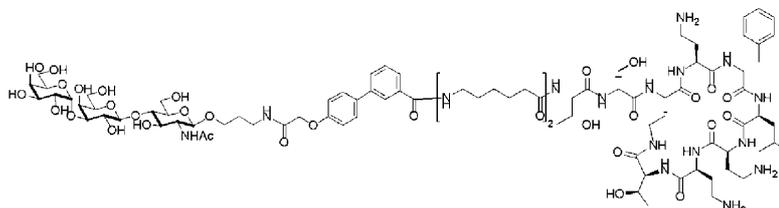


Соединение примера 13 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 15 и получения 13.

ВЭЖХ (Способ 1) Rt=8,77-11,14 мин

MS m/z 1014,0 [M+2H]⁺/2, теоретическая масса: 2026,0

Пример 14.

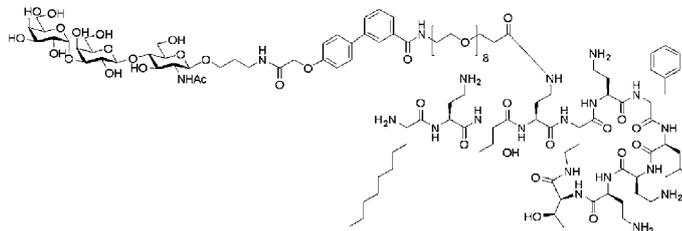


Соединение примера 14 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 15 и получения 12.

ВЭЖХ (Способ 1) Rt=10,71-11,64 мин

MS m/z 1007,8 [M+2H]⁺/2, теоретическая масса: 2013,6

Пример 15.

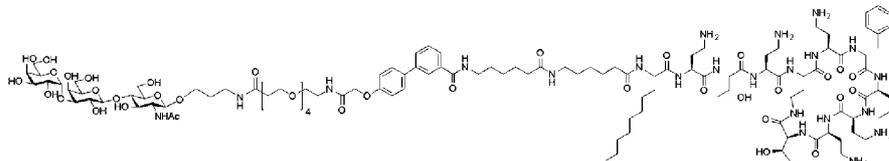


Соединение примера 15 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 15 и получения 9.

ВЭЖХ (Способ 2) Rt=8,390 мин

MS m/z 1248,3 [M+2H]⁺/2, 832,3 [M+3H]⁺/3 теоретическая масса: 2493,3

Пример 16.

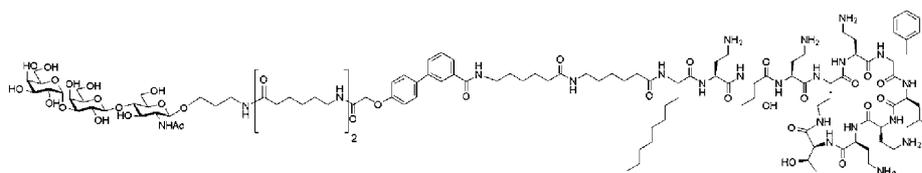


Соединение примера 16 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием 4'-((22-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-2,18-диоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,19-диазадокозил)окси)-[1,1'-бифенил]-3-карбоновой кислоты (WO 2017060729) и получения 8.

ВЭЖХ (Способ 2) Rt=2,944 мин

MS m/z 1273,0 [M+2H]⁺/2, 849,1 [M+3H]⁺/3; теоретическая масса: 2543,4

Пример 17.

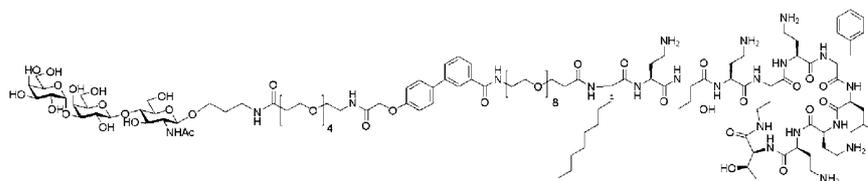


Соединение примера 17 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 22 и получения 8.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,964$ мин

MS m/z 1262,5 $[M+2H]^+/2$, 841,9 $[M+3H]^+/3$; теоретическая масса: 2522,41

Пример 18.

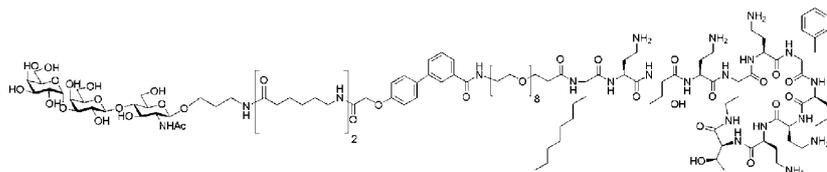


Соединение примера 18 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием 4'-((22-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидрокси-метил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидрокси-метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидрокси-метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-2,18-диоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,19-диазадокзил)окси)-[1,1'-бифенил]-3-карбоновой кислоты (WO2017060729) и получения 6.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,963$ мин

MS m/z 914,9 $[M+3H]^+/3$, 686,3 $[M+4H]^+/4$; теоретическая масса: 2740,5

Пример 19.

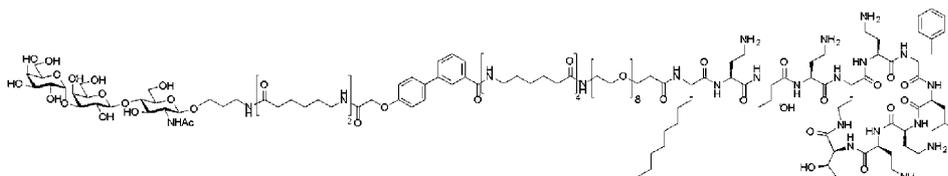


Соединение примера 19 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 22 и получения 6.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,998$ мин

MS m/z 1361,6 $[M+2H]^+/2$, 907,9 $[M+3H]^+/3$; теоретическая масса: 2719,49

Пример 20.

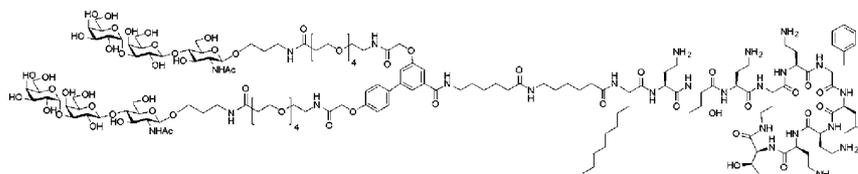


Соединение примера 20 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 26 и получения 6.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=3,033$ мин

MS m/z 1058,7 $[M+3H]^+/3$, 794,1 $[M+4H]^+/4$; теоретическая масса: 3173,82

Пример 21.

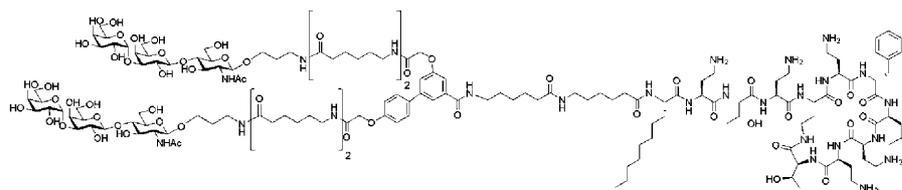


Соединение примера 21 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием 4',5'-бис((22-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетидамо-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-дигидрокси-6-(гидрокси-метил)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидрокси-метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-4-гидрокси-6-(гидрокси-метил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-2,18-диоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,19-диазадокзил)окси)-[1,1'-бифенил]-3-карбоновой кислоты (WO2017060729) и получения 8.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,761$ мин

MS m/z 1151,3 $[M+3H]^+/3$, 863,6 $[M+4H]^+/4$; теоретическая масса: 3448,8

Пример 22.

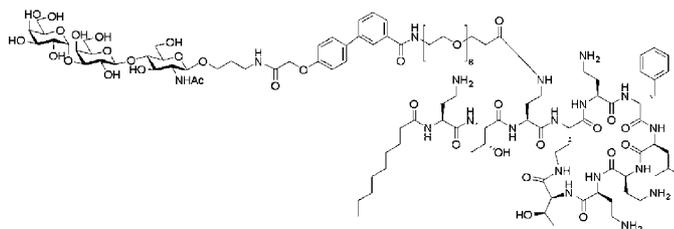


Соединение примера 22 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 29 и получения 8.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,791$ мин

MS m/z 1137,1 $[M+3H]^+/3$, 853,2 $[M+4H]^+/4$; теоретическая масса: 3406,8

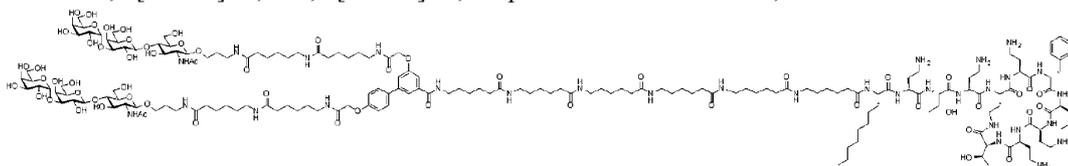
Пример 23.



Соединение примера 23 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 15 и получения 5.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,983$ мин

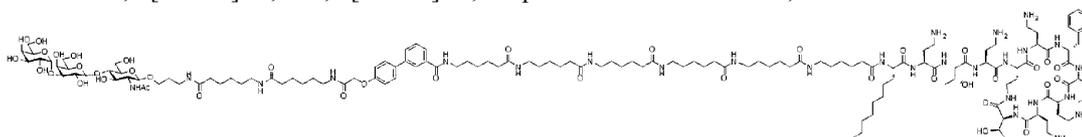
MS m/z 1233,7 $[M+2H]^+/2$, 822,7 $[M+3H]^+/3$; теоретическая масса: 2464,30



Соединение примера 24 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 28 и получения 8.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,852$ мин

MS m/z 1287,6 $[M+3H]^+/3$, 966,3 $[M+4H]^+/4$; теоретическая масса: 3861,5



Соединение примера 25 получали аналогично процедуре, описанной в примере 1, с использованием получения 26 и получения 8.

ВЭЖХ (Способ 2) $R_t=2,990$ мин

MS m/z 993,0 $[M+3H]^+/3$, 745,1 $[M+4H]^+/4$; теоретическая масса: 2976,6

Биологические анализы

Связывание соединений с очищенными LPS

Связывание соединений с LPS из грамотрицательных бактерий оценивали путем измерения вытеснения дансированного производного полимиксина В из LPS в установленном анализе (J. Pharm. Sci. (2016), 105(2), 1006-10; Antimicrob Agents Chemother. (1986), 29(3), 495-550; Anal. Biochem (2011), 409 (2), 273-283). Дансированный полимиксин В титровали в растворе LPS и измеряли интенсивность флуоресценции (возб. 485 нм, эм. 535 нм). Титрование увеличивающейся концентрации конъюгатов свинца или полимиксина В в раствор, содержащий LPS и дансированный полимиксин В, соответствующий 95% заполнению зонда, приводило к уменьшению флуоресцентной эмиссии за счет вытеснения дансированного полимиксина В кандидатом.

Липополисахарид (LPS)-связывающие активности синтетических Полимиксин-происходящих пептидов и примеров настоящего изобретения оценивали путем измерения вытеснения Дансил-Полимиксина В (DPMB), связанного с LPS *E. coli* и LPS *P. aeruginosa*.

Материалы

LPS из *Escherichia coli* закупали у Sigma Aldrich, cat#L3024. LPS из *Pseudomonas aeruginosa* закупали у Sigma Aldrich, cat#L9143. Полимиксин В сульфат (PMB_std) закупали у Alfa Aesar, cat#J63074. Полимиксин В нонапептид гидрохлорид (PMB_nona) закупали у Sigma Aldrich, cat#P2076. Воду без нуклеаз закупали у Qiagen, cat#129114.

Протокол анализа

Бактериальный LPS приготавливали до 20 мкг/мл в воде без нуклеаз. DPMB приготавливали до 4

мкМ в воде без нуклеаз. Бактериальный LPS при 20 мкг/мл (40 мкл) или воду в качестве отрицательного контроля (40 мкл) уравнивали с DPMВ при 4 мкМ (20 мкл) путем выдерживания в течение 5 мин при комнатной температуре при встряхивании (450 об/мин) в непрозрачном черном 96-луночном планшете. Титрования испытываемых соединений при 4× конечной анализируемой концентрации (20 мкл) добавляли к LPS и DPMВ, аналитический планшет выдерживали в течение 10 мин при комнатной температуре при встряхивании (450 об/мин).

Интенсивность флуоресценции определяли на многоканальном планшет-ридере Envision 2102 (эм.340, возб.485). Соединение примера 1 было испытано в описанном выше анализе связывания, и результаты показаны на фиг. 1 и 2.

Анализ рекрутинга антител методом проточной цитометрии с использованием анти-альфа-галактозил IgM антитела

Проточную цитометрию использовали для демонстрации связывания L (в качестве катионного антимикробного пептида) с E.coli и F (в качестве молекулы углевода, способной связываться с человеческим анти-альфа-галактозил антителом). Вторичное FITC-меченное анти-человеческое IgM антитело использовали для детекции связывания анти-альфа-галактозила с соединением.

Способ 1.

Анализы осуществляли в полистирольных 96-луночных U-донных планшетах (Costar). 96-луночные планшеты предварительно блокировали казеиновым блокирующим буфером (Thermo Fisher 37528) и затем промывали три раза при помощи (HBSS+/+) (Life Technologies 14025-050) перед анализом. E.coli K12 (Public Health England, NCTC 10538) выращивали в LB бульоне (Fisher BP1426-500) до поздней экспоненциальной фазы. Затем бактерии центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в HBSS+/+ при бактериальной плотности 2×10^9 КОЕ/мл. BacLight red бактериальный штамм (ThermoFisher B35001) добавляли к бактериям до конечной концентрации 1 мкМ и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Бактерии центрифугировали (10000 об/мин, 5 минут) и ресуспендировали в HBSS+/+ при концентрации 2×10^9 КОЕ/мл. 1×10^8 КОЕ затем инкубировали с 20 мкМ примеров 2-14 (см. табл. 1) или только с буфером при комнатной температуре, встряхивая при 450 об/мин в течение 1 ч. Бактерии промывали 3×200 мкл HBSS+/+ (центрифугировали при 4000 об/мин, 5 минут) перед добавлением 50 мкл анти-альфа-галактозил человеческого IgM M86 антитела (Absolute Antibody Ab00532) при 25 мкг/мл в HBSS+/+. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, встряхивая при 450 об/мин. Бактерии промывали 3×200 мкл HBSS+/+ (центрифугировали в течение 4000 об/мин, 5 мин) перед добавлением 100 мкл анти-человеческого IgM-FITC антитела (Biolegend 314506) при 1:10 разведении в HBSS+/+ и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, встряхивая при 450 об/мин. После конечной промывки 3×200 мкл HBSS+/+ бактерии ресуспендировали в 200 мкл HBSS+/+ и оценивали на FC500 (Beckman Coulter). Живые бактерии давали сигнал флуоресценции выше порогового значения в FL-4 канале, а медианный флуоресцентный сдвиг регистрировали в FL-1 канале. Данные от всех образцов анализировали в пакете программ Kaluza (Beckman Coulter). Эксперимент повторяли два раза.

Табл. 1 демонстрирует захват анти-альфа галактозил IgM антител к поверхности бактерий с использованием анализа проточной цитометрии, описанного выше. Кратное изменение относительно фона рассчитывали путем деления средней интенсивности флуоресценции, полученной в присутствии 20 мкМ Примеров, на среднюю интенсивность флуоресценции, полученную в отсутствие примеров. Сдвиг интенсивности флуоресценции (FITC) происходит из-за события связывания на каждом конце молекулы.

Таблица 1

Пример №	Рекрутинг анти-альфа галактозил IgM при 20 мкМ (среднее кратное изменение по сравнению с носителем)	Количество испытаний (n)
1	3	n=2
2	5	n=1
3	7	n=2
4	14	n=2
5	17	n=2

6	24	n=2
7	28	n=2
8	10	n=2
9	21	n=4
10	2	n=2
14	1	n=2
13	2	n=2
11	1	n=2
12	1	n=2

Способ 2.

Анализы осуществляли в полистирольных 96-луночных U-донных планшетах (Costar). E.coli K12 (Public Health England, NCTC 10538) выращивали в LB бульоне (Fisher BP1426-500) до поздней экспоненциальной фазы. Затем бактерии промывали один раз HBSS+/, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в HBSS+/. Бактерии центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в HBSS+/+ при бактериальной плотности 2×10^9 КОЕ/мл. 1×10^8 КОЕ затем инкубировали с 20 мкМ примеров 15-25 (см. табл. 2) или только с буфером при комнатной температуре, встряхивая при 450 об/мин в течение 1 ч. Бактерии промывали 3×200 мкл HBSS+/+ (центрифугировали при 4000 об/мин, 5 мин) перед добавлением 50 мкл анти-альфа-галактозил человеческого IgM M86 антитела (Absolute Antibody Ab00532) при 25 мкг/мл в HBSS+/+. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, встряхивая при 450 об/мин. Бактерии промывали 3×200 мкл HBSS+/+ (центрифугировали в течение 4000 об/мин, 5 мин) перед добавлением 100 мкл античеловеческого IgM-FITC антитела (Biolegend 314506) при 1:10 разведении в HBSS+/+ и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, встряхивая при 450 об/мин. После конечной промывки 3×200 мкл HBSS+/+ бактерии ресуспендировали в 200 мкл HBSS+/+ и оценивали на Cytotflex (Beckman Coulter). Собирали общее количество бактерий 50000. Медианный флуоресцентный сдвиг регистрировали регистрировали в FITC-A канале. Данные от всех образцов анализировали в пакете программ Kaluza (Beckman Coulter). Эксперимент повторяли два раза.

Табл. 2 демонстрирует захват анти-альфа-галактозил IgM антител к поверхности бактерий с использованием анализа проточной цитометрии, описанного выше. Кратное изменение относительно фона рассчитывали путем деления средней интенсивности флуоресценции, полученной в присутствии 20 мкМ Примеров, на среднюю интенсивность флуоресценции, полученную в отсутствие примеров. Сдвиг интенсивности флуоресценции (FITC) происходит из-за события связывания на каждом конце молекулы.

Таблица 2

Пример №	Рекрутинг анти-альфагалактозил IgM при 20 мкМ (среднее кратное изменение по сравнению с носителем)	Количество испытаний (n)
15	248	n=4
16	70	n=2
17	213	n=2
18	65	n=2
19	109	n=2
20	145	n=2
21	158	n=2
22	149	n=2
23	28	n=2
24	269	n=4
25	104	n=4

Анализ рекрутинга антител методом проточной цитометрии с использованием анти-альфа-галактозил IgG антитела

Проточную цитометрию использовали для демонстрации связывания L (в качестве катионного антимикробного пептида) с E.coli и F (в качестве молекулы углевода, способной связываться с человеческим анти-альфа-галактозил антителом). Вторичное FITC-меченное анти-человеческое IgG антитело использовали для детекции связывания альфа-галактозила с соединением.

Анализы осуществляли в полистирольных 96-луночных U-донных планшетах (Costar). 96-луночные

планшеты предварительно блокировали казеиновым блокирующим буфером (Thermo Fisher 37528) и затем промывали три раза (HBSS+/+) (Life Technologies 14025-050) перед анализом. E.coli K12 (Public Health England, NCTC 10538) выращивали в LB бульоне (Fisher BP1426-500) до поздней экспоненциальной фазы. Затем бактерии центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в HBSS+/+ при бактериальной плотности 2×10^9 КОЕ/мл. Baclight red бактериальный штамм (ThermoFisher B35001) добавляли к бактериям до конечной концентрации 1 мкМ и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Бактерии центрифугировали (10000 об/мин, 5 мин) и ресуспендировали в HBSS +/+ при концентрации 2×10^9 КОЕ/мл. 1×10^8 КОЕ затем инкубировали с 20 мкМ примеров 1-10 (см. табл. 3) или только с буфером при комнатной температуре, встряхивая при 450 об/мин в течение 1 ч. Бактерии промывали 3×200 мкл HBSS+/+ (центрифугировали при 4000 об/мин, 5 мин) перед добавлением 50 мкл анти-альфа-галактозил IgG антитела.

(Анти-альфа-галактозил антитело очищали из человеческого внутривенного иммуноглобулина (Gammagard) при помощи аффинной очистки с использованием альфа-галактозил-HAS (человеческий сывороточный альбумин) на колонке с сефарозой от Rockland Immunochemicals Inc.) при 42 мкг/мл в HBSS+/+. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, встряхивая при 450 об/мин. Бактерии промывали 3×200 мкл HBSS+/+ (центрифугировали в течение 4000 об/мин, 5 мин) перед добавлением 100 мкл анти-человеческого IgG-FITC антитела (Biolegend 409310) при 1:20 разведении в HBSS+/+ и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, встряхивая при 450 об/мин. После конечной промывки 3×200 мкл HBSS+/+ бактерии ресуспендировали в 200 мкл HBSS+/+ и оценивали на FC500 (Beckman Coulter). Живые бактерии давали сигнал флуоресценции выше порогового значения в FL-4 канале, а медианный флуоресцентный сдвиг регистрировали в FL-1 канале. Данные от всех образцов анализировали в пакете программ Kaluza (Beckman Coulter). Эксперимент повторяли два раза.

Табл. 3 демонстрирует захват анти-альфа галактозил IgG антител к поверхности бактерий с использованием анализа проточной цитометрии, описанного выше. Кратное изменение относительно фона рассчитывали путем деления средней интенсивности флуоресценции, полученной в присутствии 20 мкМ Примеров, на среднюю интенсивность флуоресценции, полученную в отсутствие примеров. Сдвиг интенсивности флуоресценции (FITC) происходит из-за события связывания на каждом конце молекулы.

Таблица 3

Пример №	Рекрутинг анти-альфагалактозил IgG при 20 мкМ (среднее кратное изменение по сравнению с носителем)	Количество испытаний (n)
1	1	n=1
2	2	n=1
3	3	n=2
4	8	n=2
5	6	n=2
6	7	n=2
7	6	n=2
8	3	n=2
9	5	n=2
10	1	n=2

Анализ осаждения комплемента методом проточной цитометрии

Анализы осуществляли в полистирольных 96-луночных U-донных планшетах (Costar). E.coli K1:O18ac:H7 (ATCC 700973) выращивали в LB бульоне (Fisher BP1426-500) до поздней экспоненциальной фазы. Затем бактерии центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в PBS (Sigma D8537-500 мл). Бактерии центрифугировали (10000 об/мин, 5 мин) и ресуспендировали в PBS с использованием 1% раствора BSA (Sigma A2153-50G) при концентрации 2×10^9 КОЕ/мл. 1×10^8 КОЕ затем инкубировали с 20 мкМ и/или 10 мкМ примеров 4-7,9 и 15-25 (см. табл. 4 и фиг. 3) или только с буфером при 4°C в течение 45 мин. Бактерии промывали 1×200 мкл HBSS+/+ (центрифугировали при 4000 об/мин, 5 минут) перед добавлением 100 мкл объединенной человеческой сыворотки (Innovate Research IPLA-CSER) в PBS+1% BSA до конечной концентрации сыворотки 25%. Бактерии инкубировали при 37°C в течение 20 мин. 100 мкл охлажденного льдом PBS добавляли в каждую лунку. Планшеты центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин при 4°C и супернатант сливали. Бактерии промывали еще 2 раза 200 мкл HBSS +/+ (центрифугировали в течение 4000 об/мин, 5 мин) перед добавлением 100 мкл анти-человеческого C3b/C3bi-PE антитела (Biolegend 846104) при 1:50 разведении в PBS + 1% BSA и инкубировали при 4°C в течение 45 мин. После конечной промывки 3×200 мкл HBSS+/+ бактерии

ресуспендировали в 200 мкл HBSS+/+ и оценивали на Cytoflex (Beckman Coulter). Среднюю интенсивность флуоресценции регистрировали в PE канале. Данные от всех образцов анализировали в пакете программ Kaluza (Beckman Coulter).

Табл. 4 демонстрирует осаждение СЗб из человеческой сыворотки к поверхности бактерий с использованием анализа проточной цитометрии, описанного выше. Кратное изменение относительно фона рассчитывали путем деления средней интенсивности флуоресценции, полученной в присутствии 20 мкМ примеров, на среднюю интенсивность флуоресценции, полученную в отсутствие примеров. Сдвиг интенсивности флуоресценции (PE) происходит из-за рекрутинга СЗб к поверхности бактерий.

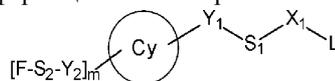
Таблица 4

Пример №	Рекрутинг СЗб при 10 мкМ (среднее кратное изменение по сравнению с носителем)	Количество испытаний (n)
4	95	n =4
5	17	n =2
6	170	n =4
7	4	n =2
9	44	n =4
15	6	n=2
16	47	n=4
17	93	n=4
18	49	n=4
19	59	n=4
20	14	n=4
21	17	n=4
22	16	n=4
23	5	n=2
24	105	n=2
25	113	n=2

Фиг. 3 демонстрирует рекрутинг СЗб из человеческой сыворотки к поверхности E.coli в присутствии примера 4 (фиг. 3А), примера 5 (фиг. 3В), примера 6 (фиг. 3С) примера 7 (фиг. 3D) и примера 9 (фиг. 3Е) при 20 мкМ. Сдвиг интенсивности флуоресценции (PE) происходит из-за рекрутинга СЗб из сыворотки к поверхности бактерий.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль



(I)

где

L представляет собой полимиксин;

S₁ представляет собой связь или спейсер, выбранный из -(CH₂)_a- или -(CH₂)_b-(CH₂-CH₂-O)_c-(CH₂)_d- группы, где от одной до пяти указанных -CH₂- групп необязательно могут быть замещены -C(O)NH- или -NHC(O)- группой;

a представляет собой целое число, выбранное из 1-40;

b представляет собой целое число, выбранное из 0-25;

c представляет собой целое число, выбранное из 1-20;

d представляет собой целое число, выбранное из 1-15;

S₂ представляет собой спейсер, выбранный из -(CH₂)_e- или -(CH₂)_f-(CH₂-CH₂-O)_g-(CH₂)_h- группы, где от одной до трех указанных -CH₂- групп необязательно могут быть замещены -C(O)NH- или -NHC(O)- группой;

e представляет собой целое число, выбранное из 1-20;

f представляет собой целое число, выбранное из 1-10;

g представляет собой целое число, выбранное из 1-15;

h представляет собой целое число, выбранное из 1-5;

X_1 представляет собой связь или $-C(O)-$;

Y_1 и Y_2 независимо представляют собой связь, $-O-$, $-S-$, $-NH-$, $-C(O)-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NH-$ группу;

F представляет собой молекулу углевода, выбранную из галактозил-альфа-1,3-галактозил-бета-1,4-N-ацетилглюкозамина, альфа1-3 галактобиозы, альфа1-3-бета1-4-галактоотриозы или галилипентасахарида;

m представляет собой целое число, выбранное из 1-5; и

S_u представляет собой фенил, бифенил или трифенил, таким образом, что, когда S_u представляет собой бифенил или трифенил, указанная $-Y_1-S_1-X_1-L$ группа может присутствовать на любом из указанных фенильных колец и указанная $[F-S_2-Y_2]_m$ - группа или группы могут присутствовать на любом из указанных фенильных колец.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где S_1 представляет собой связь или спейсер, выбранный из

$-(CH_2)_a-$, где одна или пять из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-C(O)NH-$ группой; или

$-(CH_2)_b-(CH_2-CH_2-O)_c-(CH_2)_d-$, где две из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-C(O)NH-$ группой.

3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где S_1 представляет собой спейсер, выбранный из

$-(CH_2)_a-$, где одна из указанных $-CH_2-$ групп замещена $-C(O)NH-$ группой; или

$-(CH_2)_b-(CH_2-CH_2-O)_c-(CH_2)_d-$.

4. Соединение по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где a представляет собой целое число, выбранное из 10-35.

5. Соединение по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, где b представляет собой целое число, выбранное из 0-24.

6. Соединение по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемая соль, где c представляет собой целое число, выбранное из 1-10.

7. Соединение по любому из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемая соль, где d представляет собой целое число, выбранное из 1 или 2.

8. Соединение по любому из пп.1-7 или его фармацевтически приемлемая соль, где Y_1 представляет собой $-C(O)NH-$ или $-C(O)-$; или $-C(O)NH-$.

9. Соединение по любому из пп.1-8 или его фармацевтически приемлемая соль, где S_2 представляет собой спейсер, выбранный из

$-(CH_2)_e-$, где одна или три из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-NHC(O)-$ группой; или

$-(CH_2)_f-(CH_2-CH_2-O)_g-(CH_2)_h-$, где две из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-NHC(O)-$ группой.

10. Соединение по любому из пп.1-8 или его фармацевтически приемлемая соль, где S_2 представляет собой спейсер, выбранный из $-(CH_2)_e-$, где три из указанных $-CH_2-$ групп необязательно замещены $-NHC(O)-$ группой.

11. Соединение по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемая соль, где e представляет собой целое число, выбранное из 5-17.

12. Соединение по любому из пп.1-11 или его фармацевтически приемлемая соль, где f представляет собой целое число, выбранное из 2-6.

13. Соединение по любому из пп.1-12 или его фармацевтически приемлемая соль, где g представляет собой целое число, выбранное из 1-4.

14. Соединение по любому из пп.1-13 или его фармацевтически приемлемая соль, где h представляет собой целое число, выбранное из 1-4.

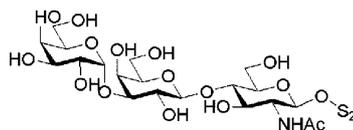
15. Соединение по любому из пп.1-14 или его фармацевтически приемлемая соль, где X_1 представляет собой $-C(O)-$.

16. Соединение по любому из пп.1-15 или его фармацевтически приемлемая соль, где Y_2 представляет собой $-O-$.

17. Соединение по любому из пп.1-16 или его фармацевтически приемлемая соль, где m представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3.

18. Соединение по любому из пп.1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, где S_u представляет собой фенил или бифенил.

19. Соединение по любому из пп.1-18 или его фармацевтически приемлемая соль, где F имеет структуру, показанную в следующей формуле:

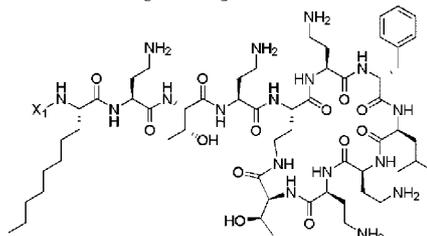


где S₂ обозначает точку присоединения к S₂ группе.

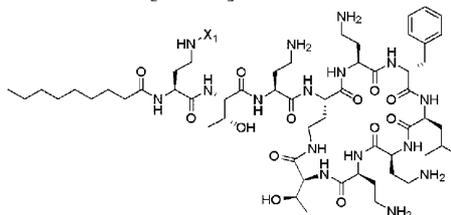
20. Соединение по любому из пп.1-19 или его фармацевтически приемлемая соль, где полимиксин выбран из Полимиксина В, Полимиксина В₂, Полимиксин Нонапептида, Колистина А, Колистина В, СВ-182,204 (Cubist Pharmaceuticals), 5a (Pfizer), 5× (Pfizer), СА 14 (Cantab Anti-Infectives), СА824 (Cantab Anti-Infectives), NAB739 (Northern Antibiotics), NAB741 (Northern Antibiotics), NAB7061 (Northern Antibiotics), 38 (University of Queensland), FADDI-002 (Monash University) и FADDI-100 (Monash University).

21. Соединение по любому из пп.1-19 или его фармацевтически приемлемая соль, где полимиксин выбран из одной из следующих структур:

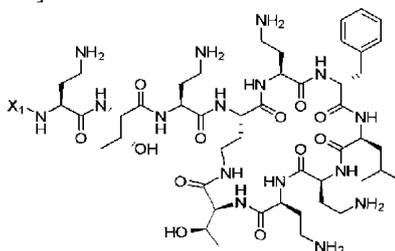
H₂N-[L-ОктилGly]-Dab-Thr-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*



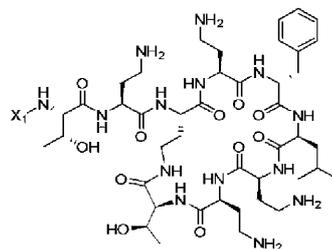
Нонанамид-Dab (NH₂) -Thr-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*



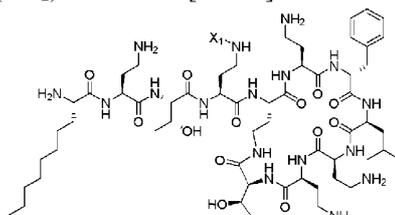
H₂N-Dab-Thr-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*



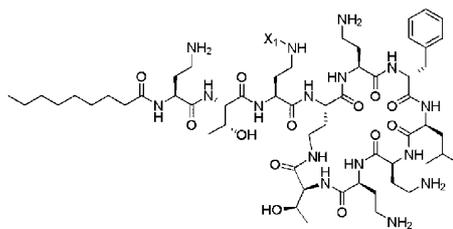
H₂N-Thr-Dab-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*



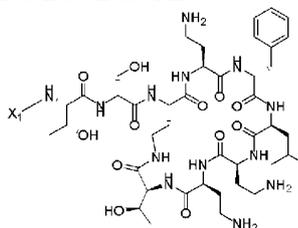
H₂N-[L-ОктилGly]-Dab-Thr-Dab(NH₂)-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*



Нонанамид-Dab-Thr-Dab(NH₂) -Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*

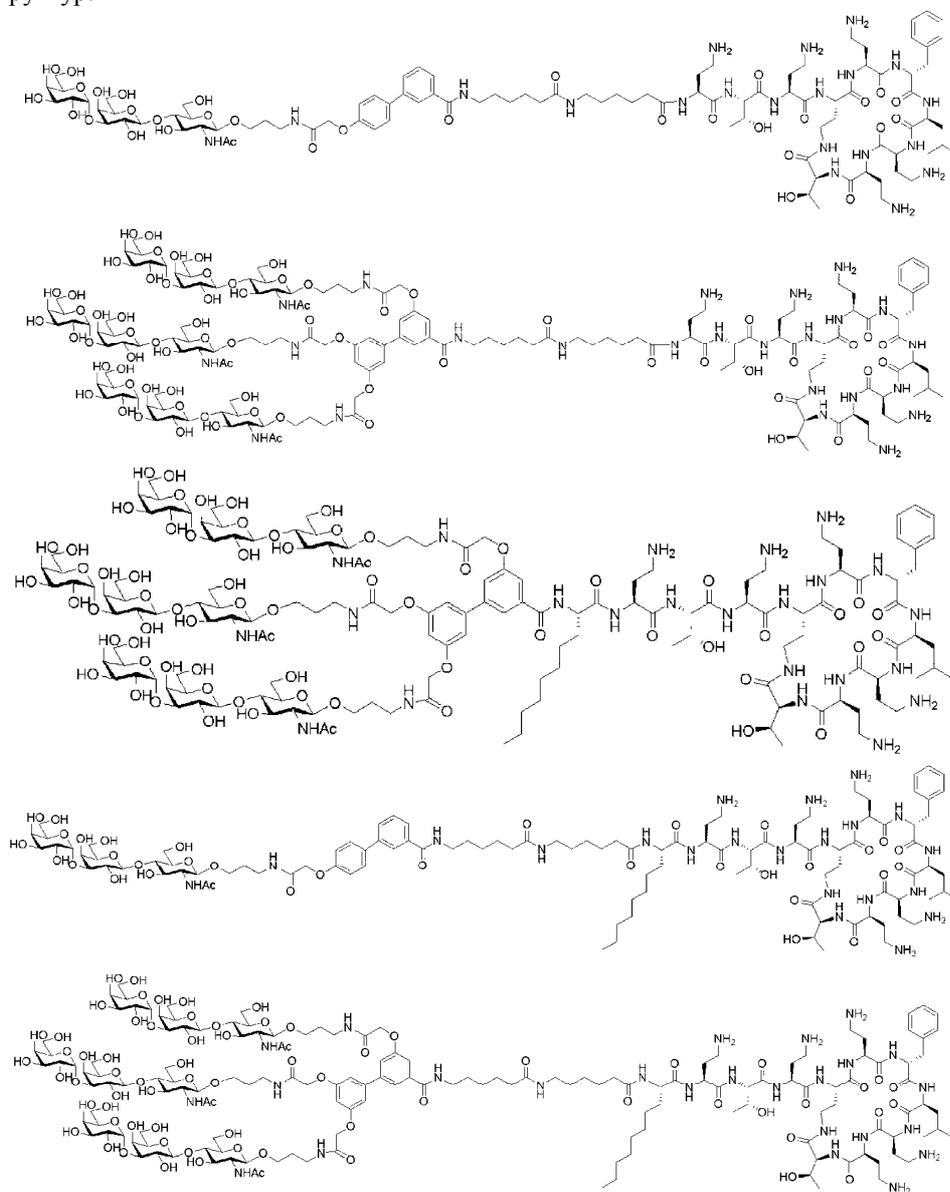


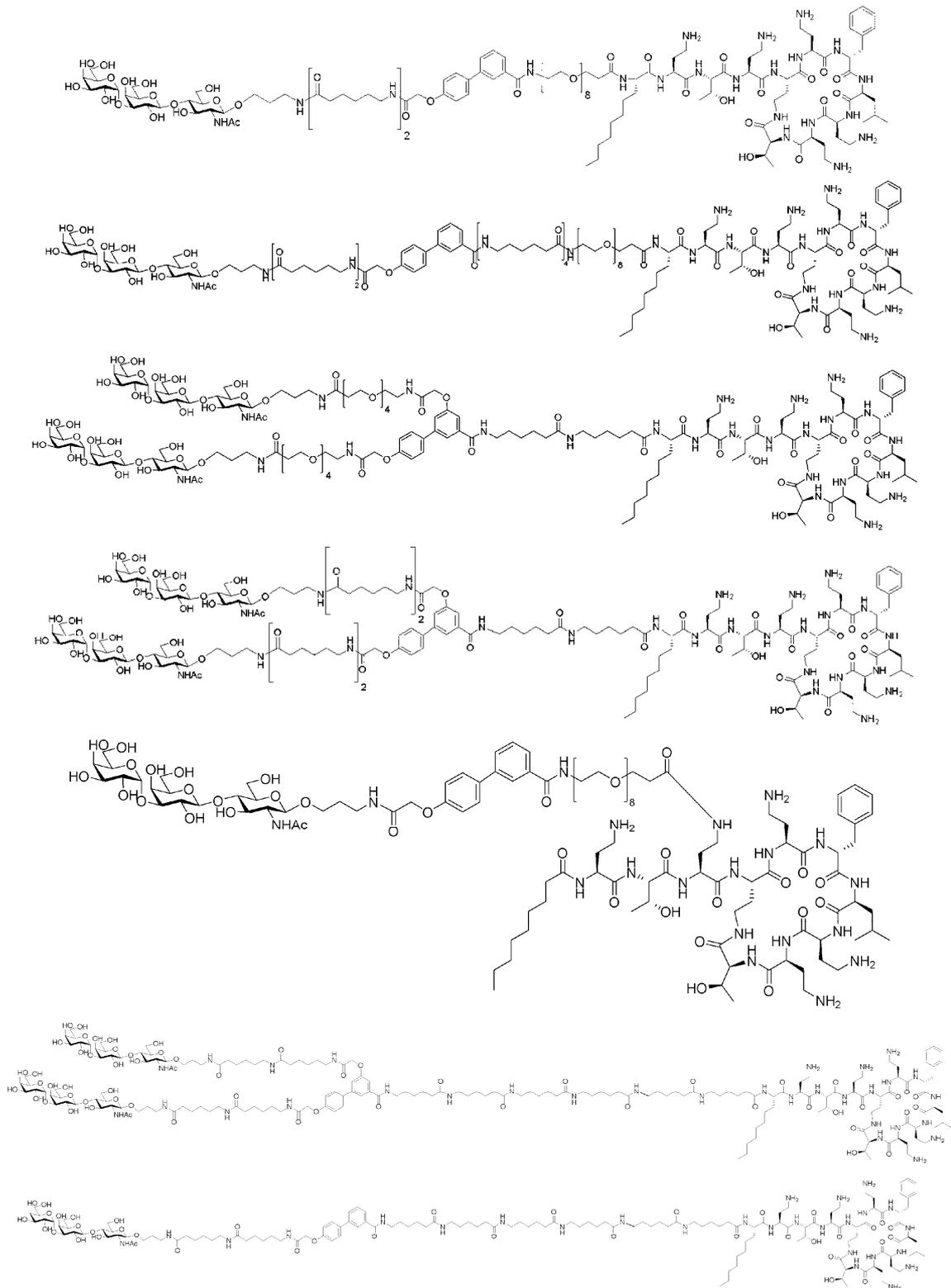
H₂N-Thr-[D-Ser]-Dab*-Dab-[D-Phe]-Leu-Dab-Dab-Thr*



где X₁ обозначает точку присоединения к X₁ группе.

22. Соединение по п.1, или его фармацевтически приемлемая соль, которое выбрано из одной из следующих структур:





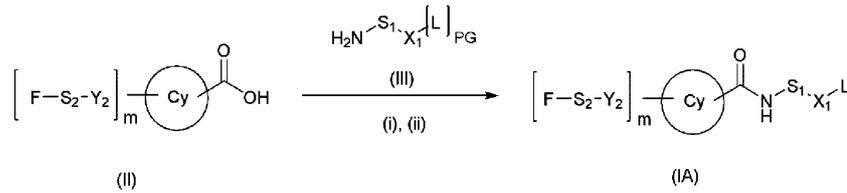
23. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или расстройства, опосредованного и/или вызванного инфекционным агентом, включающая соединение по любому из пп.1-22 или его фармацевтически приемлемую соль.

24. Применение соединения по любому из пп.1-22 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения заболевания или расстройства, опосредованного и/или вызванного инфекционным агентом.

25. Применение соединения формулы (I) по любому из пп.1-22 или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, опосредованного и/или вызванного инфекционным агентом.

26. Способ получения соединения формулы (I) по п.1, которое представляет собой соединение формулы (IA), путем взаимодействия соединения формулы (II) с соединением формулы (III) с последующей

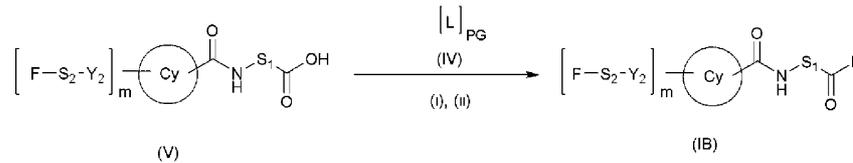
стадий снятия защиты



где S_2 , Y_2 , m , Cy , S_1 , X_1 , L и F имеют значения, определенные в п.1, и PG представляет собой подходящую пептид-защитную группу;

где стадия (i) включает реакцию образования амидной связи и стадия (ii) включает реакцию удаления защитных групп.

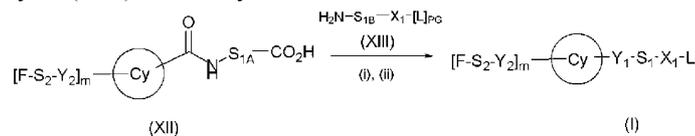
27. Способ получения соединения формулы (I) по п.1, которое представляет собой соединение формулы (IB), путем взаимодействия соединения формулы (IV) с соединением формулы (V) с последующей стадией снятия защиты



где S_2 , Y_2 , m , Cy , S_1 , L и F имеют значения, определенные в п.1, и

PG представляет собой подходящую пептид-защитную группу; где стадия (i) включает реакцию образования амидной связи и стадия (ii) включает реакцию удаления защитных групп.

28. Способ получения соединения формулы (I) по п.1 путем взаимодействия соединения формулы (XII) с соединением формулы (XIII) с последующей стадией снятия защиты

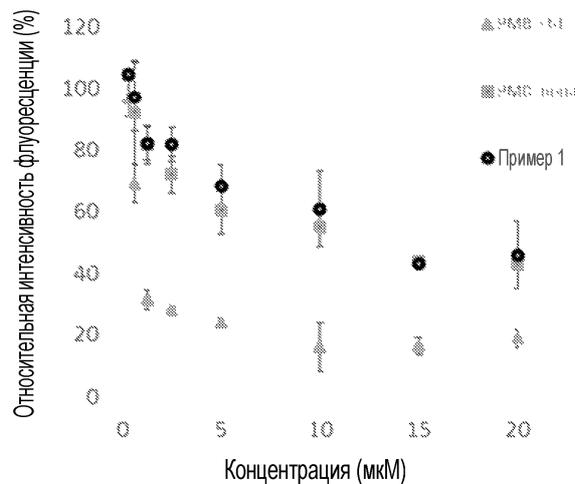


где S_2 , Y_2 , m , Cy , X_1 , L и F имеют значения, определенные выше, S_{1A} и S_{1B} вместе образуют S_1 группу и PG представляет собой подходящую пептид-защитную группу;

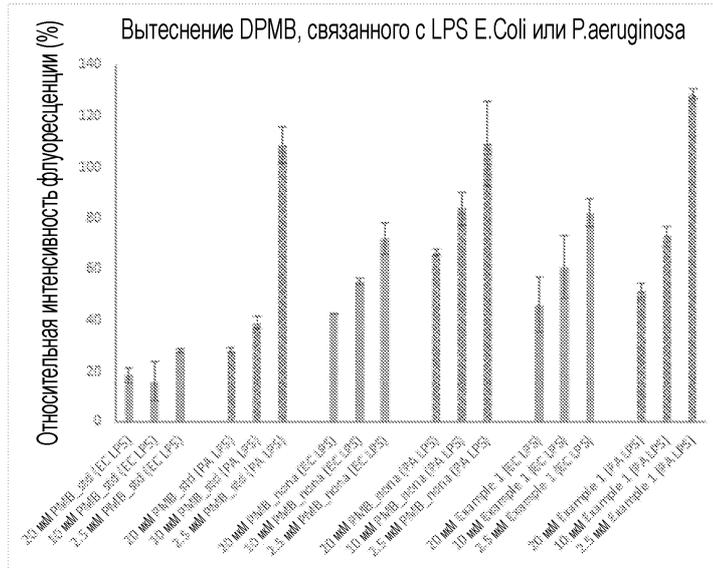
где стадия (i) включает реакцию образования амидной связи и стадия (ii) включает реакцию удаления защитных групп.

29. Способ по любому одному из пп.26-28, где подходящая пептид-защитная группа представляет собой (1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-этил).

Вытеснение DPMB, связанного с LPS E.Coli

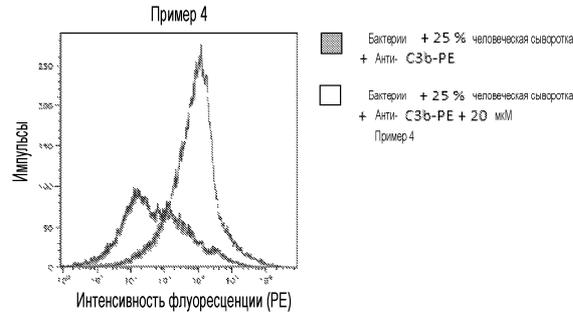


Фиг. 1

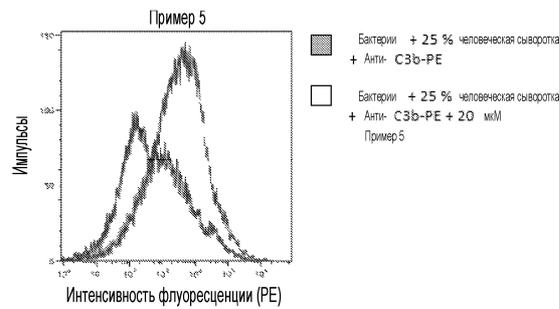


Фиг. 2

A

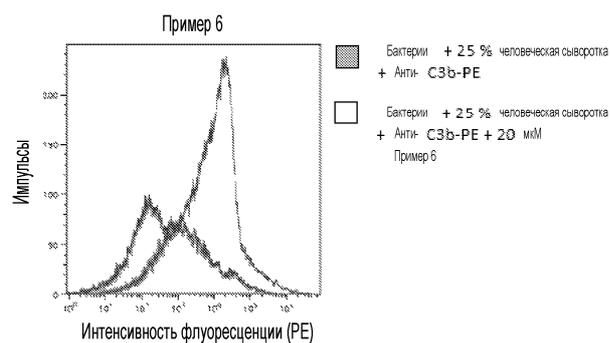


B

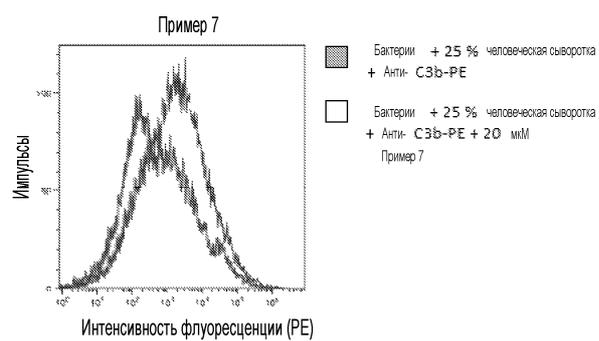


Фиг. 3

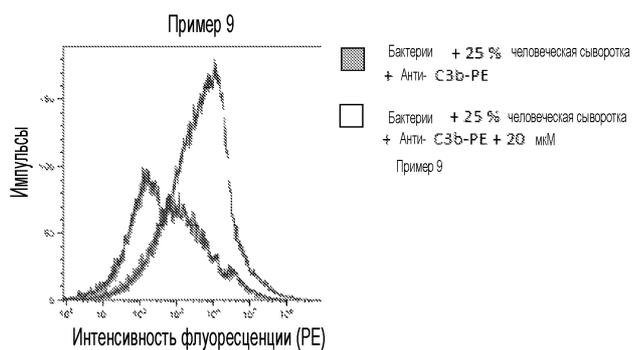
С



D



E



Фиг. 3 (продолжение)

