

COMPUESTOS

Solicitud relacionada

5 El presente caso reivindica beneficio y la prioridad del documento US 62/689602 presentado el 25 de junio de 2018 (25.06.2018), cuyo contenido se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de polimixina, composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, y el uso de los compuestos y las composiciones
15 farmacéuticas para tratamiento médico, por ejemplo, tratamiento de infecciones microbianas, particularmente infecciones por bacterias gramnegativas.

Antecedentes

20 Los documentos WO 2013/072695 y WO 2014/188178 describen derivados de polimixina en los que el resto de acilo graso N-terminal y el resto de ácido diaminobutírico adyacente de Polimixina B o Colistina se reemplazan por un grupo terminal
25 que tiene un sustituyente amino. Dichos derivados tienen buena actividad antibacteriana mientras que tienen una citotoxicidad reducida.

El documento WO 2015/135976 también describe derivados de
30 polimixina en los que, de nuevo, el resto de acilo graso N-terminal y el ácido diaminobutírico adyacente de la Polimixina B o Colistina se reemplazan por un grupo terminal que tiene un sustituyente amino. En este caso, se demostró que la posición

específica del sustituyente amino y la colocación de otros sustituyentes en el resto N-terminal son importantes para una fuerte actividad antimicrobiana en un rango de patógenos clave, tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,
5 *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Los compuestos descritos también conservaron una baja citotoxicidad.

El documento WO 2016/083531 también describe derivados de
10 polimixina en los que, de nuevo, el resto de acilo graso N-terminal y el ácido diaminobutírico adyacente de la Polimixina B o Colistina se reemplazan por un grupo terminal que tiene un sustituyente amino, tal como los grupos presentes en los documentos WO 2013/072695, WO 2014/188178 y WO 2015/135976.
15 Además, el residuo de aminoácido en las posiciones 6 y/o 7 está sustituido con respecto a la Polimixina B y la Colistina.

Para ser más útiles para la terapia parenteral de infecciones sistémicas que las polimixinas disponibles
20 actualmente, los nuevos derivados de polimixina deben al menos igualar la actividad de estas polimixinas conocidas, mientras que tienen una toxicidad renal significativamente menor *in vivo*.

25 **Sumario de la invención**

En un aspecto general, la invención proporciona compuestos que tienen un núcleo de polimixina desacilado, tal como un núcleo nonapéptido de Polimixina B o Colistina con el residuo
30 aminoacídico en la posición 3 sustituido con Dap, que tiene un grupo un grupo -X-R¹⁵, como se define en el presente documento, en su extremo N terminal. Dichos compuestos encuentran uso en

un método de tratamiento o profilaxis, opcionalmente en combinación con un segundo agente activo. Los compuestos pueden usarse para tratar una infección microbiana, tal como una infección bacteriana gramnegativa.

5

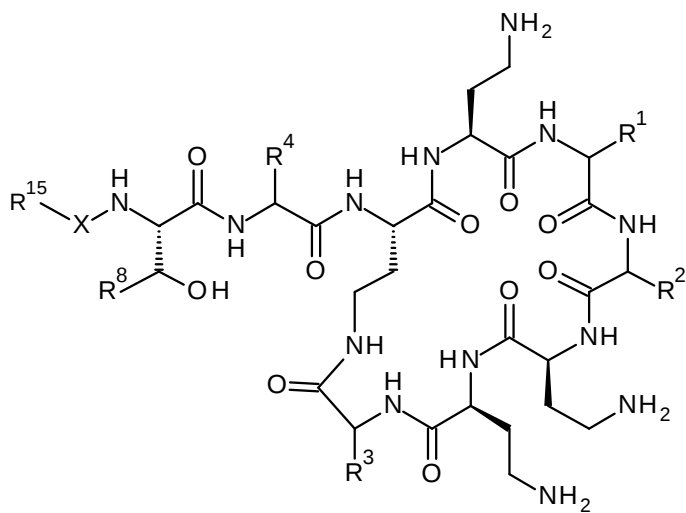
Se muestra que los compuestos de la presente invención tienen una baja citotoxicidad equilibrada con niveles aceptables de fármaco en el riñón después de la dosificación parenteral. Se ha demostrado que los compuestos de la presente invención son superiores tanto a la Polimixina B, como a los compuestos de polimixina modificada conocidos en la técnica, incluidos los descritos previamente por el presente solicitante. Esta superioridad se manifiesta en una o más de las siguientes características: menor citotoxicidad, niveles aceptables de fármaco en el riñón (es decir, una toxicidad renal aceptable, que es resultado de que los niveles de fármaco en el riñón no son altos) después de la dosificación parenteral, eficacia en modelos de muslo y pulmón de ratón, y/o una MIC superior contra cepas bacterianas patógenas, mientras que son equivalentes a los compuestos de la técnica anterior en las demás.

Típicamente, los compuestos conocidos en la técnica exhiben una, o quizás dos de estas características ventajosas, pero no todas. Por ejemplo, ahora es relativamente común encontrar compuestos de polimixina que tengan menor citotoxicidad, pero esta menor citotoxicidad suele ir acompañada de una reducción en la actividad antibacteriana. Adicionalmente, los compuestos que tienen una citotoxicidad inferior pueden, sin embargo, encontrarse dentro del riñón en niveles altos después de la dosificación. Dichos compuestos son, por lo tanto, aún tóxicos, y no son útiles en los métodos

de tratamiento médico.

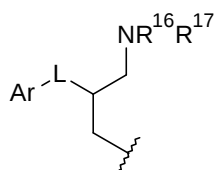
En un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I), y sales, solvatos, formas protegidas
5 y formas de profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo.

El compuesto de fórmula (I) se representa de este modo:



en la que:

- X- representa -C(O)-;
- 10 -R¹ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de fenilalanina, leucina, norleucina, valina o norvalina;
- R² es alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo;
- 15 -R³ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de treonina;
- R⁴ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es Dap, tal como L-Dap;
- R⁸ es hidrógeno o metilo; y
- 20 -R¹⁵ es un grupo:

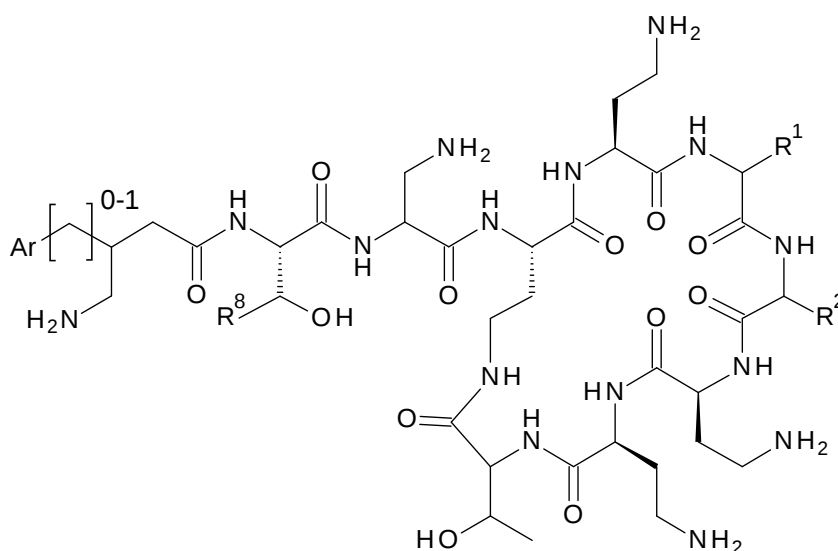


en el que:

-R¹⁶ es hidrógeno;

-Ar es arilo opcionalmente sustituido, tal como fenilo sustituido.

5 El compuesto de fórmula (I) también puede representarse de este modo:



donde $-R^1$, $-R^2$, $-R^8$ y $-Ar$ tienen los mismos significados que anteriormente,

10 y sales, solvatos, formas protegidas y formas de
profármacos farmacéuticamente aceptables del mismo.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I),
15 opcionalmente junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto más se proporciona un compuesto de fórmula (I), o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), para su uso en un método de tratamiento o profilaxis.

En aún un aspecto adicional se proporciona un compuesto de fórmula (I), o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), para su uso en un método para

tratar una infección microbiana.

La presente invención también proporciona un método de tratamiento, comprendiendo el método la etapa de administrar
5 un compuesto de fórmula (I), o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), a un sujeto que lo necesite. El método puede ser para el tratamiento de una infección microbiana.

10 Una infección microbiana puede ser una infección bacteriana, tal como una infección bacteriana gramnegativa. La infección bacteriana gramnegativa puede seleccionarse del grupo que consiste en *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter*
15 spp., y otras Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas*, y *Legionella*.

La presente invención también proporciona métodos para la preparación de compuestos de fórmula (I), así como compuestos
20 intermedios para su uso en la preparación de los compuestos de fórmula (I).

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación.

25

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona compuestos de fórmula (I), incluyendo los compuestos de fórmula (II) y (III) como se
30 describe en más detalle a continuación, para su uso en tratamiento médico, opcionalmente junto con un segundo agente activo.

En términos generales, los compuestos de fórmula (I), (II) y (III) tienen un núcleo de polimixina, que es un núcleo nonapeptídico, y un grupo -X-R¹⁵ en el extremo N-terminal del núcleo de polimixina. El grupo -R¹⁵ es un grupo γ -aminopropilo sustituido. El grupo γ -aminopropilo está sustituido en la posición β con respecto al resto -X- con un grupo arilo o aralquilo opcionalmente sustituido.

El primer residuo de aminoácidos en la cadena exocíclica de los compuestos de la invención, correspondiente a la posición 3 en polimixina, es un residuo Dap (ácido diaminopropiónico), tal como L-Dap, en lugar de un residuo L-Dab (ácido L-diaminobutírico), como está presente en Polimixina B y Colistina.

Los residuos de aminoácidos en las posiciones 6 y 7 del compuesto de polimixina (siguiendo la numeración utilizada para la polimixina) pueden corresponder a los residuos de aminoácidos presentes en la Polimixina B y la Colistina. Los residuos de aminoácidos en las posiciones 6 y/o 7 pueden estar sustituidos con diferentes residuos de aminoácidos a los presentes en la Polimixina B y la Colistina.

Para ser más útil para la terapia parenteral de infecciones sistémicas que las series conocidas actualmente de compuestos de polimixina, los nuevos derivados de polimixina deben al menos igualar la actividad antibacteriana de los compuestos de polimixina conocidos, mientras que tienen una toxicidad renal significativamente menor *in vivo*.

Se ha encontrado ahora que no es suficiente que un compuesto de polimixina exhiba una citotoxicidad más baja, ya

que tal no se asocia frecuentemente con una toxicidad reducida *in vivo*. Por lo tanto, la acumulación del fármaco en el riñón y su eliminación a partir de allí también debe ser favorable. En otras palabras, la combinación de la citotoxicidad y los

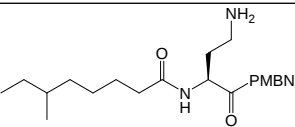
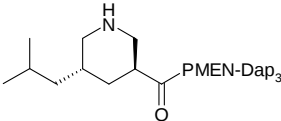
5 niveles de fármacos en el riñón después de la dosificación parenteral es lo que conduce a un perfil de toxicidad *in vivo* favorable.

Esto se puede mostrar a través de las comparaciones de

10 ejemplo que se muestran en la Tabla A a continuación, donde PMBN se refiere al núcleo nonapeptídico de la Polimixina B, y PMEN se refiere al núcleo nonapeptídico de la Polimixina E, con las sustituciones de los residuos de aminoácidos en las

15 mostrada, cuando sea apropiado (por ejemplo, reemplazando Dap a Dab en la posición 3, y reemplazando ciclohexilalanina (CHA) a fenilalanina en la posición 6).

Tabla A

Compuesto	Estructura	Citotoxicidad	Nivel de fármaco en el riñón		Toxicidad renal*
			4 h	16 h	
Polimixina B		1,0	128	18	++
Ejemplo de referencia D77 W0 2015/13597 6		23**	516	264	++++

función del valor para PMB en el mismo experimento. El valor medio fue 23

*** En el documento WO 2016/083531 se cita una CI_{50} de 255 $\mu\text{g/ml}$ para este compuesto (Ejemplo 38) en comparación con 12 $\mu\text{g/ml}$ para Polimixina B. Sin embargo, la cifra de PMB utilizada en esa aplicación fue un valor mediano de múltiples experimentos. La cifra de 9,2 citada aquí es en comparación con el valor de CI_{50} para PMB determinado en el mismo experimento

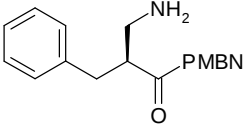
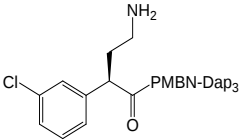
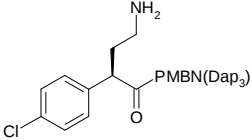
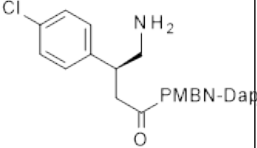
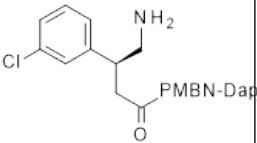
El presente solicitante ha divulgado previamente en el documento WO 2015/135976 nonapéptidos de polimixina con un grupo γ -aminopropilo N-terminal sustituido con un resto fenilo o bencilo. Sin embargo, el sustituyente fenilo o bencilo se proporciona en la posición α , en lugar de la posición β , en relación con el grupo -X-. El documento WO 2015/135976 también describe un nonapéptido de polimixina con un grupo β -aminoetilo N-terminal sustituido en la posición α con un grupo bencilo. En este caso, la funcionalidad amino se proporciona en la posición β en lugar de la posición γ , en relación con el grupo -X-.

Si bien estos compuestos conocidos muestran una actividad prometedora y una citotoxicidad moderadamente mejorada en comparación con la Polimixina B, estos compuestos son inferiores a los compuestos de la presente invención, ya que no muestran una combinación de baja citotoxicidad en conjunto con la equilibrada con niveles renales aceptables después de la dosificación.

Esto se muestra a través de las comparaciones de ejemplo

que se muestran en la Tabla B a continuación, donde PMBN se refiere al núcleo nonapeptídico de Polimixina B, con las sustituciones al residuo de aminoácidos en las posiciones 3, cuando sea apropiado (por ejemplo, Dap reemplaza Dab en la 5 posición 3).

Tabla B

Compuesto	Estructura	Citotoxicidad	Nivel de fármaco en el riñón (µg/g de riñón, 4 h)	Nivel en el riñón en 4 h/citotoxicidad rel.
Compuesto de referencia D6 W0 2015/13597 6		4, 4*	235	53
Compuesto de referencia **		5, 1	589	115
Compuesto de referencia **		4, 8	533	111
Ejemplo 1		8, 8	268	30
Ejemplo 5		11, 6	170	15

* Este compuesto es el ejemplo D6 en el documento W0

2015/135976. La cifra citada aquí para la citotoxicidad relativa fue de 3,7. Esta cifra es la media de dos determinaciones repetidas.

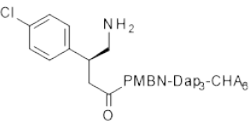
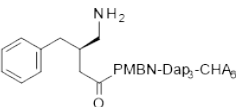
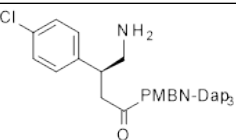
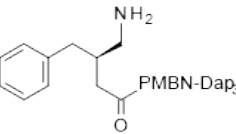
5 ** Los compuestos de estos Ejemplos de referencia pueden prepararse de acuerdo con los métodos descritos en el documento W0 2015/135976, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

10 El presente solicitante ha divulgado previamente en el documento W0 2016/083531 nonapéptidos de polimixina con grupos N-terminales modificados, particularmente aquellos que incluyen grupos β -arilo o β -aralquilo. Sin embargo, estos compuestos conocidos tienen un residuo de aminoácido lipófilo
15 en la posición 6, tal como un residuo de ciclohexilalanina, mientras que los compuestos del presente caso tienen, por ejemplo, un residuo de fenilalanina, leucina, norleucina, valina o norvalina en la posición 6. Estos compuestos de nuevo son inferiores a los compuestos de la presente invención en
20 vista de la mala combinación de citotoxicidad y niveles de fármaco en el riñón después de la dosificación.

 Esto se muestra a través de las comparaciones de ejemplo que se muestran en la Tabla C a continuación, donde PMBN se
25 refiere al núcleo nonapeptídico de Polimixina B, con las sustituciones de los residuos de aminoácidos en las posiciones 3 y 6 mostradas, cuando sea apropiado (por ejemplo, reemplazando Dap a Dab en la posición 3, y reemplazando ciclohexilalanina (CHA) a fenilalanina en la posición 6).

30

Tabla C

Compuesto	Estructura	Citotoxicidad	Nivel de fármaco en el riñón (µg/g de riñón, 4 h)	Nivel en el riñón en 4 h/citotoxicidad rel.
Compuesto de referencia 50 Documento WO 2016/083531		7,4	463	63
Compuesto de referencia 58 WO 2016/083531		5,2	212	32
Ejemplo 1		8,8	268	30
Ejemplo 9		12,0	159	13

Los compuestos 50 y 58 se conocen a partir del documento WO 2016/083531, y estos son los compuestos identificados como *Isómero 1* en ese caso.

5

Compuestos de polimixina

Los compuestos de fórmula (I) son derivados N-terminales de la serie de nonapéptidos de polimixina de los compuestos.

10

El núcleo del compuesto de fórmula (I) es un derivado de un

nonapéptido, tal como el nonapéptido de Polimixina B (PMBN, Polimixina B 2-10), donde el residuo de aminoácidos en la posición 3 está sustituido con Dap. Opcionalmente los residuos de aminoácidos en las posiciones 6 y/o la posición 7 están
5 sustituidos con otro aminoácido, tal como se describe en el presente documento. Los compuestos de fórmula (I) tienen un grupo $-X-R^{15}$ en el extremo N terminal del núcleo de polimixina. Esto se describe con detalle a continuación.

10 $-R^1$

El grupo $-R^1$, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 6 en la serie de polimixina de los
15 compuestos.

El residuo de aminoácidos en la posición 6 puede ser el mismo que el residuo de aminoácidos en la posición 6 de Polimixina B. Es decir, R^1 junto con el grupo carbonilo y
20 nitrógeno alfa al carbono al que está unido puede ser un residuo de D-fenilalanina.

El residuo de aminoácidos en la posición 6 puede ser el mismo que el residuo de aminoácidos en la posición 6 de
25 Colistina. Es decir, R^1 junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido puede ser un residuo de D-leucina.

En una realización, $-R^1$ junto con el grupo carbonilo y
30 nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de fenilalanina, leucina, norleucina, valina o norvalina. El residuo de aminoácidos puede ser la forma D.

En una realización, $-R^1$ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de aminoácidos, tal como un residuo de fenilalanina, leucina o norleucina. El residuo de aminoácidos puede ser la forma D.

5

En una realización, $-R^1$ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido es un residuo de fenilalanina, por ejemplo, un residuo de D-fenilalanina, o un residuo de leucina, tal como un residuo de D-leucina.

10

La sustitución del residuo de aminoácidos en la posición 6 se conoce a partir de, por ejemplo, el documento WO 2016/083531.

15 $-R^2$

El grupo $-R^2$, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 7 en la serie de polimixina de los compuestos.

20

El grupo $-R^2$ es alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo.

25 En una realización, $-R^2$ es alquilo C_{1-4} . Este grupo no está sustituido.

En una realización, $-R^2$ es alquilo C_{3-4} , tal como alquilo C_4 , opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo, tal como sin sustituir.

30

El residuo aminoacídico del grupo en la posición 7 puede

ser el mismo que el residuo de aminoácidos en la posición 7 de Polimixina B y Colistina. Es decir, R^2 junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido puede ser un residuo de L-Leu.

5

En una realización, $-R^2$ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de leucina, iso-leucina, fenilalanina, treonina, valina, nor-valina, alanina, treonina o aminobutirato. El residuo de aminoácidos puede estar en la forma L-.

En una realización, $-R^2$ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de leucina, aminobutirato, o treonina. El residuo de aminoácidos puede estar en la forma L-.

En otras realizaciones el residuo de aminoácidos en la posición 7 puede estar sustituido con otro residuo de aminoácidos con respecto a Polimixina B y Colistina.

20

En una realización, $-R^2$ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido es un residuo de leucina, treonina o ácido aminobutírico (Abu), tal como L-leucina, L-treonina o L-Abu.

25

La sustitución del residuo de aminoácidos en la posición 7 se describe en, por ejemplo, el documento WO 2016/083531 y Velkov *et al.*, entre otros.

30 $-R^3$

El grupo $-R^3$, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno

alfa al carbono al que está unido, corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 10 en la serie de polimixina de los compuestos.

5 El grupo $-R^3$, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es treonina, tal como L-treonina.

$-R^4$

10 El grupo $-R^4$, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 3 en la serie de polimixina de los compuestos.

15

En los compuestos de la invención, el residuo de aminoácidos en la posición 3 no es L-Dab, que es el residuo de aminoácidos en la posición 3 de Polimixina B y Colistina. En los compuestos de la invención, $-R^4$ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es Dap, tal como L-Dap.

Los compuestos donde $-R^4$ es una cadena lateral Dap, tal como L-Dap, pueden prepararse usando los métodos descritos en el documento WO 2015/135976.

En los compuestos de fórmula (I), el grupo amino dentro de la cadena lateral Dap puede estar protegido, por ejemplo, el grupo amino puede estar protegido con Boc.

30

$-R^8$

El grupo $-R^8$, junto con el grupo carbonilo y el nitrógeno

beta al carbono al que está unido a través de un espaciador de hidroximetileno (-CH(OH)-), corresponde al residuo de aminoácidos en la posición 2 en la serie de polimixina de los compuestos.

5

El residuo de aminoácidos en la posición 2 puede ser el mismo que el residuo de aminoácidos en la posición 2 de Polimixina B y Colistina. Es decir, R¹ junto con el grupo carbonilo y el nitrógeno beta al carbono al que está unido a través de un espaciador de hidroximetileno puede ser un residuo de L-Treonina.

El residuo de aminoácidos que incluye el grupo -R⁸ corresponde a la posición 2 en la serie de polimixina de los compuestos.

En una realización, -R⁸ es metilo. Por lo tanto, el aminoácido resultante es Thr.

En una realización, -R⁸ es H. Por lo tanto, el aminoácido resultante es Ser.

Típicamente, -R⁸ es metilo.

25 -X-

El grupo -X- es -C(O)-*.

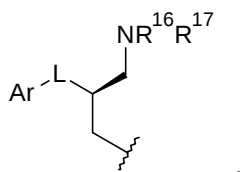
El asterisco indica el punto de unión a NH, el terminal amino del núcleo nonapeptídico de polimixina, tal como el aminoácido en la posición 2. El lado izquierdo del grupo -X- es el punto de unión a -R¹⁵.

-R¹⁵

El grupo -R¹⁵, junto con -X-, es una modificación del extremo N-terminal del núcleo de polimixina.

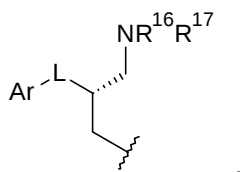
Los compuestos de la invención contienen un estereocentro
5 en la posición β del grupo γ -aminopropilo en el resto N-terminal, -R¹⁵. Se ha encontrado que uno de los estereoisómeros está asociado con una menor citotoxicidad y menores niveles de fármacos en el riñón. Este estereoisómero es el estereoisómero que se eluye más rápidamente en la cromatografía de fase
10 inversa, como se describe en detalle en los ejemplos trabajados del presente caso.

En una realización, el grupo -R¹⁵ es:



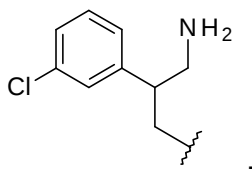
15 Esta estereoforma es la estereoforma de elución más rápida en la cromatografía de fase inversa.

Como alternativa, el grupo -R¹⁵ puede ser:

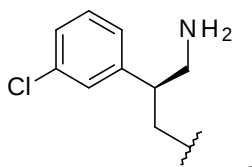


Esta estereoforma es la estereoforma de elución más lenta.

20 En una realización, el grupo -R¹⁵ es:



En una realización, el grupo -R¹⁵ es:



Los grupos ejemplares en -R¹⁵ se exponen a continuación.

-R¹⁶ y -R¹⁷

5 Los grupos -R¹⁶ y -R¹⁷ son los dos hidrógeno.

En los compuestos de fórmula (I), el grupo -NR¹⁶R¹⁷ puede estar desprotegido, por ejemplo, el grupo -NR¹⁶R¹⁷ puede estar Boc-protegido.

10

-L-

El grupo puede ser un enlace covalente metileno (-CH₂-).

Típicamente, -L- es un enlace covalente.

15

-Ar

El grupo -Ar es un grupo arilo, tal como un grupo carboarilo o heteroarilo. El grupo arilo está opcionalmente
20 sustituido.

El grupo arilo puede ser un grupo arilo C₆, tal como fenilo, o un grupo arilo C₅, tal como tiofeno.

25 El grupo -Ar puede ser fenilo, y está opcionalmente sustituido, tal como sustituido. En una realización, -Ar es fenilo sin sustituir.

El grupo arilo puede estar sustituido, tal como con uno o
30 más grupos -R^s. Cada grupo -R^s se selecciona independientemente de halo, alquilo, haloalquilo y arilo, tales como halo y alquilo.

Un grupo arilo puede estar sustituido con uno, dos o tres grupos $-R^S$, tal como uno o dos grupos, tal como un grupo (monosustituido).

- 5 Un grupo halo puede seleccionarse de flúor, cloro, bromo y yodo, y puede seleccionarse de flúor y cloro, tal como cloro.

Un grupo halo puede ser cloro.

- 10 Un grupo alquilo puede ser alquilo C_{1-6} , tal como alquilo C_{1-4} , tal como alquilo C_{1-3} , tal como alquilo C_3 .

Un grupo alquilo puede seleccionarse de metilo, etilo, y propilo, incluyendo *n*-propilo e *i*-propilo.

15

Un grupo alquilo puede ser *i*-propilo.

- Un grupo haloalquilo puede ser un grupo alquilo C_{1-6} , tal como alquilo C_{1-4} , tal como alquilo C_{1-2} , sustituido con uno o
20 más grupos halo. El grupo alquilo puede estar persustituido con halo, tal como persustituido con flúor.

Un grupo haloalquilo puede ser trifluorometilo.

- 25 Cuando $-R^S$ es un grupo arilo, este puede ser carboarilo o heteroarilo. El arilo puede ser arilo C_{5-6} , tal como arilo C_5 . Un arilo C_5 puede seleccionarse de tiofenilo, furanilo, pirrolilo, pirazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo e isoxazolilo. Un arilo C_6 puede ser fenilo

30

Un grupo arilo puede ser tiofenilo, tal como tiofen-2-ilo.

El propio grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos $-R^{Ar}$, tal como uno o dos grupos, tal como un grupo (monosustituido). Cada grupo $-R^{Ar}$ se selecciona independientemente de halo, alquilo, haloalquilo y arilo, tales como halo y alquilo. Estos grupos pueden tener los mismos significados que los grupos descritos anteriormente, excepto que el grupo arilo no está sustituido.

El grupo $-Ar$ puede ser halofenilo o alquilfenilo.

El halofenilo se puede seleccionar de 2-halofenilo, tal como 2-clorofenilo, 3-halofenilo, tal como 3-clorofenilo, y 4-halofenilo, tal como 4-clorofenilo.

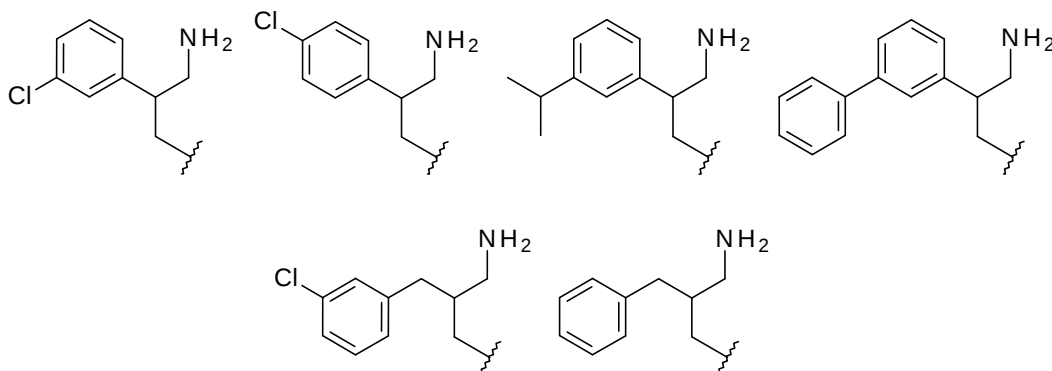
El alquilfenilo puede seleccionarse de 2-alquilfenilo, tal como 2-isopropilfenilo, 3-alquilfenilo, tal como 3-isopropilfenilo, y 4-alquilfenilo, tal como 4-isopropilfenilo.

El grupo $-Ar$ puede ser 2-clorofenilo o 3-isopropilfenilo.

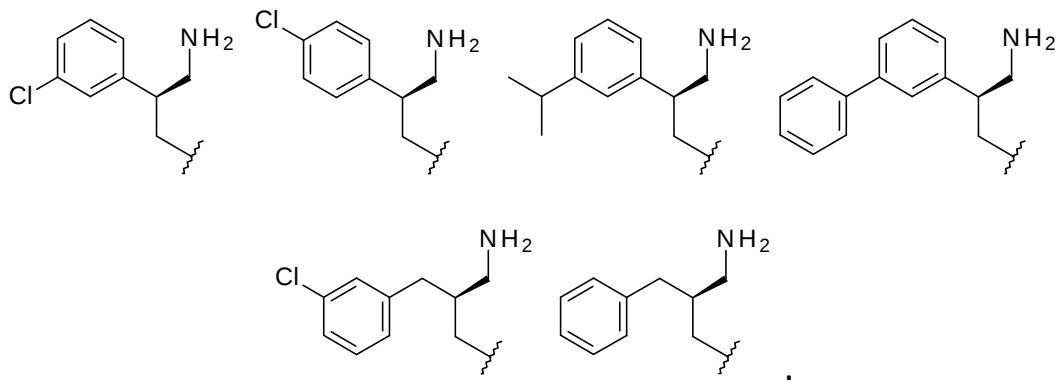
El grupo $-Ar$ puede ser 2-clorofenilo.

Grupos $-R^{15}$ seleccionados

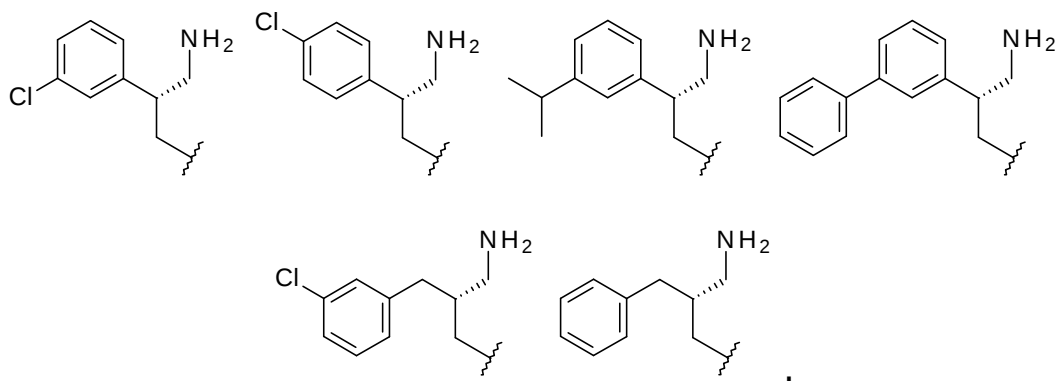
El grupo $-R^{15}$ puede seleccionarse de los grupos a continuación:



El grupo $-R^{15}$ puede seleccionarse de los grupos a continuación:

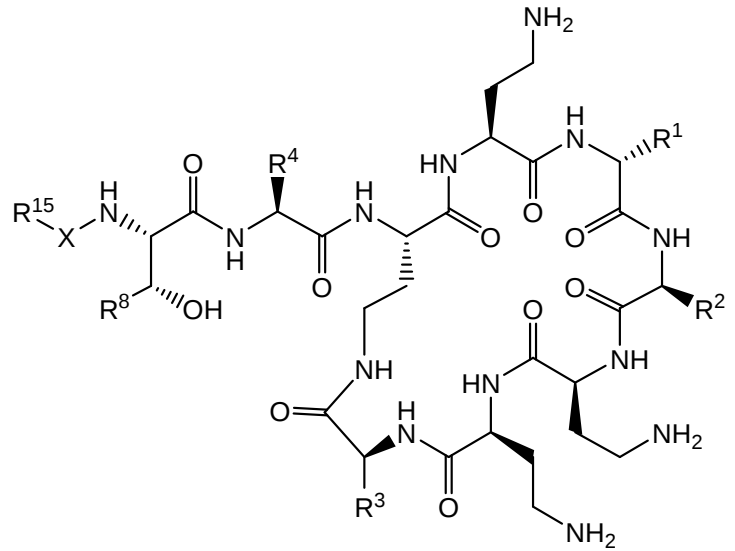


5 El grupo $-R^{15}$ puede seleccionarse de los grupos a continuación:



Realizaciones relacionadas con los compuestos de Fórmula (I)

10 En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (Ia) que tiene la orientación de los restos R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 como se representa a continuación:



15 en la que $-X-$, $-R^1$, $-R^2$, $-R^3$, $-R^4$, $-R^8$ y $-R^{15}$ son como se definen para los compuestos de fórmula (I),

o una sal, solvato, forma protegida o forma de profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En los compuestos de fórmula (Ia), -R¹ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es una D-fenilalanina, D-leucina o D-norleucina.

5 En los compuestos de fórmula (Ia), -R² junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de L-leucina, L-aminobutirato, o L-treonina.

Los compuestos de fórmula (Ia) pueden ser compuestos donde
10 -L- es un enlace covalente o -CH₂-, y -Ar es fenilo opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados del grupo que consiste en halo, alquilo C1-C6, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido. Por ejemplo, -Ar puede ser fenilo opcionalmente
15 sustituido con uno o dos grupos seleccionados del grupo que consiste en cloro, bromo, tiofenilo, fenilo, metilo, isopropilo, e isobutilo.

En este caso, -Ar puede seleccionarse de fenilo, 3-
20 clorofenilo, 4-clorofenilo, 3-isopropilfenilo, 3-isobutilfenilo, 3-metilfenilo, 3-bromofenilo, 1,1'-bifenil-3-ilo, 3,5-diclorofenilo, y tiofen-3-ilfenilo.

Los compuestos de la presente invención pueden ser
25 compuestos de fórmula (I) en la que:

-R¹, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es una D-fenilalanina, D-leucina o D-norleucina;

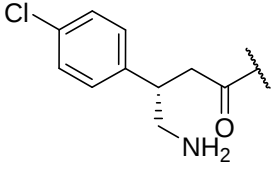
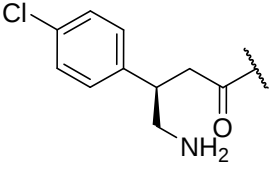
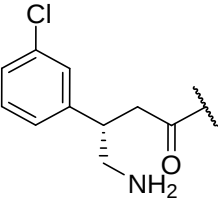
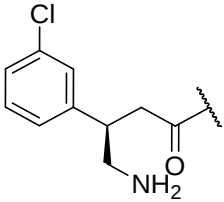
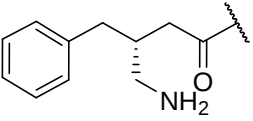
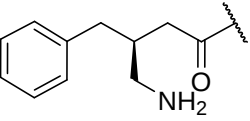
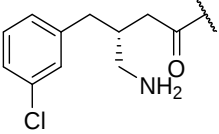
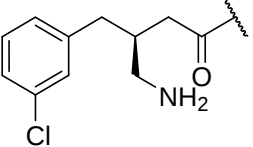
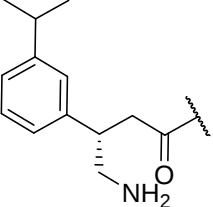
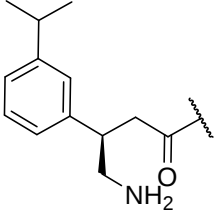
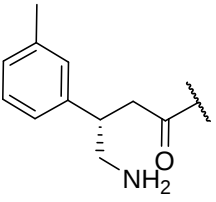
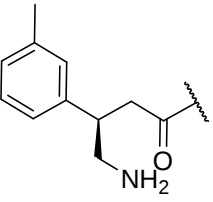
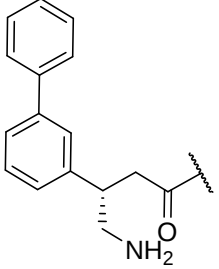
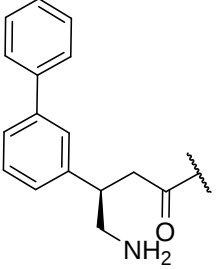
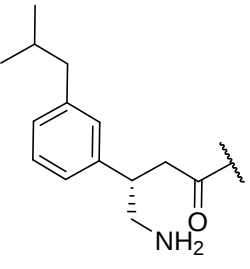
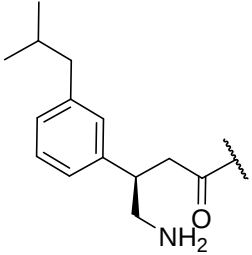
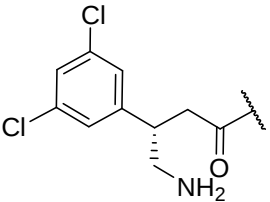
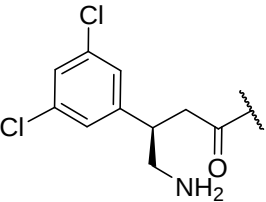
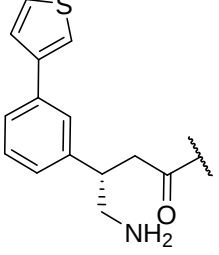
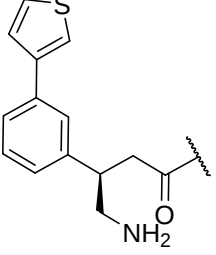
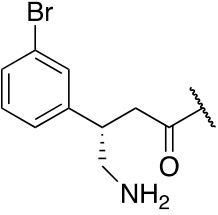
30 -R², junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de L-leucina, L-aminobutirato, o L-treonina;

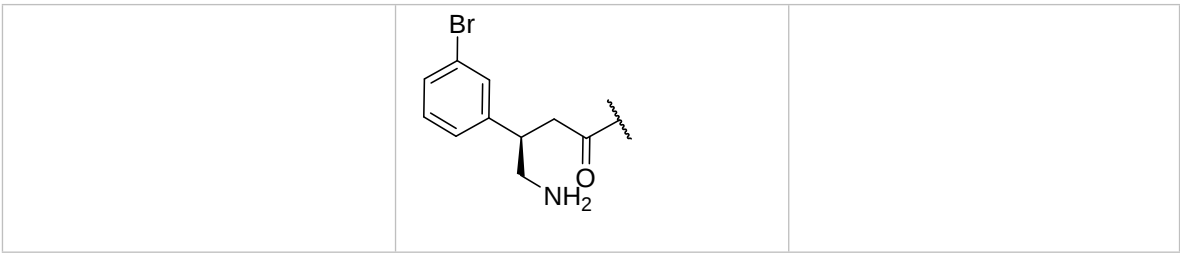
-R³ es L-treonina;

-R⁴ es L-Dap;

-R⁸ es metilo; y

R¹⁵-X- se selecciona del grupo que consiste en:

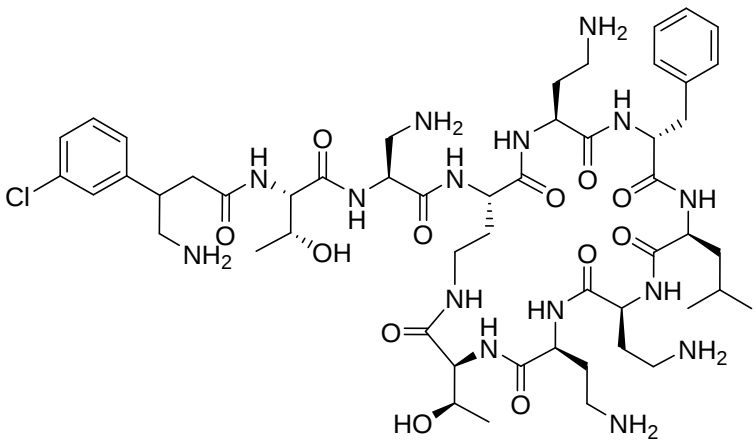
		
		
		
		
		
		
		



y sales, solvatos, formas protegidas y formas de profármacos de los mismos.

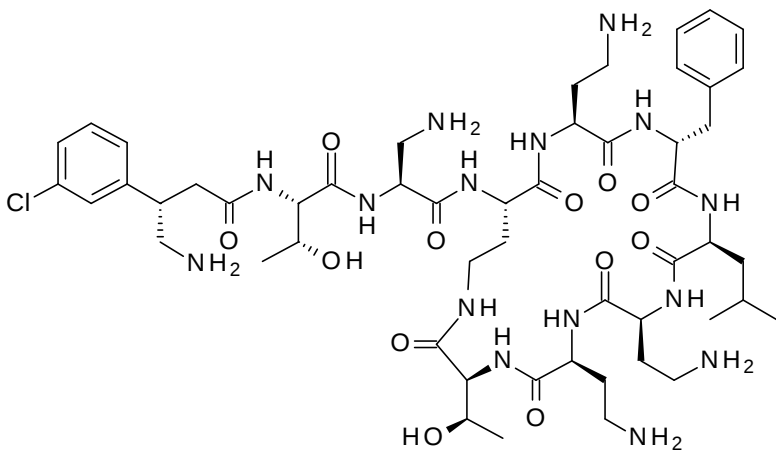
5 *Compuesto (II) y Compuesto (III)*

El compuesto de fórmula (I) puede ser un compuesto de fórmula (II) como se muestra a continuación:



10 y sales, solvatos y formas protegidas del mismo.

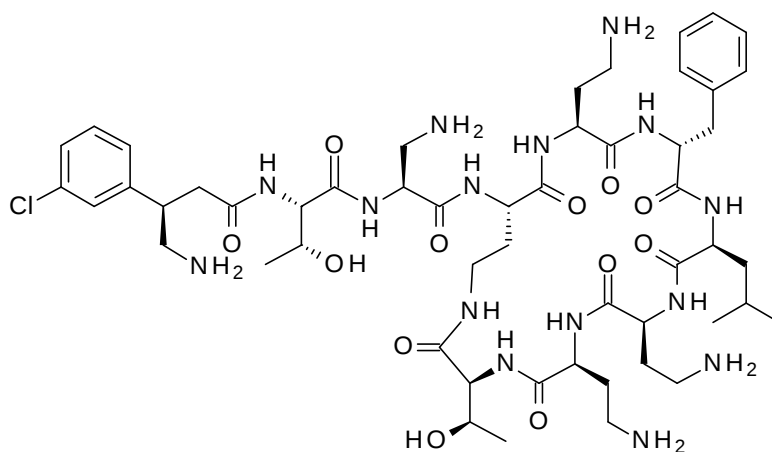
El compuesto de fórmula (I) puede ser un compuesto de fórmula (IIa) como se muestra a continuación:



15 y sales, solvatos y formas protegidas del mismo.

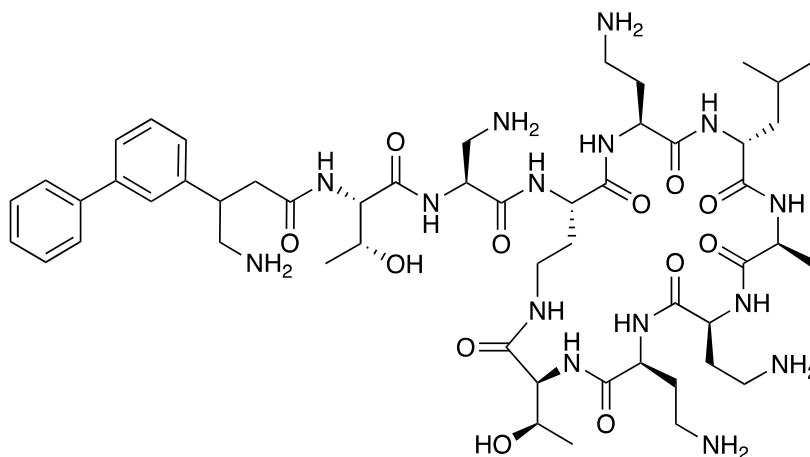
El compuesto de fórmula (I) puede ser un compuesto de

fórmula (IIb) como se muestra a continuación:



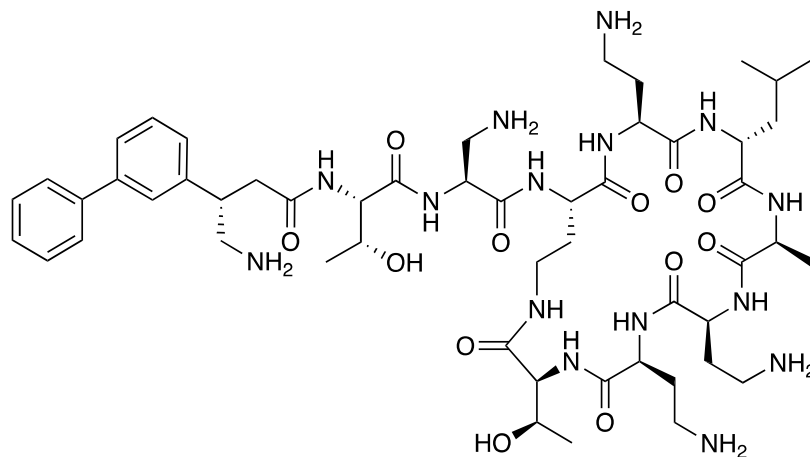
y sales, solvatos y formas protegidas del mismo.

5 El compuesto de fórmula (I) puede ser un compuesto de
fórmula (III) como se muestra a continuación:



y sales, solvatos y formas protegidas del mismo.

10 El compuesto de fórmula (I) puede ser un compuesto de
fórmula (III) como se muestra a continuación:

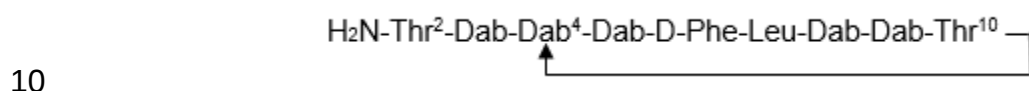


y sales, solvatos y formas protegidas del mismo.

Compuestos de polimixina

Los compuestos para su uso en el presente caso se basan en formas modificadas de compuestos conocidos de polimixina, tales como nonapéptido de Polimixina B y nonapéptido de Colistina.

El nonapéptido de polimixina B tiene la siguiente estructura:



donde se indican las posiciones 2, 4 y 10 (con referencia al sistema de numeración utilizado para el decapeptido de Polimixina B), y los residuos de aminoácidos están en la configuración L-, a menos que se indique lo contrario.

15

Los compuestos de la invención son derivados del nonapéptido de polimixina B, donde (i) el grupo amino N terminal, -NH₂, se reemplaza por el grupo -NH-X-R¹⁵ como se describe en el presente documento; (ii) el residuo de aminoácidos en la posición 3 está sustituido con Dap, y opcionalmente (iii) los residuos de aminoácidos en 2, 6 y/o 7 están sustituidos con otro residuo de aminoácidos.

Por conveniencia, los compuestos de la invención se representan por la fórmula (I), donde los aminoácidos en las posiciones 2, 3, 6, 7 o 10 se determinan por la naturaleza de los grupos R⁸, R⁴, R¹, R² y R³ respectivamente. Los compuestos de la invención, que incluyen las variantes descritas anteriormente, son biológicamente activos.

30

Métodos de síntesis

La preparación de los compuestos de la invención resultará familiar para los expertos en la técnica, particularmente teniendo conocimiento de los métodos descritos en el documento WO 2015/135976 para la preparación de nonapéptidos de polimixina modificados. Los métodos descritos en la técnica pueden adaptarse fácilmente para su uso en la preparación de los compuestos del presente caso, teniendo en cuenta los nuevos grupos N-terminales empleados en el presente caso.

Generalmente, un compuesto de la invención se puede preparar acoplando un intermedio de nonapéptido de polimixina adecuadamente protegido con un ácido carboxílico que tiene el grupo -R¹⁵. El producto de esta reacción es típicamente la forma protegida del compuesto de fórmula (I). La eliminación de los grupos protectores se puede llevar a cabo según se desee. Esta es la estrategia general conocida a partir del documento WO 2015/135976.

Un intermedio nonapeptídico protegido adecuadamente puede prepararse de acuerdo con los métodos expuestos en el documento WO 2015/135976. Como se describe en el presente documento, un intermedio nonapeptídico protegido adecuadamente también se puede preparar por síntesis en fase sólida de un nonapéptido lineal, seguido de la escisión de la forma lineal del soporte sólido y después la posterior ciclación de esa forma lineal entre los residuos amino en las posiciones 4 y 10.

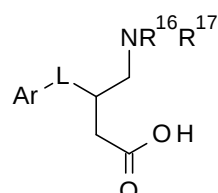
Los compuestos de la invención pueden prepararse mediante síntesis peptídica convencional, usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos adecuados incluyen la síntesis en fase sólida tal como se describe por de Visser *et al*, *J. Peptide Res*, **61**, 2003, 298-306, Vaara *et al*, *Antimicrob.*

Agents and Chemotherapy, **52**, 2008. 3229-3236, o por Velkov *et al.* *ACS Chem. Biol.* **9**, 2014, 1172. Estos métodos incluyen una estrategia de protección adecuada y métodos para la etapa de ciclación.

5

Cuando sea necesario, el compuesto de fórmula (I) se puede purificar al menos parcialmente, por ejemplo, para separar formas diastereoméricas del producto.

10 En un aspecto más de la invención se proporciona un compuesto de fórmula (X):



en la que:

-R¹⁶ es hidrógeno;

15 -R¹⁷ es hidrógeno;

-L- es un enlace covalente o metileno;

-Ar es arilo opcionalmente sustituido, tal como fenilo sustituido

y sales, solvatos, formas protegidas y formas activadas
20 del mismo.

El compuesto de fórmula (X) encuentra uso en la preparación de los compuestos de fórmula (I). Típicamente, el compuesto (X), tal como en su forma protegida, se acopla con
25 un nonapéptido de polimixina protegido de fórmula (XI) para producir una forma protegida del compuesto de fórmula (I).

Las realizaciones para el compuesto de fórmula (I) en relación con los grupos -L- y -Ar también se aplican a los

compuestos de fórmula (X).

Típicamente, la funcionalidad amino, que es el grupo $-NR^{16}R^{17}$, está protegida.

5

En una realización, la funcionalidad amino en el compuesto de fórmula (X) está protegida con Boc o CBZ. Aquí, $-R^{16}$ es hidrógeno y $-R^{17}$ is $-C(O)O-t-Bu$ o $-C(O)O-Bn$.

10 El compuesto de fórmula (XI) es un compuesto de fórmula (I), excepto que el grupo $R^{15}-X-$ es hidrógeno, y sales, solvatos y formas protegidas del mismo.

15 Las realizaciones seleccionadas para el compuesto de fórmula (I) en relación con los grupos $-R^1$, $-R^2$, $-R^3$, $-R^4$ y $-R^8$ también se aplican a los compuestos de fórmula (XI).

El compuesto de fórmula (XI) está típicamente protegido, y más específicamente, los grupos amino en las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en las posiciones 3, 5, 8 y 9 están protegidos, por ejemplo, cada uno de los aminoácidos en las posiciones 3, 5, 8 y 9 está Boc-prottegido o CBZ-prottegido, y los grupos hidroxilo en las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en la posición 2 y opcionalmente la posición 10 están protegidos, por ejemplo, cada uno de estos aminoácidos está tBu-prottegido.

El compuesto de ácido carboxílico de fórmula (X) puede acoplarse con el compuesto amino de fórmula (XI) usando condiciones de acoplamiento amida convencionales. El compuesto de fórmula (X) puede usarse en forma activa, cuya forma puede generarse *in situ*, para la reacción con el compuesto de fórmula

(XI).

La forma activada puede generarse *in situ* a través de la elección apropiada de agentes de acoplamiento en la reacción de formación de enlaces amida, opcionalmente en presencia de base.

El ácido carboxílico de fórmula (X) puede activarse por reacción de un agente de activación estándar, tal como una carbodiimida, tal como DIC (*N,N'*-diisopropilcarbodiimida) o EDCI (carbodiimida soluble en agua; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). La forma activada del ácido es una O-acilisourea.

El ácido carboxílico puede ser activado por un hidroxibenzotriazol o un hidroxiazabenzotriazol, tal como HOBT (1-hidroxi-benzotriazol) o HOAt (1-hidroxi-7-azabenzotriazol). La forma activada del ácido es un éster.

El éster se puede formar a través de la forma activada con carbodiimida, o se puede formar a partir del ácido carboxílico directamente, por ejemplo, usando un reactivo apropiado, tal como HATU, HBTU, PyBOP, PyBROP, o TBTU.

Puede estar presente una base orgánica para la formación de la forma activada, tal como DIPEA o TEA.

Formas protegidas

Los compuestos de la invención, tal como los compuestos de fórmula (I), (II) y (III), pueden proporcionarse en una forma protegida. En este caso, la funcionalidad reactiva, tal

como la funcionalidad amino, puede enmascararse para evitar su reacción durante una etapa de síntesis. Se proporciona un grupo protector para enmascarar la funcionalidad reactiva, y estos grupos protectores pueden eliminarse en una etapa posterior de la síntesis para revelar la funcionalidad reactiva original.

En una realización, la forma protegida es un compuesto en el que la funcionalidad amino, hidroxilo, tiol y/o carboxilo está protegida (enmascarada) por un grupo protector. En una realización, la forma protegida es un compuesto en el que se protege la funcionalidad de la cadena lateral de los residuos de aminoácidos con el compuesto.

En el compuesto de fórmula (I), (II) y (III), los residuos de aminoácidos en las posiciones 5, 8 y 9 son residuos Dab, y la cadena lateral del residuo Dab incluye la funcionalidad amino. La funcionalidad de aminoácidos de cada residuo Dab puede protegerse con un grupo protector de amino, como se describe en el presente documento. De forma similar, el residuo de aminoácidos en la posición 3 es Dap, y la cadena lateral de este residuo de aminoácidos incluye la funcionalidad amino.

El grupo $-R^{15}$ contiene funcionalidad amino en forma del grupo $-R^{16}R^{17}$, por ejemplo, donde cada uno de $-R^{16}$ y $-R^{17}$ es hidrógeno. La funcionalidad amino puede protegerse con grupos protectores de amino, como se describe en el presente documento.

Los grupos protectores, tales como aquellos para residuos de aminoácidos, se conocen bien y están bien descritos en la técnica.

Los aminoácidos que tienen protección de grupo lateral, opcionalmente junto con la protección de amino y carboxi, están disponibles en el mercado. Por lo tanto, un compuesto de polimixina protegido puede prepararse a partir de materiales
5 de partida de aminoácidos apropiadamente protegidos.

Velkov *et al.* describen la preparación por etapas de compuestos de polimixina en la fase sólida utilizando un aminoácido adecuadamente protegido. Se divulga el uso de formas
10 protegidas de treonina y Dab (véase la Información complementaria).

Cuando se usa un grupo protector, puede eliminarse en condiciones que no alteran sustancialmente la estructura del
15 núcleo de polimixina, por ejemplo, condiciones que no alteran la estereoquímica de los residuos de aminoácidos.

En una realización, los grupos protectores son lábiles a los ácidos, lábiles a las bases, o se pueden eliminar en
20 condiciones reductoras.

Los grupos protectores ejemplares para la funcionalidad amino incluyen Boc (*terc*-butoxicarbonilo), Bn (bencilo, Bzl), Cbz (benciloxicarbonilo, Z), 2-CL-Z (2-cloro), ivDde (1-[4,4-
25 dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno]-3-metilbutilo), Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo), HSO₃-Fmoc (Fmoc sulfonilado, tal como 2-sulfo-Fmoc, como se describe, por ejemplo, en Schechter *et al*, *J. Med Chem* 2002, **45** (19) 4264), Dde (1-[4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno]etilo), Mmt (4-metoxitritilo), Mtt
30 (4-metiltritilo), Nvoc (6-nitroveratroiloxicarbonilo), Tfa (trifluoroacetilo), y Alloc (aliloxicarbonilo).

Los grupos protectores ejemplares para la funcionalidad nitrógeno aromático incluye Boc, Mtt, Trt y Dnp (dinitrofenilo).

5 En una realización, el grupo protector para la funcionalidad amino se selecciona de Boc, ivDde, Cbz, Bn y Fmoc y HSO₃-Fmoc.

En una realización, el grupo protector para la
10 funcionalidad amino es Boc, ivDde, Fmoc o Cbz, tal como Boc, ivDde o Cbz.

La protección Boc puede proporcionarse para la funcionalidad amino presente en las cadenas laterales de los
15 residuos de aminoácidos presentes en las posiciones 5, 8 y 9, y opcionalmente la posición 3.

Los grupos protectores ejemplares para la funcionalidad hidroxilo incluyen Trt (tritilo), Bn (bencilo), y tBu
20 (*terc*-butilo).

En una realización, el grupo protector para la funcionalidad hidroxilo es tBu.

25 Los grupos protectores ejemplares adicionales incluyen grupos protectores silil éter, tales como TMS, TES, TBS, TIPS, TBDMS, y TBDPS. Dichos grupos protectores pueden eliminarse con TBAF, por ejemplo.

30 Los grupos protectores ejemplares para la funcionalidad carboxilo Bn (bencilo, Bz), tBu (*terc*-butilo), TMSET (trimetilsililetilo) y Dmab ({1-[4,4-dimetil-2,6-

dioxociclohex-1-ilideno]-3-metilbutil}amino bencilo).

Los grupos protectores ejemplares para la funcionalidad
nitrógeno aromático, por ejemplo, cuando dicha funcionalidad
5 está presente en el grupo -Ar, incluye Boc, Mtt, Trt y Dnp
(dinitrofenilo).

En algunas realizaciones, solamente algunos tipos de
funcionalidad están protegidos. Por ejemplo, solamente pueden
10 protegerse grupos amino, tales como grupos amino en la cadena
lateral de un residuo de aminoácidos.

En una realización, los grupos amino y los grupos
hidroxilo están protegidos.

15

LogP

Un compuesto de la invención, tal como un compuesto de
fórmula (I), (II) o (III), puede tener un coeficiente de
20 partición, tal como se expresa como un valor LogP, dentro de
ciertos límites. El coeficiente de partición puede proporcionar
una indicación de la lipofilidad del compuesto.

Los inventores han establecido que los compuestos que
25 tienen una lipofilidad más alta tienen una peor
citotoxicidad. Los compuestos de la invención tienen
típicamente valores LogP que están asociados con una menor
citotoxicidad, tales como los valores LogP descritos a
continuación.

30

Un valor LogP para un compuesto se puede determinar
experimentalmente (por ejemplo, mediante el reparto del

compuesto entre octanol y agua), o se puede predecir utilizando métodos computacionales estándar.

Por ejemplo, una referencia a LogP puede ser una
5 referencia a ALogP, que puede determinarse utilizando los métodos descritos por Ghose *et al.* *J. Phys. Chem. A*, 1998, 102, 3762-3772, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Por lo tanto, ALogP es la estimación de contribución de grupos de Ghose/Crippen para
10 LogP.

En una realización, un compuesto tiene un valor LogP, tal como un valor ALogP, de al menos -6,5, al menos -6,6, al menos -6,7, al menos -6,8, al menos -6,9, al menos -7,0, al menos -
15 7,5, o al menos -8,0.

En una realización, un compuesto tiene un valor LogP, tal como un valor ALogP, de como máximo -6,4, como máximo -6,3, como máximo -6,2, como máximo -6,1, como máximo -6,0, como
20 máximo -5,9, o como máximo -5,8.

En una realización, un compuesto tiene un valor LogP dentro de un rango que tiene límites superior e inferior seleccionados apropiadamente de los límites dados
25 anteriormente, por ejemplo dentro del intervalo de -5,8 a -8,0, tal como de -6,0 a -6,7, tal como de -6,3 a -6,7. Estos rangos pueden seleccionarse cuando el grupo -R² es alquilo sin sustituir.

30 En otra realización, el compuesto tiene un valor LogP dentro del intervalo -6,7 a -7,4. Este intervalo puede seleccionarse cuando el grupo -R² es alquilo sustituido con un

grupo hidroxilo.

Se ha encontrado que los compuestos que tienen valores LogP, tales como los valores ALogP, dentro de los límites analizados anteriormente, tienen una excelente actividad contra cepas bacterianas tanto susceptibles a polimixina como resistentes a polimixina-. Los compuestos pueden tener una actividad antimicrobiana comparable con respecto a la polimixina B. Ventajosamente, dichos compuestos también pueden tener una citotoxicidad reducida en comparación con la polimixina B.

Los presentes inventores han encontrado que un compuesto que tiene valores óptimos de LogP puede obtenerse seleccionando el grupo $-R^{15}$ del presente caso, junto con opciones apropiadas de residuos de aminoácidos en la posición 6 y/o 7 (tal como con la selección apropiada de $-R^1$ y/o $-R^2$).

Agente activo

Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III) pueden usarse cada uno junto con un segundo agente activo. Los inventores han encontrado que dichas combinaciones tienen mayor actividad biológica que la que se esperaría de la actividad individual de ambos compuestos. Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III) se pueden usar para potenciar la actividad del segundo agente activo. En particular, los compuestos de fórmula (I), (II) o (III) se pueden usar junto con un segundo agente activo para mejorar la actividad antimicrobiana de ese agente, por ejemplo, contra bacterias gramnegativas.

Sin desear quedar ligado por la teoría, se cree que los

compuestos de fórmula (I), (II) o (III) actúan sobre la membrana externa de una célula, por ejemplo, una célula bacteriana gramnegativa, para facilitar la captación del segundo agente activo en esa célula. Por lo tanto, los agentes
5 que de otra manera son incapaces o malos para cruzar la membrana externa pueden captarse hacia una célula diana por la acción de los compuestos de fórmula (I), (II) o (III).

En una realización, la combinación de un compuesto de
10 fórmula (I), (II) o (III) con el segundo agente activo es activa contra bacterias gramnegativas. En este caso, no es esencial que individualmente el compuesto de fórmula (I), (II) o (III) o el segundo agente activo tengan actividad contra las bacterias gramnegativas.

15 En una realización, el segundo agente activo es un agente que tiene un valor de MIC medido contra un microorganismo particular, tal como una bacteria, que es menor de 10, menor de 5, o menor de 1 microgramos/ml. El microorganismo puede ser
20 una bacteria gramnegativa, tal como una bacteria gramnegativa seleccionada del grupo que consiste en *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *K. oxitoca*; *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*, y *Stenotrophomonas maltophilia*.

25 Los ejemplos de segundos agentes activos que tienen actividad contra bacterias gramnegativas incluyen beta-lactamas, tetraciclinas, aminoglucósidos y quinolonas.

30 En una realización, el segundo agente activo es un agente que tiene un valor de MIC medido contra un microorganismo particular, tal como una bacteria gramnegativa, que es mayor

de 4, mayor de 8, mayor de 16 o mayor de 32 microgramos/ml. En esta realización, el segundo agente activo puede ser activo contra bacterias grampositivas. Por ejemplo, el segundo agente activo es un agente que tiene un valor de MIC medido contra una bacteria grampositiva particular que es menor de 10, menor de 5, o menor de 1 microgramos/ml. En este caso, el compuesto de fórmula (I), (II) o (III) actúa para facilitar la captación del segundo agente activo en la célula bacteriana gramnegativa. Por lo tanto, el segundo agente activo puede actuar sobre un objetivo dentro de la célula bacteriana gramnegativa, cuyo objetivo puede ser el mismo que el objetivo del segundo agente activo en una célula bacteriana grampositiva.

Las bacterias grampositivas pueden seleccionarse del grupo que consiste en bacterias *Staphylococcus* y *Streptococcus*, tales como *S. aureus* (incluyendo MRSA), *S. epidermis*, *E. faecalis*, y *E. faecium*.

Los ejemplos de segundos agentes activos que tienen actividad contra las bacterias grampositivas (por ejemplo, a los valores de MIC indicados anteriormente), y la actividad moderada contra las bacterias gramnegativas, incluyen rifampicina, novobiocina, macrólidos, pleuromutilinas. En una realización, un compuesto que tiene actividad moderada contra bacterias gramnegativas puede tener un valor de MIC medido contra una bacteria gramnegativa que es menor de 32, menor de 64, o menor de 128 microgramos/ml.

También son adecuados para su uso agentes que tienen actividad contra bacterias grampositivas y que están esencialmente inactivos contra bacterias gramnegativas. Los ejemplos incluyen ácido fusídico, oxazolidininas (por ejemplo,

linezolid), glucopéptidos (por ejemplo, vancomicina), daptomicina y lantibióticos. En una realización, un compuesto que esencialmente no tiene actividad contra bacterias gramnegativas puede tener un valor de MIC medido contra una
5 bacteria gramnegativa que es mayor de 32, mayor de 64, mayor de 128, mayor de 256 microgramos/ml.

En circunstancias normales, dichos agentes no son necesariamente adecuados para su uso contra bacterias
10 gramnegativas debido a su capacidad relativamente mala para cruzar la membrana externa de una célula bacteriana gramnegativa. Como se ha explicado anteriormente, cuando se usan junto con un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), dichos agentes son adecuados para su uso.

15

En una realización, el agente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en rifampicina, rifabutina, rifalazilo, rifapentina, rifaximin, aztreonam, oxacilina, novobiocina, ácido fusídico, azitromicina, ciprofloxacina, meropenem,
20 tigeciclina, minociclina, eritromicina, claritromicina y mupirocina, y sales, solvatos y formas de profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los presentes inventores han encontrado que los compuestos
25 de polimixina de fórmula (I), (II) o (III) pueden usarse junto con ciertos compuestos de la familia de la rifamicina para tratar infecciones microbianas. La familia de la rifamicina incluye aislamientos de rifamicina A, B, C, D, E, S y SV, y versiones derivadas sintéticamente de estos compuestos, tal
30 como rifampicina, rifabutina, rifalazilo, rifapentina y rifaximina, y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, el agente activo es rifampicina y sales, solvatos y formas de profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5 ***Sales, solvatos y otras formas***

Los ejemplos de sales del compuesto de fórmula (I), (II) y (III) incluyen todas las sales farmacéuticamente aceptables, tales como, sin limitación, sales de adición de ácidos de
10 ácidos minerales fuertes tales como sales HCl y HBr y sales de adición de ácidos orgánicos fuertes tal como una sal de ácido metanosulfónico. Otros ejemplos de sales incluyen sulfatos y acetatos tales como el propio acetato, trifluoroacetato o tricloroacetato.

15

En una realización, los compuestos de la presente divulgación se proporcionan como una sal de sulfato o una sal de ácido trifluoroacético (TFA). En una realización, los compuestos de la presente divulgación se proporcionan como
20 sales de acetato, tales como acetato.

Un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) también se puede formular como un profármaco. Los profármacos pueden incluir un compuesto antibacteriano descrito en el presente documento en
25 el que uno o más grupos amino están protegidos con un grupo que puede escindirse *in vivo*, para liberar el compuesto biológicamente activo. En una realización, el profármaco es un "profármaco de amina". Los ejemplos de profármacos de amina incluyen sulfometilo, como se describe en, por ejemplo, Bergen
30 *et al*, *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 2006, **50**, 1953 o HSO₃-FMOC, como se describe, por ejemplo, en Schechter *et al*, *J. Med Chem* 2002, **45**(19) 4264, y sales de los mismos. Se

proporcionan ejemplos adicionales de profármacos amina por Krise y Oliyai en *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*, 2007, **5(2)**, 101-131.

5 En una realización, un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) se proporciona como un profármaco.

Una referencia a un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), o cualquier otro compuesto descrito en el presente documento, es también una referencia a un solvato de ese compuesto. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos.

Un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), o cualquier otro compuesto descrito en el presente documento, incluye un compuesto donde un átomo se reemplaza por un isótopo de origen natural o sintético. En una realización, el isótopo es un isótopo estable. Por lo tanto, un compuesto descrito aquí incluye, por ejemplo, compuestos que contienen deuterio y similares. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

25 Ciertos compuestos de fórmula (I), (II) o (III), o cualquier otro compuesto descrito en el presente documento, pueden existir en una o más formas geométricas particulares, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas, incluyendo, pero sin limitación, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t- y r-; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y

(-); ceto-, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas barco, silla, torsión, envolvente-, y semisilla; y combinaciones de los mismos, en lo sucesivo en el presente
5 documento denominadas de forma colectiva como "isómeros" (o "formas isoméricas").

Cabe destacar que, excepto como se analiza a continuación para formas tautómeras, específicamente excluidas del término
10 "isómeros", como se utiliza en el presente documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre átomos en lugar de simplemente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, $-\text{OCH}_3$, no debe
15 interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$. De forma similar, una referencia al orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, el metaclorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras bien puede incluir formas
20 estructuralmente isoméricas que pertenecen a esa clase (por ejemplo, alquilo C_{1-6} incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec-, y *terc*-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

25 A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto particular incluye todas las formas isoméricas, incluyendo mezclas (por ejemplo, mezclas racémicas) de las mismas. Los métodos de preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización
30 fraccionada y medios cromatográficos) de dichas formas isoméricas se conocen en la técnica o se obtienen fácilmente adaptando los métodos enseñados en el presente documento o

métodos conocidos, de una manera conocida.

Un aspecto de la presente invención se refiere a compuestos en forma sustancialmente purificada y/o en una forma
5 sustancialmente libre de contaminantes.

En una realización, la forma sustancialmente purificada es de al menos el 50 % en peso, por ejemplo, al menos el 60 % en peso, por ejemplo, al menos el 70 % en peso, por ejemplo,
10 al menos el 80 % en peso, por ejemplo, al menos el 90 % en peso, por ejemplo, al menos el 95 % en peso, por ejemplo, al menos el 97 % en peso, por ejemplo, al menos el 98 % en peso, por ejemplo, al menos el 99 % en peso.

15 A menos que se especifique de otro modo, la forma sustancialmente purificada se refiere al compuesto en cualquier forma estereoisomérica o enantiomérica. Por ejemplo, en una realización, la forma sustancialmente purificada se refiere a una mezcla de estereoisómeros, es decir, purificara con
20 respecto a otros compuestos. En una realización, la forma sustancialmente purificada se refiere a un estereoisómero, por ejemplo, estereoisómero ópticamente puro. En una realización, la forma sustancialmente purificada se refiere a una mezcla de enantiómeros. En una realización, la forma sustancialmente
25 purificada se refiere a una mezcla de enantiómeros equimolar (es decir, una mezcla racémica, un racemato). En una realización, la forma sustancialmente purificada se refiere a un enantiómero, por ejemplo, un enantiómero ópticamente puro.

30 En una realización, los contaminantes representan no más del 50 % en peso, por ejemplo, no más del 40% en peso, por ejemplo, no más del 30% en peso, por ejemplo, no más del 20%

en peso, por ejemplo, no más del 10% en peso, por ejemplo, no más del 5% en peso, por ejemplo, no más del 3% en peso, por ejemplo, no más del 2% en peso, por ejemplo, no más del 1% en peso.

5

A menos que se especifique de otro modo, los contaminantes se refieren a otros compuestos, es decir, distintos de los estereoisómeros o enantiómeros. En una realización, los contaminantes se refieren a otros compuestos y otros
10 estereoisómeros. En una realización, los contaminantes se refieren a otros compuestos y al otro enantiómero.

En una realización, la forma sustancialmente purificada es al menos el 60 % ópticamente pura (es decir, el 60 % del
15 compuesto, sobre una base molar, es el estereoisómero o enantiómero deseado, y el 40 % es el estereoisómero o enantiómero no deseado), por ejemplo, al menos el 70 % ópticamente pura, por ejemplo, al menos el 80 % ópticamente pura, por ejemplo, al menos el 90 % ópticamente pura, por
20 ejemplo, al menos el 95 % ópticamente pura, por ejemplo, al menos el 97 % ópticamente pura, por ejemplo, al menos el 98 % ópticamente pura, por ejemplo, al menos el 99 % ópticamente pura.

25 ***Métodos de tratamiento***

Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III), o formulaciones farmacéuticas que contienen estos compuestos, son adecuados para su uso en métodos de tratamiento y
30 profilaxis. Los compuestos pueden administrarse a un sujeto que lo necesite. Los compuestos son adecuados para su uso junto con un agente activo ("un segundo agente activo"), por ejemplo,

un segundo agente activo que es un agente antimicrobiano.

Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III) son para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. En algunos aspectos de la invención, un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) puede administrarse a un sujeto mamífero, tal como un ser humano, para tratar una infección microbiana.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o (II) en la fabricación de un medicamento para su uso en tratamiento. En una realización, el medicamento comprende un compuesto de fórmula (I), (II) o (III). En una realización, el medicamento es para su uso en el tratamiento de una infección microbiana.

El término "infección microbiana" se refiere a la invasión del animal huésped por microbios patógenos. Esto incluye el crecimiento excesivo de microbios que normalmente están presentes en o sobre el cuerpo de un animal. Más generalmente, una infección microbiana puede ser cualquier situación en la que la presencia de una o más poblaciones microbianas dañe a un animal huésped. Por lo tanto, un animal "padece" una infección microbiana cuando un número excesivo de una población microbiana está presente en o sobre el cuerpo de un animal, o cuando la presencia de una población o poblaciones microbianas daña las células u otro tejido de un animal.

Los compuestos pueden usarse para tratar un sujeto que tiene una infección microbiana, o está en riesgo de infección por un microorganismo, tal como una bacteria.

La infección microbiana puede ser una infección bacteriana, como una infección bacteriana gramnegativa.

Los ejemplos de bacteria gramnegativa incluyen, pero sin limitación, *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., y otras Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas*, y *Legionella* y numerosas otras.

Los bacilos gramnegativos médicamente relevantes incluyen una multitud de especies. Algunos de ellos causan principalmente problemas respiratorios (*Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*), principalmente problemas urinarios (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*), y principalmente problemas gastrointestinales (*Salmonella enterica*).

Las bacterias gramnegativas asociadas con infecciones nosocomiales incluyen *Acinetobacter baumannii*, que causa bacteriemia, meningitis secundaria y neumonía asociada a ventilador en unidades de cuidados intensivos de establecimientos hospitalarios.

En una realización la especie bacteriana gramnegativa se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *K. oxitoca*; *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*, y *Stenotrophomonas maltophilia*.

En una realización la especie bacteriana gramnegativa se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *A. baumannii*.

Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III), o composiciones que comprenden los mismos, son útiles para el tratamiento de infecciones cutáneas y tejidos blandos, infección gastrointestinal, infección del tracto urinario, 5 neumonía, septicemia, infecciones intraabdominales e infecciones obstétricas/ginecológicas. Las infecciones pueden ser infecciones bacterianas gramnegativas.

Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III), o 10 composiciones que comprenden los mismos, son útiles para el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas*, incluyendo infección por *P. aeruginosa*, por ejemplo, infecciones cutáneas y de tejido blando, infección gastrointestinal, infección del tracto urinario, neumonía y sepsis.

15 Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III), o composiciones que comprenden los mismos, son útiles para el tratamiento de infecciones por *Acinetobacter*, incluyendo infección por *A. baumannii*, para neumonía, infecciones de 20 heridas, infección del tracto urinario y sepsis.

Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III), o composiciones que comprenden los mismos, son útiles para el tratamiento de infecciones por *Klebsiella*, incluyendo 25 infecciones por *K. pneumoniae*, para neumonía, infección intraabdominal, infección del tracto urinario, meningitis y sepsis.

Los compuestos de fórmula (I), (II) o (III), o 30 composiciones que comprenden los mismos, son útiles para el tratamiento de infección por *E. coli*, incluyendo infecciones por *E. coli*, para bacteriemia, colecistitis, colangitis,

infección intraabdominal, infección del tracto urinario, meningitis neonatal y neumonía.

Los compuestos de fórmula (I), (II), o (III), o
5 composiciones que comprenden los mismos, pueden usarse junto con un agente activo en los métodos de tratamiento.

El agente activo puede ser un agente que tenga actividad contra el microorganismo. El agente activo puede ser activo
10 contra bacterias gramnegativas. El agente activo puede ser activo contra un microorganismo seleccionado de la lista dada anteriormente.

En una realización, el segundo agente activo tiene un
15 valor de MIC de 10 microgramos/ml o menos contra un microorganismo tal como *E. coli*, en ausencia del compuesto de fórmula (I), (II) o (III). El microorganismo puede ser un microorganismo seleccionado del grupo anterior.

20 Los compuestos específicos para su uso como segundos agentes activos se describen en el presente documento e incluyen:

rifampicina, rifabutina, rifalazilo, rifapentina, y rifaximin;
25 oxacilina, meticilina, ampicilina, cloxacilina, carbenicilina, piperacilina, tricarcilina, flucloxacilina, y nafcilina;
azitromicina, claritromicina, eritromicina, telitromicina, cetromicina, y solitromicina;
30 aztreonam y BAL30072;
meropenem, doripenem, imipenem, ertapenem, biapenem, tomopenem, y panipenem;

tigeciclina, omadaciclina, eravaciclina, doxiciclina, y minociclina;

ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacino, y delafloxacino;

5 ácido fusídico;

novobiocina;

teicoplanina, telavancina, dalbavancina, y oritavancina, y sales farmacéuticamente aceptables y solvatos de los mismos;

10 En una realización, los compuestos específicos para su uso como segundos agentes activos se describen en el presente documento e incluyen rifampicina, rifabutina, rifalazilo, rifapentina, rifaximin, aztreonam, oxacilina, novobiocina, ácido fusídico, azitromicina, ciprofloxacina, meropenem,
15 tigeciclina, eritromicina, claritromicina y mupirocina, y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En un aspecto alternativo, los compuestos de fórmula (I) son adecuados para su uso en el tratamiento de infecciones
20 fúngicas, por ejemplo, en combinación junto con un agente antifúngico. El agente antifúngico puede seleccionarse de un polieno antifúngico, por ejemplo, anfotericina B, un imidazol, triazol, o tiazol antifúngico, por ejemplo, miconazol, fluconazol o abafungina, una alilamina, una equinocandina, u
25 otro agente, por ejemplo ciclopirox.

Tratamiento

El término "tratamiento", cuando se usa en el contexto
30 del tratamiento de una afección, se refiere generalmente al tratamiento y terapia, ya sea de un ser humano o un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en el que se consigue

algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la afección, e incluye una reducción en la velocidad de progreso, un alto en la velocidad de progreso, el alivio de los síntomas de la afección, la mejora de la afección y la cura de la afección. También se incluye el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis). Por ejemplo, el uso con pacientes que aún no han desarrollado la afección, pero que están en riesgo de desarrollarla, está incluido en el término "tratamiento".

10

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se utiliza en el presente documento, se refiere a esa cantidad de un compuesto, o un material, composición o forma de dosificación que comprende un compuesto, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, proporcionado con una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra de acuerdo con un régimen de tratamiento deseado.

15

El término "tratamiento" incluye tratamientos y terapias de combinación, como se describe en el presente documento, en las que se combinan dos o más tratamientos o terapias, por ejemplo, de forma secuencial o simultánea.

20

Terapia de combinación

25

Un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) se puede administrar junto con un agente activo. La administración puede ser simultánea, por separado o secuencial.

30

Los métodos y la forma de administración dependerán de la farmacocinética del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) y el segundo agente activo.

Por administración "simultánea", se entiende que un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) y un segundo agente activo se administran a un sujeto en una dosis única por la misma vía de administración.

5

Por administración "separada", se entiende que un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) y un segundo agente activo se administran a un sujeto por dos vías de administración diferentes que ocurren al mismo tiempo. Esto
10 puede ocurrir, por ejemplo, cuando un agente se administra por infusión y el otro se administra por vía oral durante el transcurso de la infusión.

Por "secuencial" se entiende que los dos agentes se
15 administran en diferentes puntos en el tiempo, siempre que la actividad del primer agente administrado esté presente y en curso en el sujeto en el momento en que se administra el segundo agente activo.

20 Generalmente, se producirá una dosis secuencial de tal forma que el segundo de los dos agentes se administre en 48 horas, tal como en 24 horas, tal como en 12, 6, 4, 2 o 1 horas del primer agente. Como alternativa, el agente activo se puede administrar primero, seguido del compuesto de fórmula (I), (II)
25 o (III).

En última instancia, el orden y el momento de la administración del compuesto y el segundo agente activo en el tratamiento de combinación dependerán de las propiedades
30 farmacocinéticas de cada uno.

La cantidad del compuesto de fórmula (I), (II) o (III)

que se administrará a un sujeto dependerá en última instancia de la naturaleza del sujeto y de la enfermedad a tratar. Asimismo, la cantidad de agente activo que se administrará a un sujeto dependerá en última instancia de la naturaleza del
5 sujeto y de la enfermedad a tratar.

Formulaciones

En un aspecto, la presente invención proporciona una
10 composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un segundo agente activo. En una realización alternativa, cuando se proporciona un segundo agente activo
15 para su uso en terapia, el segundo agente activo puede formularse por separado a partir del compuesto de fórmula (I), (II) o (III). Por lo tanto, los comentarios a continuación hechos en relación con el compuesto de fórmula (I), (II) o (III) también pueden aplicarse al segundo agente activo, según
20 se formuló por separado.

Si bien es posible que el compuesto de fórmula (I), (II) o (III) se administre solo o junto con el segundo agente activo, es deseable presentarlo como una formulación farmacéutica (por
25 ejemplo, composición, preparación, medicamento) que comprenda al menos un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), como se describe en el presente documento, junto con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación,
30 vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizantes, solubilizantes,

tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascarantes, agentes colorantes, agentes saporíferos y agentes edulcorantes farmacéuticamente aceptables. La formulación puede comprender además otros agentes activos, por
5 ejemplo, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

Por lo tanto, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas, como se ha definido anteriormente, y métodos para preparar una composición
10 farmacéutica que comprende mezclar al menos un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), como se describe en el presente documento, junto con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, vehículos, diluyentes, excipientes, etc. Si se
15 formulan como unidades discretas (por ejemplo, comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosificación) del compuesto. La composición opcionalmente comprende además el segundo agente activo en una cantidad predeterminada.

20

La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en el presente documento, se refiere a compuestos, ingredientes, materiales, composiciones, formas farmacéuticas, etc., que son, dentro del alcance del buen criterio médico,
25 adecuados para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, un ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, un diluyente, excipiente, etc.
30 también debe ser «aceptable» en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Los vehículos, diluyentes, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; y Handbook of
5 Pharmaceutical Excipients, 5ª edición, 2005.

Las formulaciones se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto de fórmula
10 (I) o (II) con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el principio con vehículos (por ejemplo, vehículos líquidos, vehículo sólido finamente dividido, etc.), y luego dando forma al producto, en caso de
15 necesitarse.

La formulación puede prepararse para proporcionar una liberación rápida o lenta; liberación inmediata, retrasada, temporalizada o sostenida; o una combinación de los mismos.
20

Las formulaciones pueden estar adecuadamente en forma de líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), elixires,
25 jarabes, electuarios, enjuagues bucales, gotas, comprimidos (incluyendo, por ejemplo, comprimidos revestidos), gránulos, polvos, pastillas para chupar, pastillas, cápsulas (incluyendo, por ejemplo, cápsulas duras y blandas de gelatina), sellos, píldoras, ampollas, bolos, supositorios,
30 pesarios, tinturas, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, espumas, pulverizadores, brumas o aerosoles.

Las formulaciones pueden proporcionarse adecuadamente como un parche, emplasto adhesivo, vendaje, apósito, o similares, que está impregnado con uno o más compuestos, y opcionalmente uno o más ingredientes farmacéuticamente
5 aceptables, incluyendo, por ejemplo, mejoradores de la penetración, la permeación y la absorción. Las formulaciones también pueden proporcionarse adecuadamente en forma de un depósito o reservorio.

10 El compuesto puede disolverse, suspenderse o mezclarse con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto puede presentarse en un liposoma u otra micropartícula que esté diseñada para dirigir el compuesto, por ejemplo, a componentes sanguíneos o a uno o más órganos.
15 Cuando se usa un liposoma, se observa que el liposoma puede contener tanto el compuesto de fórmula (I), (II), (III), como un segundo agente activo.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral
20 (por ejemplo, por ingestión) incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), elixires, jarabes, electuarios, comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, sellos, píldoras, ampollas, bolos.

25

Las formulaciones adecuadas para la administración bucal incluyen enjuagues bucales, pastillas para chupar, pastillas, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservorios. Las pastillas para chupar típicamente comprenden el compuesto
30 en una base con sabor, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto. Las pastillas comprenden típicamente el compuesto en una matriz inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa

y acacia. Los enjuagues bucales comprenden típicamente el compuesto en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones adecuadas para la administración sublingual incluyen comprimidos, pastillas para chupar, pastillas, cápsulas y píldoras.

Las formulaciones adecuadas para la administración transmucosa oral incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), enjuagues bucales, pastillas para chupar, pastillas, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservorios.

Las formulaciones adecuadas para la administración transmucosa no oral incluyen líquidos, soluciones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), suspensiones (por ejemplo, acuosas, no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua, agua en aceite), supositorios, pesarios, geles, pastas, pomadas, cremas, lociones, aceites, así como parches, emplastos adhesivos, depósitos y reservorios.

Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica incluyen geles, pastas, pomadas, cremas, lociones y aceites, así como parches, emplastos adhesivos, vendajes, aderezos, depósitos y reservorios.

Los comprimidos pueden fabricarse por medios convencionales, por ejemplo, compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos de compresión pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el compuesto en forma fluida como polvo o

gránulos, opcionalmente mezclado con uno o más aglutinantes (por ejemplo, povidona, gelatina, goma arábica, sorbitol, tragacanto, hidroxipropilmetilcelulosa); cargas o diluyentes (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de 5 hidrógeno y calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice); desintegrantes (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada); agentes de superficie activa o dispersantes o humectantes (por ejemplo, lauril 10 sulfato de sodio); conservantes (por ejemplo,, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, ácido sórbico); aromas, agentes potenciadores del sabor, y edulcorantes. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse por moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en 15 polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden revestir o marcar opcionalmente y se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del compuesto en el mismo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para 20 proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos pueden proporcionarse opcionalmente con un revestimiento, por ejemplo, para afectar a la liberación, por ejemplo, un revestimiento entérico, para proporcionar una liberación en partes del intestino distintas del estómago.

25

Las pomadas se preparan típicamente a partir del compuesto y una base de pomada parafínica o miscible en agua.

Las cremas se preparan típicamente a partir del compuesto 30 y una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 % p/p de un alcohol polihídrico, es

decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol, y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir, a ser posible, un compuesto que
5 potencie la absorción o la penetración del compuesto a través de la piel u otras zonas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

10 Las emulsiones se preparan típicamente a partir del compuesto y una fase oleosa, que puede comprender opcionalmente simplemente un emulsionante (también conocido como un agente emulsionante), o puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con una grasa y un
15 aceite. Un emulsionante hidrófilo puede incluirse junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. También es posible incluir tanto un aceite como una grasa. Conjuntamente, el emulsionante (o emulsionantes) con o sin el estabilizador (o estabilizadores) constituyen la denominada cera emulsionante y la cera junto con el aceite y/o la grasa
20 constituyen la denominada base de pomada emulsionante que forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones de crema.

Los emulgentes y estabilizantes de emulsión adecuados
25 incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetoestearílico, alcohol miristílico, monostearato de glicerilo y lauril sulfato sódico. La elección de los aceites o grasas adecuados para la formulación es a base de lograr las propiedades cosméticas deseadas, ya que la solubilidad del compuesto en la mayoría de
30 los aceites que probablemente se usarán en formulaciones de emulsión farmacéutica puede ser muy baja. Por lo tanto, la crema debería ser un producto no graso, que no manche y lavable,

con la consistencia adecuada para evitar la filtración desde tubos u otros contenedores. Pueden usarse ésteres de alquilo de cadena lineal o ramificada, mono o dibásicos como di-isoadipato, estearato de isocetilo, propilenglicol diéster
5 de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP. Estos pueden usarse solos o en combinación, dependiendo de las propiedades requeridas. Como
10 alternativa, pueden usarse lípidos de elevado punto de fusión tales como parafina blanca blanda y/o parafina líquida, u otros aceites minerales.

Las formulaciones adecuadas para la administración
15 intranasal, donde el vehículo es un líquido, incluyen, por ejemplo, aerosol nasal, gotas nasales, o mediante la administración de aerosol por nebulizador, incluyen soluciones acuosas o aceitosas del compuesto. Como método alternativo de administración, se puede usar una administración de polvo seco
20 como alternativa a los aerosoles nebulizados.

Las formulaciones adecuadas para la administración intranasal, donde el vehículo es un sólido, incluyen, por ejemplo, las que se presentan como un polvo grueso que tiene
25 un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 micrómetros que se toma de la manera en que se administra el rapé, es decir, mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales a partir de un envase con el polvo sujetado cerca de la nariz.

30

Las formulaciones adecuadas para la administración pulmonar (por ejemplo, por inhalación o terapia de insuflación)

incluyen las que se presentan como un aerosol en aerosol de un paquete presurizado, con el uso de un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados.

5 Además, o como alternativa, una formulación para administración pulmonar puede formularse para la administración desde un nebulizador o un inhalador de polvo seco. Por ejemplo, la formulación puede estar dotada de vehículos o liposomas para proporcionar un tamaño de partícula adecuado para alcanzar las
10 partes apropiadas del pulmón, para ayudar a la administración de una dosis apropiada para mejorar la retención en el tejido pulmonar.

Las formulaciones adecuadas para administración ocular
15 incluyen gotas oculares en las que el compuesto se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el compuesto.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal
20 pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato; o como solución o suspensión para tratamiento por enema.

25

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen además del compuesto, los vehículos que se conocen en la técnica como
30 apropiados.

Las formulaciones adecuadas para la administración

parenteral (por ejemplo, por inyección o infusión, por vía intravenosa o subcutánea), incluyen líquidos estériles, acuosos o no acuosos, isotónicos, libres de pirógenos, (por ejemplo, soluciones, suspensiones), en los que el compuesto se

5 disuelve, suspende o proporciona de otro modo (por ejemplo, en un liposoma u otra micropartícula). Dichos líquidos pueden contener adicionalmente otros ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, agentes de suspensión,

10 agentes espesantes y solutos que presentan la formulación isotónica con la sangre (u otro fluido corporal relevante) del recipiente deseado. Ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, azúcares, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares. Ejemplos de vehículos isotónicos

15 adecuados para su uso en dichas formulaciones incluyen inyección de cloruro de sodio, solución de Ringer, o inyección de Ringer lactada. Típicamente, la concentración del compuesto en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 500 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 1 ng/ml a

20 aproximadamente 100 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y

25 se pueden almacenar en un estado deshidratado por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y

30 comprimidos estériles.

Dosificación

Generalmente, los métodos de la invención pueden comprender administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) para proporcionar un efecto antimicrobiano. El compuesto de fórmula (I), (II) o (III) se puede administrar en una cantidad suficiente para potenciar la actividad de un segundo agente activo. El segundo agente activo se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para proporcionar un efecto antimicrobiano.

Un experto en la técnica apreciará que las dosificaciones apropiadas del compuesto de fórmula (I), (II) o (III) o el agente activo, y las composiciones que comprenden el compuesto de fórmula (I), (II) o (III) o el agente activo, pueden variar de paciente a paciente. La determinación de la dosificación óptima generalmente implicará el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores que incluyen, pero sin limitación, la actividad del compuesto particular de fórmula (I), (II) o (III) o el agente activo, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, la gravedad de la afección y la especie, el sexo, la edad, el peso, la afección, la salud en general y el historial médico previo del paciente. La cantidad de compuesto de fórmula (I), (II) o (III) o el agente activo y la vía de administración serán finalmente a criterio del médico, veterinario, o clínico, aunque se seleccionará generalmente la dosificación para conseguir concentraciones locales en el sitio de acción que consiguen el efecto deseado sin causar efectos secundarios dañinos o perjudiciales considerables.

La administración puede efectuarse en una dosis, continua o intermitentemente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos adecuados) durante el transcurso del tratamiento. Los métodos para determinar los medios y dosificaciones de administración más eficaces son bien conocidos para los expertos en la técnica y variarán con la formulación usada para la terapia, la finalidad de la terapia, la célula o células diana a tratar y el sujeto que se va a tratar. Las administraciones únicas o múltiples pueden llevarse a cabo con el nivel de dosis y el patrón a seleccionar por el tratamiento médico, veterinario o clínico.

En general, una dosis adecuada de un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) o el agente activo está en el intervalo de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 250 mg (más típicamente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 25 mg) por kilogramo de peso corporal del sujeto al día. Cuando el compuesto de fórmula (I), (II) o (III) o el agente activo es una sal, un éster, una amida, un profármaco, o similares, la cantidad administrada se calcula sobre la base del compuesto precursor y, por lo tanto, el peso real a usar se aumenta proporcionalmente.

Kits

Un aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende (a) un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), o una composición que comprende un compuesto como se define en una cualquiera de las fórmulas (I), (II) o (III), por ejemplo, típicamente proporcionado en un contenedor adecuado y/o con un envase adecuado; y (b) instrucciones de uso, por ejemplo, instrucciones escritas sobre cómo administrar el compuesto o

la composición.

Las instrucciones escritas también pueden incluir una lista de indicaciones para las cuales el compuesto de fórmula (I), (II) o (III) es un tratamiento adecuado.

En una realización, el kit comprende además (c) un segundo agente activo, o una composición que comprende el segundo agente activo. En este caso, las instrucciones escritas también pueden incluir una lista de indicaciones para las cuales el segundo agente activo, junto con el compuesto de fórmula (I), (II) o (III), es adecuado para el tratamiento.

Vías de administración

Un compuesto de fórmula (I), (II) o (III), un segundo agente activo, o una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I), (II) o (III), o el segundo agente activo pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración conveniente, ya sea sistémica/periféricamente o tópicamente (es decir, en el sitio de la acción deseada).

Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, oral (por ejemplo, por ingestión); bucal; sublingual; transdérmica (que incluye, por ejemplo, por un parche, escayola, etc.); transmucosal (que incluye, por ejemplo, por un parche, escayola, etc.); intranasal (por ejemplo, por pulverización nasal); ocular (por ejemplo, con gotas para los ojos); pulmonar (por ejemplo, por terapia de inhalación o insuflación usando, por ejemplo, a través de un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o la nariz); rectal (por ejemplo, por supositorio o enema); vaginal (por ejemplo, por pesario);

parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, incluyendo vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbital, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea e intraesternal; por implante de un depósito o un reservorio, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular.

El sujeto/paciente

El sujeto/paciente puede ser un cordado, un vertebrado, un mamífero, un mamífero placentario, un marsupial (por ejemplo, canguro, wombat), un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), aviar (por ejemplo, un pájaro), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), porcino (por ejemplo, un cerdo), ovino (por ejemplo, una oveja), bovino (por ejemplo, una vaca), un primate, simio (por ejemplo, un mono o macaco), un mono (por ejemplo, mono tití, babuíno), un macaco (por ejemplo, gorila, un chimpancé, orangután, gibón) o un ser humano. Adicionalmente, el sujeto/paciente puede ser cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo, un feto.

En una realización, el sujeto/paciente es un ser humano. También se prevé que la invención se pueda poner en práctica en un animal no humano que tiene una infección microbiana. Un mamífero no humano puede ser un roedor. Los roedores incluyen ratas, ratones, cobayas, chinchillas y otros roedores pequeños de tamaño similar utilizados en investigaciones de laboratorio.

Otras opciones

Todas y cada una de las combinaciones compatibles de las realizaciones descritas anteriormente se divulgan explícitamente en el presente documento, como si todas y cada una de las combinaciones se citaran individual y explícitamente.

Diversos aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación.

" y/o" cuando se usa en el presente documento debe tomarse como descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin la otra. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B e (iii) A y B, como si cada uno de ellos se expusiera individualmente en el presente documento.

20

A menos que el contexto indique otra cosa, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención, y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen. Cuando se pueden combinar realizaciones técnicamente apropiadas y, por lo tanto, la divulgación se extiende a todas las permutaciones y combinaciones de las realizaciones se proporcionan en el presente documento.

30

Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las

figuras descritas anteriormente.

Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención, como se describe en el presente documento.

10 *Abreviaturas*

Abreviatura	Significado
PMBN	nonapéptido de Polimixina B
PMB	Polimixina B
Thr	Treonina
Ser	Serina
DSer	D-serina
Leu	Leucina
Ile	Isoleucina
Phe	Fenilalanina
DPhe	D-fenilalanina
Val	Valina
Dab	Ácido α,γ -diaminobutírico
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
HATU	hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1-3,3-tetrametiluronio
DCM	diclorometano
TFA	Ácido trifluoroacético
ND	No determinado
N/A	No aplicable
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida

Abreviatura	Significado
PMBH	Heptapéptido de polimixina B (3-10)
PMBD	Decapéptido de Polimixina B
Pro	Prolina
Dap	Ácido α,β -diaminopropiónico
Gly	Glicina
NorLeu	Norleucina
Ruphos	2-Diciclohexilfosfino-2',6'- diisopropoxibifenilo
Xphos	2-Diciclohexilfosfino- 2',4',6'- triisopropilbifenilo
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonilo
Cbz	Benciloxicarbonilo
HCTU	hexafluorofosfato de O-(1H- 6-clorobenzotriazol-1-il)- 1,1,3,3-tetrametiluronio
Boc	<i>terc</i> -Butiloxicarbonilo
PyBOP	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1- iloxi)tripirrolidinofosfonio
NMM	<i>N</i> -Metil morfolina
THF	Tetrahidrofurano
ivDde	1-(4,4-Dimetil -2,6- dioxociclohex-1-ilideno)-3- metilbutilo
DPPA	Difenilfosforil azida
TIS	Tri-isopropil silano

Abreviatura**Significado**

HOBt

1-Hidroxibenzotriazol

IPA

Isopropanol

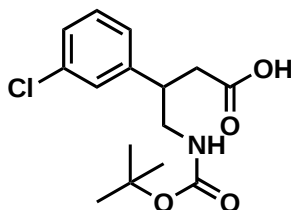
Ejemplos de síntesis*Síntesis de ácidos N-terminales*

5

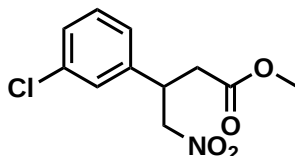
En el presente trabajo, se usaron ácidos 4-aminobutanoicos 3-sustituídos en forma adecuadamente protegida. La síntesis de aminoácidos no estándar se detalla a continuación, junto con la metodología para la separación de enantiómeros

10

Ácido 4-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico - Isómero 1 e Isómero 2



(i) 3-(3-clorofenil)-4-nitrobutanoato de metilo



15

Una mezcla de ácido 3-clorocinnámico (10 g), metanol (100 ml) y ácido sulfúrico concentrado (4 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla se evaporó a sequedad y los residuos se repartieron entre diclorometano (DCM) y agua. La fase acuosa se separó y se extrajo con más cantidad de DCM. Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron a sequedad, produciendo el éster metílico en forma de un sólido de color blanco (10,19 g). Este sólido se disolvió en nitrometano (32 ml) y se trató con 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) (8,5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante

20

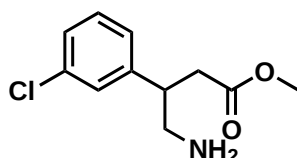
25

20 h, después se evaporó a sequedad y los residuos se repartieron entre HCl acuoso 0,5 M y éter dietílico. La fase acuosa se separó y se extrajo con más cantidad de éter dietílico. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron a sequedad. Los residuos se purificaron sobre sílice, eluyendo con hexano y acetato de etilo (0-100 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron a sequedad, produciendo el producto deseado en forma de un aceite de color amarillo (9,93 g, rendimiento del 70 %).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 2,71-2,79 (2H, m), 3,66(3H, s), 3,93-4,01 (1H, m), 4,62 y 4,73 (2H, ABc, aparece como 2x dd, J 12,8, 8,0 Hz), 7,11-7,28 (4H, m).

15

(ii) 4-amino-3-(3-clorofenil)butanoato de metilo



A una solución de 3-(3-clorofenil)-4-nitrobutanoato de metilo (9,93 g) en ácido acético (90 ml) agitada a aprox. 0 °C se le añadió en porciones polvo de cinc (20,1 g) -(precaución: exotermia retardada). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente, con agitación durante 19 h. La mezcla se evaporó a sequedad y los residuos se repartieron entre NaHCO_3 acuoso y acetato de etilo. Después, la mezcla se filtró a través de Celite y las fases acuosas y orgánicas se separaron. La fase acuosa se extrajo de nuevo con más cantidad de acetato de etilo. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron a sequedad, produciendo el producto deseado en forma de un aceite de color naranja (4,80 g).

(iii) Compuesto del título - racémico

Una mezcla de 4-amino-3-(3-clorofenil)butanoato de metilo (4,80 g), dicarbonato de di-*terc*-butilo (5,28 g) y 5 diclorometano (100 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se evaporó a sequedad y los residuos se purificaron sobre sílice, eluyendo con éter de petróleo al 40-60 y acetato de etilo (0-100 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron a sequedad, produciendo 10 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoato de éster metílico Boc-protegido en forma de un sólido de color crema (2,59 g).

Una mezcla de 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3- 15 clorofenil)butanoato de metilo (2,49 g), hidróxido de litio (546 mg), 1,4-dioxano (40 ml) y agua (40 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 64 h. Después, la mezcla se evaporó a sequedad. Los residuos se disolvieron en agua, se neutralizaron con HCl acuoso 1 M y se extrajeron con acetato 20 de etilo ($\times 2$). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron a sequedad, produciendo el producto deseado en forma de un aceite de color amarillo (2,51 g).

25 m/z 314 (MH^+) $C_{15}H_{20}ClNO_4$ requiere 313,11. 1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 1,40 (9H, s), 2,42-2,73 (2H, m), 3,24-4,49 (4,4 H, m, incluye CH_3OD , CH_2 , y CH), 7,17-7,38 (4H, m).

(iv) Compuesto del título - separación de isómeros - método 1

30 Se disolvió ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (2,09 g) hasta 60 mg/ml en metanol, y después se purificó por SFC usando las condiciones descritas a

continuación (condiciones de separación preparativa 1). Las fracciones combinadas que contenían el isómero enriquecido 1 (ejecución más rápida) y el isómero 2 (ejecución más lenta) se combinaron, se concentraron y cada uno se purificó de nuevo individualmente en las mismas condiciones de cromatografía.

Después, las fracciones combinadas de cada uno del isómero 1 y el isómero 2 se evaporaron casi hasta sequedad utilizando un evaporador rotatorio, se transfirieron en recipientes finales con DCM, que se eliminó retiró en una corriente de nitrógeno a 40 °C antes de almacenarse en un horno de vacío a 40 °C y 5 mbar durante 16 horas.

Ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (isómero 1)

Sólido de color blanco, 883 mg, 95,6 % de e.e. Tiempo de retención 2,89 min en el sistema analítico 1.

Ácido 4-((*terc*-Butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (isómero 2)

Sólido de color blanco, 876 mg, 98,6 % de e.e. Tiempo de retención 3,29 min en el sistema analítico 1.

Condiciones de separación preparativa 1:

Berger Multigram II SFC

Detalles de la columna: Lux A1 (Phenomenex, 21,2 mm × 250 mm, 5 µm)

Temperatura de la columna: 40 °C

Caudal: 50 ml/min

BPR: 125 BarG

Longitud de onda del detector: 210 nm

Volumen de inyección: 300 µl (18 mg)

Condiciones isocráticas: 12:88 de EtOH: CO₂ (NH₃ al 0,1% v/v)

Condiciones de análisis 1:

Waters UPC2

Detalles de la columna: Lux C4 (Phenomenex, 4,6 mm × 250 mm, 5 µm)

5 Temperatura de la columna: 40 °C

Caudal: 4 ml/min

Longitud de onda del detector: 210-400 nm

Volumen de inyección: 1,0 µl

BPR: 125 BarG

10 Condiciones isocráticas: 10:90 de EtOH:CO₂ (NH₃ al 0,1 % v/v)

(v) Compuesto del título - separación de isómeros - método 2

Ácido 4-((*terc*-Butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico purificado por SFC usando las condiciones

15 descritas a continuación (condiciones de separación preparativa 2). Tras la separación, las fracciones se eliminaron por secado a través de un evaporador rotatorio a una temperatura de baño de 40 °C para obtener los enantiómeros separados deseados. El enantiómero de ejecución lenta se
20 purificó adicionalmente en la misma columna eluyendo con el 20 % de B.

Condiciones de separación preparativa 2:

25 Instrumento: Thar 200 preparative SFC (SFC-10)

Columna: ChiralPak AY, 300 × 50 mm de D.I., 10 µm

Fase móvil: A para CO₂ y B para IPA

Gradiente: B al 25 %

Caudal: 200 ml/min

30 Contrapresión: 100 bar

Temperatura de la columna: 38 °C

Longitud de onda: 220 nm

Tiempo de ciclo: ~4,5 min

Condiciones analíticas 2:

Instrumento: Waters UPC2 analytical SFC (SFC-H)

Columna: ChiralPak AY, 150 × 4,6 mm de D.I., 3 µm

5 Fase móvil: A para CO₂ y B para IPA (DEA al 0,05 %)

Gradiente: B al 5-40 %

Caudal: 2,5 ml/min

Contrapresión: 100 bar

Temperatura de la columna: 40 °C

10 Longitud de onda: 220 nm

Ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (isómero 1)

Tiempo de retención 2,796 min. Asignada la estereoquímica (*R*) por comparación con el isómero (2) a continuación

15 Ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (isómero 2).

Tiempo de retención 3,264 min. Asignada la estereoquímica (*S*) por cristalografía de molécula pequeña del material BOC-desprotegido, como se describe a continuación.

20

(vi) Confirmación de estereoquímica

Sal trifluoroacetato del ácido (S)-4-amino-3-(3-clorofenil)butanoico

25

A una mezcla enfriada con hielo-agua de ácido 4-((*terc*-butoxicarbonilamino)-3-(3-clorofenil)butanoico isómero 2 (Tiempo de retención 3,264 min en el método de análisis 2) (1,5 g, 4,78 mmol) en diclorometano (20 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (5 ml). Después de la adición, la mezcla se agitó a esta temperatura durante 4 horas. Después, la mezcla

30

de reacción se concentró. La mezcla en bruto se disolvió en agua (10 ml) y se liofilizó para proporcionar el producto; Sal TFA del ácido (S)-4-amino-3-(3-clorofenil)butanoico (1,5 g, rendimiento del 95 %). LC-MS: m/z 214 (M+H)⁺

5

Ácido (S)-4-amino-3-(3-clorofenil)butanoico

A una solución de la sal del ácido trifluoroacético de ácido (S)-4-amino-3-(3-clorofenil)butanoico (0,5 g, 1,53 mmol) en agua (10 ml), se le añadió hidróxido de amonio ac. diluido hasta que el pH llegó a 7. La solución resultante se almacenó en un matraz abierto de 25 ml y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 día. Tras la cristalización, las aguas madre se decantaron, y los cristales sólidos se sometieron a estudios de difracción de rayos X.

Los estudios de difracción de rayos X mostraron que el compuesto tenía la estereoquímica (S).

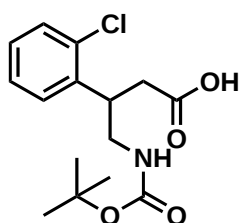
20 Condiciones de difracción de rayos X:

Se utilizó el difractómetro Bruker APEX-II CCD.

El cristal se mantuvo a 302,71 K durante la recolección de datos. Usando Olex2 (Dolomanov et al.), la estructura se resolvió con el programa de solución de estructuras ShelXT [2] (Sheldrick A71) utilizando la fase de fase intrínseca y se refinó con el paquete de refinamiento ShelXL [3] utilizando la minimización de mínimos cuadrados (Sheldrick C71).

30

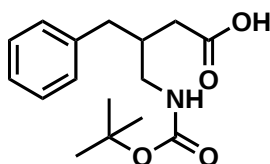
Ácido 4-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-(2-clorofenil)butanoico



El compuesto se preparó a partir de ácido 2-clorocinnámico siguiendo la metodología del ácido 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico como se describe en las etapas (i) a (iii) anteriores. El compuesto se obtuvo en forma de un aceite incoloro.

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

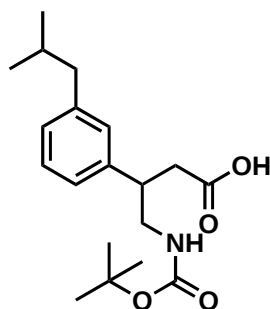
10 Ácido 3-bencil-4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)butanoico



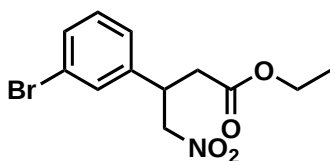
3-Bencil-4-nitrobutanoato de metilo (*Tetrahedron Asymmetry*, **19**, 2008, 945) se convirtió en el compuesto del título siguiendo la metodología del ácido 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico como se describe en las etapas (i) a (iii) anteriores.

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

20 Ácido 4-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-isobutilfenil)butanoico



(i) 3-(3-bromofenil)-4-nitrobutanoato de etilo



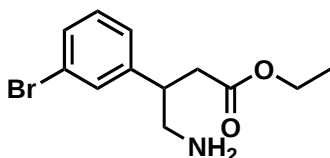
Una mezcla de hidruro sódico (60%) en aceite mineral (394,26 mg, 9,86 mmol) y 1,2-dimetoxietano (22,5 ml) (DME) se enfrió a 0°C. Se añadió gota a gota trietilfosfonoacetato (10,2
5 ml, 51,43 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 min. Una solución de 3-bromobenzaldehído (1,0 ml, 8,57 mmol) en DME (5 ml) se añadió gota a gota. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se calentó a reflujo durante 3 h.

10 La mezcla se evaporó a sequedad y los residuos se repartieron entre hexano y agua. La capa acuosa se separó y se extrajo con más cantidad de hexano. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua, se secaron con MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a sequedad. Los residuos se
15 purificaron sobre sílice eluyendo con éter de petróleo 40-60 y acetato de etilo (0-100 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron a sequedad, produciendo (*E*)-3-(3-bromofenil)prop-2-enoato de etilo en forma de un sólido de color blanco (1,44 g, 65%). Esto se convirtió en 3-(3-bromofenil)-4-nitrobutanoato de etilo usando las condiciones
20 para la nitración en la preparación de ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico en la etapa (i), como se ha descrito anteriormente, para dar el producto con un rendimiento del 60 %.

25

m/z 316, 318 (MH⁺). C₁₂H₁₄BrNO₄ requiere 315,01.

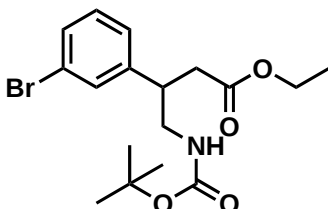
(ii) 4-Amino-3-(3-bromofenil)butanoato de etilo



El 3-(3-bromofenil)-4-nitrobutanoato de etilo (1,08 g) se convirtió en 4-amino-3-(3-bromofenil)butanoato de etilo usando las condiciones descritas anteriormente para el ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico en la etapa 5 (ii), para dar el producto con un rendimiento del 67 %.

m/z 286 y 288 (MH⁺), C₁₂H₁₆BrNO₂ masa exacta 285,04.

(iii) 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-bromofenil)butanoato de etilo

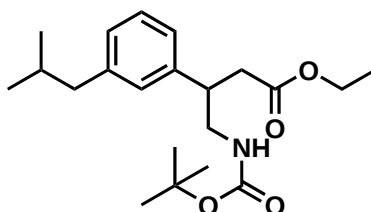


El 4-amino-3-(3-bromofenil)butanoato de etilo (655 mg) se convirtió en 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-bromofenil)butanoato de etilo en las condiciones descritas anteriormente para el ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico en la etapa (iii), para dar el producto con un rendimiento del 72 %.

m/z 386 y 388 (MH⁺), C₁₇H₂₄BrNO₄ masa exacta 385,09.

20

(iv) 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-isobutilfenil)butanoato de etilo



Una mezcla de Ruphos (48,3 mg, 0,1 mmol), fosfato potásico tribásico (330 mg, 1,55 mmol), 3-(3-bromofenil)-4-((*terc*-butoxicarbonilamino)butanoato de etilo (200 mg, 0,52 mmol) y ácido isobutilborónico (132 mg, 1,29 mmol) en tolueno (9 ml)

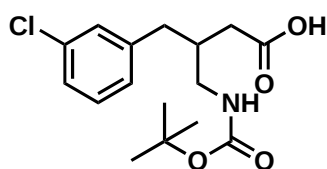
se desgasificó cuatro veces por evacuación/lavado abundante con nitrógeno antes de añadir acetato de paladio (II) (5,8 mg, 0,03 mmol). La mezcla se agitó a 110°C durante 100 min. La mezcla de reacción se dejó enfriar antes de filtrarse a través de Celite y se dejó durante una noche en solución. La mezcla se evaporó a sequedad y se purificó sobre sílice, eluyendo con éter de petróleo al 40-60 y acetato de etilo (0-100 %). Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron a sequedad, produciendo 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-isobutilfenil)butanoato de etilo en forma de un aceite incoloro, (74 mg, 39 %).

m/z 364 (MH⁺). C₂₁H₃₃NO₄ masa exacta 363,24.

15 (v) Compuesto del título

Una mezcla de 4-((*terc*-butoxicarbonilamino)-3-(3-isobutilfenil)butanoato de etilo (74 mg, 0,2 mmol) e hidróxido de litio (15 mg, 0,6 mmol) en 1,4-dioxano (3 ml) y agua (3 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se evaporó a sequedad y los residuos se repartieron entre acetato de etilo y agua. La fase orgánica se separó y se descartó. El producto acuoso se acidificó con HCl 1 M (ac.) y se extrajo con acetato de etilo (x 2). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a sequedad, produciendo ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-isobutilfenil)butanoico en forma de un aceite incoloro (65 mg). m/z 336 (MH⁺) C₁₉H₂₉NO₄ masa exacta 335,21.

30 Ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorobencil)butanoico

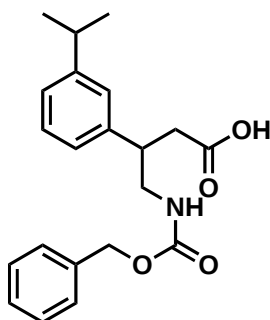


2-(3-Clorofenil) acetaldehído se convirtió en 3-(3-clorobencil)-4-nitrobutanoato de etilo como se describe para el ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-isobutilfenil)butanoico en la etapa (i), como se ha descrito anteriormente. La reducción y la protección como en la etapa (ii) y (iii), seguidas de hidrólisis como en la etapa (v) anterior, proporcionaron el compuesto del título en forma de un aceite incoloro.

10

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

Ácido 4-(((benciloxi)carbonil)amino)-3-(3-isopropilfenil)butanoico



15

Una mezcla de 4-amino-3-(3-isopropilfenil)butanoato de etilo (1,55 g, 6,21 mmol) (preparada usando la metodología del ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-isobutilfenil)butanoico en las etapas (i) a (ii), como se ha descrito anteriormente), y bicarbonato sódico (0,783 g 9,32 mmol) se disolvió en agua (10 ml) y 1,4-dioxano (5 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo, y se trató con una solución de cloroformiato de bencilo (0,98 ml, 6,84 mmol). La mezcla se agitó a 10°C durante 1 h, después se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de agitar durante 20 h, la mezcla se evaporó a sequedad, y los residuos se repartieron entre éter

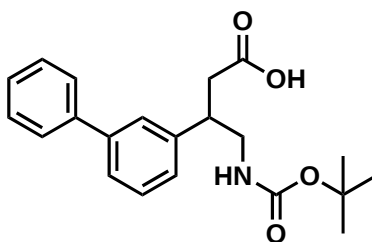
20

25

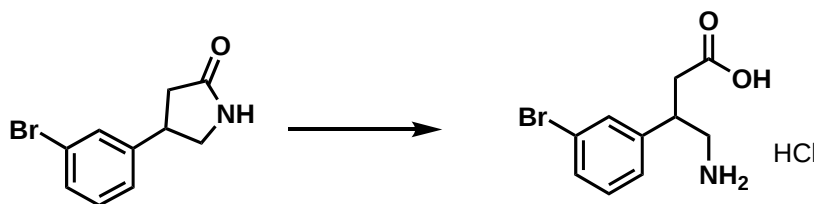
dietílico y HCl acuoso 0,5 M. La capa acuosa se separó y se extrajo con más cantidad de éter dietílico. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se evaporaron. El producto en bruto se purificó sobre sílice, eluyendo con éter de pet. al 40-60 y acetato de etilo (0-100 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron para dar un aceite de color amarillo pálido (1,74 g, 73 %). El éster etílico se hidrolizó con hidróxido de litio como se ha descrito previamente en la etapa (iii) para la preparación de ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-isobutilfenil)butanoico, seguido de cromatografía sobre sílice eluyendo con éter de petróleo al 40-60 y acetato de etilo (0-100 %) para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (60%).

m/z 356 (MH⁺). C₂₁H₂₅NO₄ masa exacta: 355,18.

Ácido 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((*terc*-butoxicarbonil)amino)metil)butanoico



(i) Clorhidrato del ácido 4-amino-3-(3-bromofenil)butanoico

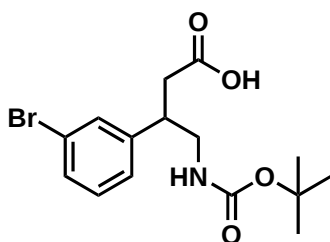


Una mezcla de 4-(3-bromofenil)pirrolidin-2-ona (1,0 g, 4,16 mmol) y HCl acuoso 6 M (15,0 ml, 90 mmol) se calentó a 100°C durante 16 h. La mezcla se evaporó a sequedad, se co-evaporó con agua, seguido de acetato de etilo y después

diclorometano (DCM), produciendo el producto deseado en forma de un sólido de color blanco, en un supuesto rendimiento cuantitativo.

5 m/z 258 y 260 (MH⁺) C₁₀H₁₂BrNO₂ masa exacta: 257,01.

(ii) ácido 3-(3-bromofenil)-4-(*terc*-
butoxicarbonilamino)butanoico



10 Una mezcla de clorhidrato del ácido 4-amino-3-(3-bromofenil)butanoico (1,31 g, 4,45 mmol), *terc*-butil carbonato de *terc*-butoxicarbonilo (Boc-O-Boc, 1,41 g, 6,45 mmol), 1,4-dioxano (8 ml) y NaOH acuoso 1 M (8,0 ml, 8 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 64 h. La mezcla se evaporó a
15 sequedad. Los residuos se disolvieron en agua, se neutralizaron con HCl acuoso 1 M y se extrajeron con acetato de etilo (× 2). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a sequedad, produciendo el producto deseado (1,60 g, 86 %) en forma de un aceite incoloro.

20

m/z 357,5 y 359,4 (MH⁺). C₁₅H₂₀BrNO₄ masa exacta: 357,06.

(iii) Compuesto del título

25 Una mezcla de ácido 3-(3-bromofenil)-4-(*terc*-butoxicarbonilamino)butanoico (2,69 g, 7,51 mmol), ácido fenilborónico (2,3 g, 18,8 mmol), acetato de paladio (II) (84 mg, 0,38 mmol), Xphos (716 mg, 1,5 mmol) y fosfato potásico tribásico (4781,9 mg, 22,53 mmol) en 1,4-dioxano (130 ml) se agitó a 100°C en una atmósfera de nitrógeno durante 2 h.

Después, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró a través de Celite, se lavó con acetato de etilo y se evaporó a sequedad. Los residuos se purificaron sobre sílice, eluyendo con éter de petróleo y acetato de etilo (0-100 %).

- 5 Las fracciones apropiadas se combinaron y se evaporaron a sequedad, produciendo el producto deseado, 1,44 g, en forma de un sólido de color gris (rendimiento del 42 %).

m/z 355 (M^+), observado. $C_{21}H_{25}NO_4$ masa exacta: 355,18.

10 (iv) Separación quirál

Se disolvió ácido 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((*terc*-butoxicarbonil)amino)metil)butanoico (1,44 g) para dar 30 mg/ml en MeOH y después se purificó por SFC, usando el
15 método a continuación. Después, las fracciones combinadas de cada uno del isómero 1 (ejecución más rápida) y el isómero 2 (ejecución más lenta) se evaporaron casi hasta sequedad utilizando un evaporador rotatorio, se transfirieron en recipientes finales con DCM, que se retiró en una corriente de
20 aire comprimido a 40 °C antes de almacenarse en un horno de vacío a 40 °C y 5 mbar hasta un peso constante.

Ácido 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((*terc*-butoxicarbonil)amino)metil)butanoico, isómero 1. Sólido de
25 color blanco 523 mg. Tiempo de retención: (condiciones de análisis 3) 2,70 min. e.e. del 99,8 %.

Ácido 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((*terc*-butoxicarbonil)amino)metil)butanoico, isómero 2. Sólido de
30 color blanco 537 mg. Tiempo de retención: (condiciones de análisis 3) 3,46 min. e.e. del 99,8 %.

Condiciones de purificación 3:

Berger Multigram II SFC

5 Detalles de la columna: Lux A1 (Phenomenex, 21,2 mm × 250 mm, 5 µm)

Temperatura de la columna: 40°C

Caudal: 50 ml/min

BPR: 100 BarG

Longitud de onda del detector: 215 nm

10 Volumen de inyección: 1,000 µl (30 mg)

Condiciones isocráticas: 15:85 de EtOH:CO₂ (NH₃ al 0,2 % v/v)

Condiciones de análisis 3:

15

Waters UPC2

Detalles de la columna: Amy-C (YMC GmbH, 4,6 mm × 250 mm, 5 µm)

Temperatura de la columna: 40 °C

20 Caudal: 4 ml/min

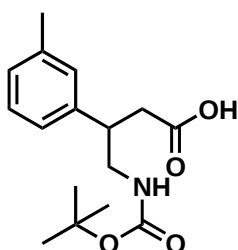
Longitud de onda del detector: 210-400 nm

Volumen de inyección: 1,0 µl

BPR: 125 BarG

25 Condiciones isocráticas: 15:85 de EtOH:CO₂ (NH₃ al 0,2 % v/v)

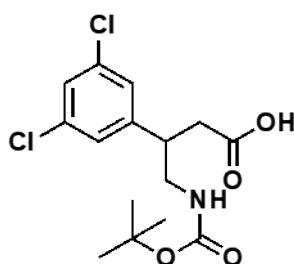
Ácido 4-((terc-butoxicarbonil)amino)-3-(3-metilfenil)butanoico



Se convirtió 4-(3-metilfenil)pirrolidin-2-ona en el compuesto del título usando la metodología descrita anteriormente para la preparación de ácido 4-([1,1'-bifenil]-3-il)-3-(((*terc*-butoxicarbonil)amino)metil)butanoico en las 5 etapas (i) a (ii). El compuesto del título se obtuvo en forma de un aceite incoloro.

m/z 294 (MH⁺). C₁₆H₂₃NO₄ masa exacta 293,16.

Ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3,5-
10 diclorofenil)butanoico

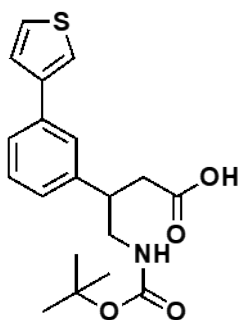


3,5-Diclorobenzaldehído se convirtió en el compuesto del título usando la metodología descrita anteriormente para la preparación de ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-
15 isobutilfenil)butanoico en las etapas (i) a (iii). El éster etílico se hidrolizó como se describe para la etapa (v) en la preparación de ácido (3-isobutilfenil)butanoico, para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite incoloro.

20

m/z 348. (MH⁺). C₁₅H₁₉Cl₂NO₄ masa exacta 347,07.

Ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-(tiofen-3-
il)fenil)butanoico



25 Se hizo reaccionar 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-

bromofenil)butanoato de etilo (207 mg, 0,54 mmol) con ácido 3-tienilborónico usando la metodología descrita anteriormente para la preparación de ácido (3-isobutilfenil)butanoico en la etapa (iv). El producto se hidrolizó como se describe en la
5 etapa (v) para proporcionar el compuesto del título en forma de un aceite incoloro.

m/z 362 (MH⁺). C₁₉H₂₃NO₄S masa exacta 361,13.

10 *Nonapéptidos de polimixina intermedios y compuestos de producto*

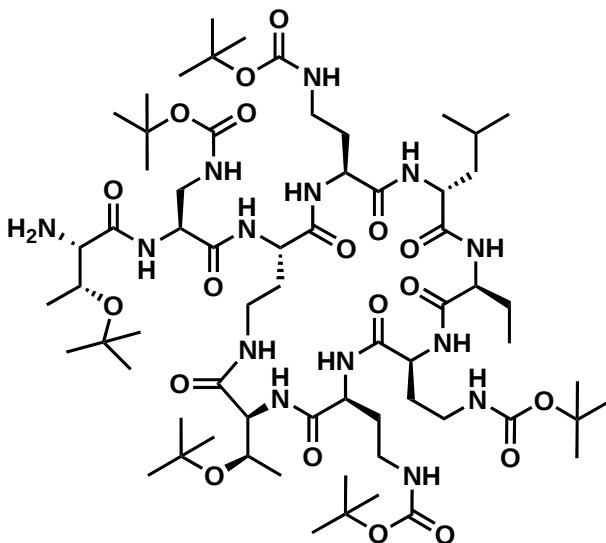
Intermedio 1: H-Thr(O-tBu)-Dap(BOC)-Ciclo[Dab-Dab(BOC)-DPhe-Leu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr]

Descrito previamente en el documento W0 2015/135976 como el Intermedio 11 - Tetra-(N-Boc)-L-Thr(O-tBu)-L-Dap-Polimixina
15 B heptapéptido.

Intermedio 2: H-Thr(O-tBu)- Dap(BOC)-Ciclo[Dab-Dab(BOC)-Leu-Leu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr]

Descrito previamente en el documento W0 2015/135976 como
20 el Intermedio 14 - Tetra-(N-Boc)-L-Thr(O-tBu)-L-Dap-Polimixina E heptapéptido.

Intermedio 3: H-Thr(O-tBu)- Dap(BOC)-Ciclo[Dab-Dab(BOC)-Dleu-L-Abu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr(O-tBu)]



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

El péptido lineal CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Dab(ivDde)-
5 Dab(Boc)-DLeu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu) se preparó sobre resina por síntesis peptídica de fase sólida usando química Fmoc, usando la metodología del Método general 3 descrito anteriormente. La secuencia comenzó con resina de cloruro de clorotritilo (CTC) (2,0 g), cargada previamente con
10 Fmoc-Thr(tBu)-OH a una carga de 0,75 mmol/g. El péptido unido a resina (3,93 g, correspondientes a 1,5 mmol) se puso en un matraz cónico de 500 ml y se trató con hidrazina al 4 % en DMF (100 ml). La mezcla se puso en un agitador y se agitó suavemente durante 30 min. La mezcla se vertió en una columna sinterizada,
15 después se lavó con DMF (3 × 100 ml). Se aplicó aire comprimido para eliminar las últimas trazas de DMF. Después, el procedimiento se repitió con THF y con DCM.

Después, la resina se trató con 4:1 de DCM:
20 hexafluoroisopropanol (100 ml) para escindir el péptido de la resina. Después de 30 min, la columna se drenó y el procedimiento se repitió. Después, la resina se lavó tres veces con DCM (100 ml). Los eluyentes y los lavados combinados se evaporaron a presión reducida y se secaron al vacío durante
25 una noche. Se obtuvieron 724 mg de sólido de color blanco (2,35 g, cuant.).

m/z 1552, C₇₃H₁₂₆N₁₄O₂₂ requiere 1550,92.

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

Se disolvió CBZ-Thr(O-tBu)-Dap(Boc)-Dab-Dab(Boc)-DLeu-L-

Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)-OH en bruto (724 mg, 0,466 mmol) en DMF (75 ml), se trató con diisopropiletilamina (DIPEA) (361 mg 0,49 ml, 2,8 mmol) y después se enfrió en un baño de hielo. Se añadió gota a gota difenil fosforil azida (256 mg, 0,2 ml, 0,93 mmol), después la mezcla se agitó durante 2 h con enfriamiento en baño de hielo. El baño de hielo se retiró y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h más. El disolvente se evaporó y el residuo se aplicó a una columna sobre SiO₂ ISCO (40 g) y se sometió a cromatografía con MeOH al 0-10 % en DCM. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron para dar una espuma de color blanco. Se obtuvieron 418 mg (58%).

m/z 1534, C₇₃H₁₂₄N₁₄O₂₁ requiere 1532,91.

15

(iii) Compuesto del título

CBZ- Thr(O-tBu)- Dap(Boc)-ciclo[Dab-Dab(Boc)-DLeu-L-Abu-Dab(Boc)-Dab(Boc)-Thr(O-tBu)] (531 mg, 0,346 mmol) se disolvió en metanol (50 ml) y se trató con formiato amónico (545 mg, 8,6 mmol) y Pd al 10 %/C (173 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla de reacción se filtró a través de Celite, y el residuo se lavó con MeOH. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en EtOAc, que contenía MeOH al 10 %, se lavó con agua × 3 y se secó con sulfato de magnesio. El disolvente se evaporó para dejar un sólido de color blanco. Para eliminar cualquier traza de formiato, el sólido se disolvió en metanol (160 ml) y se agitó una resina Ambersep 900 (12 ml) durante 30 minutos. La mezcla se filtró y se evaporó a sequedad, para obtener 464 mg de sólido de color blanco (96 %).

m/z 1400, C₆₅H₁₁₈N₁₄O₁₉ requiere 1398,87.

Métodos generales

La síntesis total de los derivados de nonapéptido de polimixina se realizó como se indica a continuación.

5

Un péptido lineal con protección ortogonal del grupo γ -amino del residuo Dab implicado en la ciclación se construyó sobre la resina, con el aminoácido C-terminal (típicamente Thr) unido a la fase sólida. Después de la desprotección parcial
10 del Dab implicado en la ciclación (residuo 4 en el sistema de numeración de la polimixina), seguido de la eliminación de la resina, los péptidos lineales resultantes se eliminaron por ciclación de la resina. Se utilizaron dos métodos generales, como se describe a continuación.

15

Método general 1: Síntesis total usando protección CBZ de grupos amina

La síntesis del péptido lineal protegido (residuos 2-10 y
20 grupo N-terminal) se realizó en un sintetizador peptídico automatizado usando la química de péptidos en fase sólida Fmoc estándar. Específicamente, la síntesis se realizó utilizando la resina Fmoc-Thr (tBu)-PEG-PS como material de partida. El acoplamiento de los aminoácidos Fmoc con la protección CBZ en
25 los grupos amino terminales se realizó utilizando 5 equivalentes molares (relativos a la carga de resina) de Fmoc aminoácido y HATU en DMF con activación in situ, utilizando 10 equivalentes molares de DIPEA. La desprotección de Fmoc se realizó con piperidina al 20 % en dimetilformamida. Se utilizó
30 BOC como el grupo protector ortogonal en el Dab implicado en la ciclación.

El péptido lineal unido a la resina se trató con TFA/TIS/H₂O (96/2/2 v/v) durante 2 h para revelar el residuo Dab implicado en la ciclación, y para escindir el péptido de la resina. Este material se cicló usando PyBop/HOBt/NMM (4/4/8 equivalentes molares relativos a la carga inicial) en DMF durante 3 h. El material en bruto se evaporó parcialmente, se recogió en acetonitrilo/agua y se liofilizó durante una noche. Después, los grupos CBZ se eliminaron usando Pd al 10 %/C en ácido acético/MeOH/agua (5/4/1 v/v).

10

El producto en bruto se purificó y los diastereómeros se separaron por HPLC preparativa (Tabla 3). Cabe apreciar que las condiciones específicas se optimizaron para cada par de diastereómeros.

15

Método general 2: Síntesis total usando protección Boc de grupos amina

La síntesis del péptido lineal protegido (residuos 2-10 y grupo N-terminal) se realizó en un sintetizador peptídico automatizado usando la química de péptidos en fase sólida Fmoc estándar. Específicamente, la síntesis se realizó usando una resina de cloruro de clorotritilo (CTC), precargada con Fmoc-Thr(tBu)-OH (carga ~0,78 mmol/g), en una escala de 0,05 - 0,1 mmol. El acoplamiento de los Fmoc-aminoácidos se realizó usando 5 equivalentes molares (relativos a la carga de resina) de Fmoc aminoácido y HATU en DMF con activación in situ, utilizando 10 equivalentes molares de DIPEA. La desprotección de Fmoc se realizó con piperidina al 20 % en dimetilformamida. El grupo protector ivDde se usó como protección ortogonal en el residuo Dab implicado en la ciclación.

30

Para eliminar el grupo ivDde, el péptido lineal se trató con hidrazina al 3 % en DMF (100 ml por 100 μ mol, repetido dos veces) seguido de lavado con DMF $\times$ 3, EtOH $\times$ 3 y éter dietílico $\times$ 3. Después, el péptido lineal parcialmente desprotegido se escindió de la resina lavando la resina con HFIP al 20 % en DCM. El residuo resultante se disolvió en acetonitrilo al 50 %/agua y se liofilizó durante una noche. El péptido lineal protegido se disolvió en DMF (20 ml/mmol de resina) ciclada con DPPA, (3 equivalentes molares relativos a la carga de la resina) y DIPEA (6 equivalentes molares relativos a la carga de la resina). Esta solución se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Los grupos BOC se eliminaron con TFA, y el péptido en bruto se liofilizó.

El producto en bruto se purificó y los diastereómeros se separaron por HPLC preparativa usando las condiciones de HPLC preparativa 4 descritas a continuación. Cabe apreciar que las condiciones específicas se optimizaron para cada par de diastereómeros.

Método general 3: Acoplamiento de ácido a nonapéptido y separación

A continuación se describen métodos para acoplar el N terminal de un nonapéptido a un aminoácido en relación con los compuestos ejemplares 5 y 6. Las condiciones descritas pueden adaptarse a otras combinaciones de nonapéptido y aminoácido.

Etapas 1

H-Thr(O-^tBu)- Dap(BOC)-Ciclo[Dab-Dab(BOC)-DPhe-Leu-Dab(BOC)-Dab(BOC)-Thr]. (Intermedio 1) (0,07 mmol) se disolvió

en diclorometano (4 ml), y se trató con ácido con 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (1,5 equiv. con respecto al sustrato de polimixina), *N,N*-diisopropiletilamina (3,0 equiv.), seguido de HATU (2,0 5 equivalente). Después de 16 h, la finalización de la reacción se confirmó por LCMS y la mezcla de reacción se evaporó a sequedad. Se añadió agua (aprox. 10 ml) y la mezcla se trituró y después se agitó vigorosamente durante 1 h. El precipitado resultante se recogió por filtración y se secó al vacío durante 10 una noche.

Etapas 2

El derivado Boc-prottegido de la Etapa 1 se disolvió en 15 diclorometano (3 ml) y se trató con TFA (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que el análisis por LCMS confirmó una desprotección completa. El disolvente se evaporó y el residuo se sometió a cromatografía por HPLC preparativa usando las condiciones dadas en las Condiciones de 20 HPLC preparativa 4 para separar los diastereómeros. Las fracciones que contenían el diastereómero de ejecución temprana se combinaron, se evaporaron a bajo volumen y se liofilizaron para proporcionar el Ejemplo 5 en forma de la sal de TFA. Las fracciones que contenían el diastereómero de ejecución tardía 25 se combinaron, se evaporaron a bajo volumen y se liofilizaron para proporcionar el Ejemplo 6 en forma de la sal de TFA.

Cabe apreciar que las condiciones específicas se optimizaron para cada par de diastereómeros.

30

Condiciones de HPLC preparativa 4:

Columna: Waters Sunfire C18 OBD 5 µm × 19 mm × 150 mm

Fase móvil: A: 90/10 de agua/acetonitrilo, v/v, TFA al 0,15 %.

B: 90/10 de acetonitrilo/agua, v/v, TFA al 0,15 %

Caudal: 10 ml/min

Gradiente:	Tiempo (min)	% de fase móvil A
	0	100 %
	3	100 %
	8	85 %
	13,5	85 %
	15	75 %
	18	0 %
	23	100 %
	25	100 %

Detección: 210 nm

Condiciones de HPLC analítica 4:

Columna: Phenomenex Hyperclone C18 BDS 5 µm × 4,6 mm × 150 mm

Fase móvil: A: 90/10 de agua/acetonitrilo, v/v, TFA al 0,15 %.

B: 90/10 de acetonitrilo/agua, v/v, TFA al 0,15 %

Caudal: 1 ml/min

Gradiente:	Tiempo (min)	% de fase móvil A
	0	100 %
	20	40 %
	21	0 %
	23	0 %
	23,5	100
	25	100

Detección: 210, 254 nm

Volumen de inyección: 20 µl

Método general 3b: Acoplamiento de enantiómeros individuales a nonapéptido

5 Los aminoácidos enantioméricamente puros se acoplaron al extremo N-terminal de los compuestos nonapeptídicos usando las mismas condiciones que se describen anteriormente en el Método general 3a para los aminoácidos enantioméricamente mezclados.

10 Ejemplos de compuesto 5 y 6

El acoplamiento del ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (isómero 2) (Tiempo de retención 3,46 min para el método analítico 1 o 3,264 min para el método analítico 2) en las condiciones del Método general 3a seguido de desprotección proporcionó el Ejemplo 5. El Ejemplo (5) se asignó a la estereoquímica (S) tras la determinación por rayos X de la configuración absoluta de ácido 4-amino-3-(3-clorofenil)butanoico derivado de ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (isómero 2).

El acoplamiento del ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (isómero 1, tiempo de retención 2,89 min para el método analítico 1 o 2,796 min para el método analítico 2) en las condiciones del Método general 3a seguido de desprotección proporcionó el Ejemplo 6. El Ejemplo (6) se asignó a la estereoquímica (R) tras la determinación por rayos X de la configuración absoluta de ácido 4-amino-3-(3-clorofenil)butanoico derivado de ácido 4-((*terc*-butoxicarbonil)amino)-3-(3-clorofenil)butanoico (isómero 1).

Método general 4: Conversión en la sal acetato

La resina AG1-X2 (Bio-Rad Laboratories Ltd) forma acetato
malla 200-4, se regeneró por lavado con acético acuoso al 10 %
seguido de ácido acético acuoso al 1 %, y se puso en un cartucho
5 sinterizado. Una solución del compuesto en forma de una sal
TFA en agua se aplicó a la columna, usando una carga de 30 g
de resina a 1 g de sal TFA, y la columna se dejó gotear bajo
la gravedad, eluyendo con agua. Las fracciones que contenían
el producto se combinaron y se liofilizaron para dar un sólido
10 de color blanco.

El análisis de los compuestos finales se realizó por HPLC
usando las condiciones descritas anteriormente (Condiciones de
HPLC analítica).

15

Los datos analíticos ejemplares para los compuestos del
Ejemplo 5 y 6, como sales acetato, se dan a continuación.

Ejemplo 5: (isómero más rápido) ^1H RMN de la sal acetato
20 (400 MHz, D_2O): δ (ppm) 0,70 (3 H, d, J 6,1 Hz), 0,77 (3 H, d,
J 6,3 Hz), 0,78-0,90 (1H, m), 1,13 (3H, d, J 6,3 Hz), 1,17 (3H,
d, J 6,4 Hz), 1,36-1,52 (2H, m), 1,75-2,06 (17 H, m, incluye
1,91, s, OAc), 2,10-2,30 (4H, m), 2,72-2,91 (4H, m), 3,02-3,49
(14H, m), 4,12-4,32 (8 H, m), 4,48 (1 H, dd, J 5,6, 9,0 Hz),
25 4,54-4,60 (1H, m), 4,63-4,68 (1H, m), 7,25-7,41(9H, m). m/z
1145 $[\text{MH}^+]$, 573 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

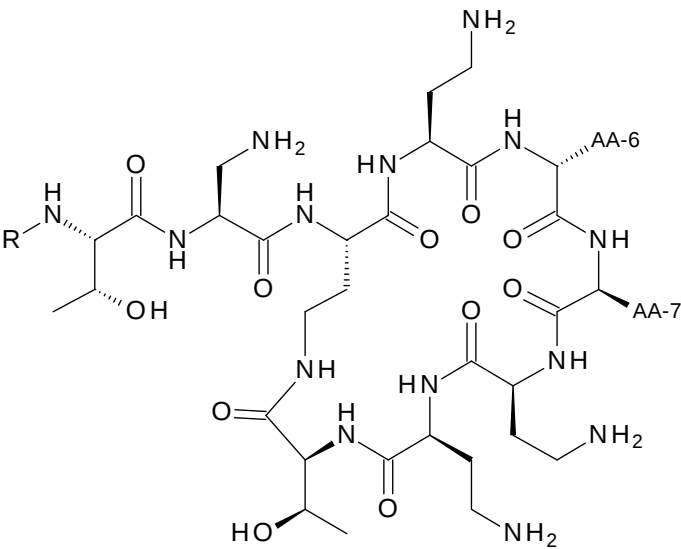
Ejemplo 6: (isómero más lento) ^1H RMN de la sal acetato
(400 MHz, D_2O): δ (ppm) 0,60- 0,67 (6 H, m), 0,69 - 0,84 (4 H,
30 m), 1,16 (3H, d, J 6,4 Hz), 1,33-1,50 (2 H, m), 1,76-2,04 (19
H, m, incluye 1,88, s, OAc), 2,06-2,26 (4 H, m), 2,67-2,86 (4
H, m), 3,00-3,46 (14 H, m), 3,98-4,04 (1 H, m) 4,14-4,30 (7H,

m), 4,45 (1 H, dd, J 5,6, 9,0 Hz), 4,54 (1 H, aparece como t, J 8,3 Hz), 4,72 (1 H, dd, J 5,0, 8,9 Hz), 7,20-7,40 (9 H, m).
m/z 1145 [MH⁺], 573[M+2H]²⁺.

5 En todos los ejemplos, los diastereómeros se asignaron en función del tiempo de retención de HPLC (isómeros de elución rápida y lenta) junto con el desplazamiento químico del residuo de Thr que se mueve desde 1,13 ppm en el isómero de elución rápida, hasta aproximadamente 0,65 ppm en el isómero de elución
10 lenta.

Compuestos ejemplares

La Tabla 1 enumera compuestos ejemplares de la invención.
15 Estos son compuestos que tienen la estructura general que se muestra a continuación:



El grupo R corresponde a -X-R¹⁵ en los compuestos de la invención, y este grupo se muestra en la tabla junto con los
20 residuos de aminoácidos en las posiciones 6 y 7 (AA-6 y AA-7 respectivamente, utilizando el sistema de numeración de la polimixina), que corresponde a los grupos -R¹ y -R² respectivamente, cuando se toman junto con el grupo carbonilo y el nitrógeno alfa al carbono al que están unidos.

En estos compuestos ejemplares, el grupo -R³, tomado junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido es L-Thr, -R⁴, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es L-Dap (por lo tanto, -R⁴ es -CH₂NH₂), y -R⁸, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es L-Thr (por lo tanto, -R⁸ es metilo).

La estereoquímica absoluta en la cadena lateral -R se ha asignado en comparación con el Ejemplo 5 y el Ejemplo 6, que se han correlacionado con material de estereoquímica absoluta conocida.

En los ejemplos 1-6 y 15-33, la determinación se realizó comparando los tiempos de retención relativos y el espectro de ¹H RMN de los diastereómeros (por ejemplo, teniendo en cuenta el desplazamiento químico del residuo de Thr en la posición 2).

En los Ejemplos 7-14, la determinación se realizó por comparación de los tiempos de retención de HPLC relativos de los diastereómeros.

La tabla proporciona los tiempos de retención de HPLC para los compuestos ejemplares. Las condiciones de HPLC que se usaron para el análisis se exponen a continuación.

Columna: Phenomenex Hyperclone BDS C18, 4,6 mm × 150 mm, 5 μm

Caudal: 1 ml/min

Eluyente:

A = 10 % de AcN/90 % de agua/0,15 % de TFA

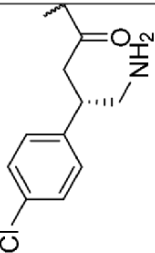
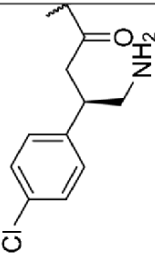
B = 90 % de AcN/10 % de agua/0,15 % de TFA

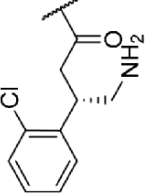
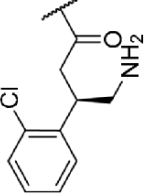
Gradiente:

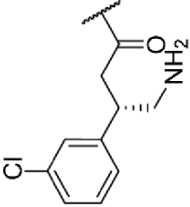
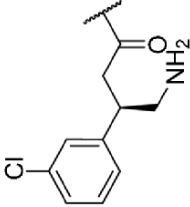
Min	% de A	% de B
0	100	0
20	40	60
21	0	100
23	0	100
23,5	100	0
25	100	0

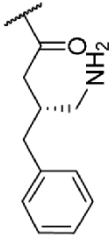
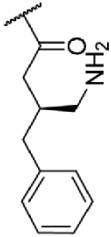
Detección: 210, 254 nm

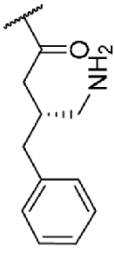
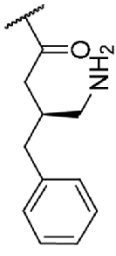
Tabla 1 - Compuestos ejemplares

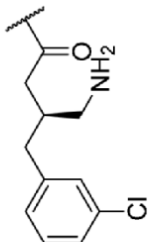
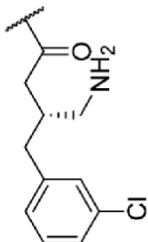
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t _R de HPLC (min)	m/z
1	(S)-4-amino-3-(4-clorofenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82 C1N15O1 2	1143, 6	9,6	1145 [MH+] 573 [M+2H] 2+
2	(R)-4-amino-3-(4-clorofenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C52H82 C1N15O1 2	1143, 6	9,7	1145 [MH+] 573 [M+2H] 2+

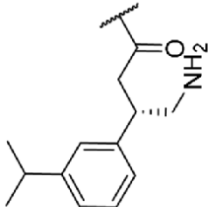
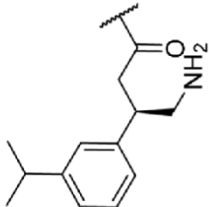
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t _R de HPLC (min)	m/z
3	(S)-4-amino-3-(2-clorofenil)butanolil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C ₅₂ H ₈₂ C ₁ N ₁₅ O ₁ 2	1143, 6	9,1	1145 [MH+] 573 [M+2H] 2+
4	(R)-4-amino-3-(2-clorofenil)butanolil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C ₅₂ H ₈₂ C ₁ N ₁₅ O ₁ 2	1143, 6	9,4	1145 [MH+] 573 [M+2H] 2+

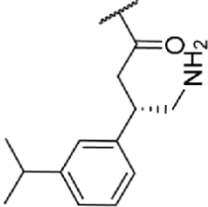
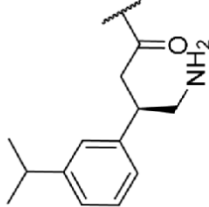
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t _R de HPLC (min)	m/z
5	(S)-4-amino-3-(3-clorofenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a, 3b	C ₅₂ H ₈₂ C ₁ N ₁₅ O ₁ 2	1143, 6	9,6	1145 [MH+] 573 [M+2H] 2+
6	(R)-4-amino-3-(3-clorofenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a, 3b	C ₅₂ H ₈₂ C ₁ N ₁₅ O ₁ 2	1143, 6	9,8	1145 [MH+] 573 [M+2H] 2+

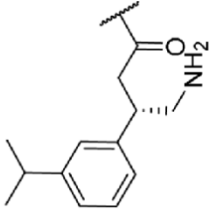
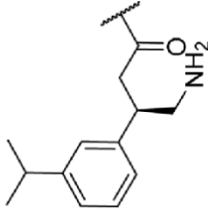
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t_R de HPLC (min)	m/z
7	(R)-4-amino-3-bencilbutanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. Isómero 1		Leu	Leu	3a	C50H87 N15O12	1089, 7	8,8	1091 [MH+] 546 [M+2H] 2+
8	(S)-4-amino-3-bencilbutanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. Isómero 2		Leu	Leu	3a	C50H87 N15O12	1089, 7	9,1	1091 [MH+] 546 [M+2H] 2+

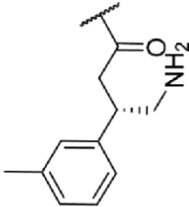
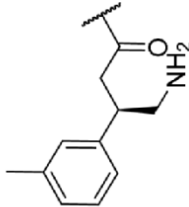
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t _R de HPLC (min)	m/z
9	(R)-4-amino-3-bencilbutanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. Isómero 1		Phe	Leu	3a	C53H85 N15O12	1123, 7	10,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+
10	(S)-4-amino-3-bencilbutanoil -Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]. Isómero 2		Phe	Leu	3a	C53H85 N15O12	1123, 7	11,0	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+

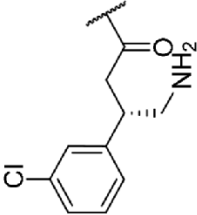
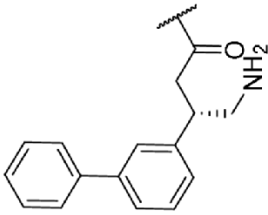
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t_R de HPLC (min)	m/z
13	(S)-4-amino-3-(3-clorobencil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Isómero 2</i>		Leu	Leu	3a	C50H86 CIN15O1 2	1123, 6	10,4	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+
14	(R)-4-amino-3-(3-clorobencil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]. <i>Isómero 1</i>		Leu	Leu	3a	C50H86 CIN15O1 2	1123, 6	9,9	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+

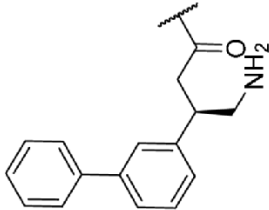
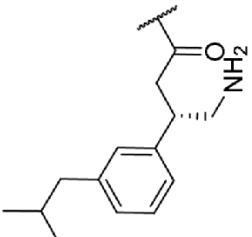
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t _R de HPLC (min)	m/z
15	(S)-4-amino-3-(3-isopropilfenil)butanoil - Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Leu	3a	C52H91 N15O12	1117, 7	10,7	1119 [MH+] 560 [M+2H] 2+
16	(R)-4-amino-3-(3-isopropilfenil)butanoil - Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Leu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Leu	3a	C52H91 N15O12	1117, 7	10,9	1119 [MH+] 560 [M+2H] 2+

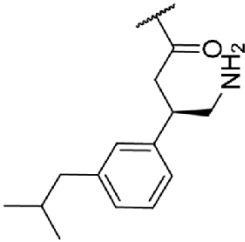
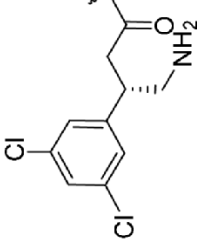
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t _R de HPLC (min)	m/z
17	(S)-4-amino-3-(3-isopropilfenil)butanoil - Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Abu	1	C ₅₃ H ₈₅ N ₁₅ O ₁₂	1123, 7	9,2	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+
18	(R)-4-amino-3-(3-isopropilfenil)butanoil - Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Abu	1	C ₅₃ H ₈₅ N ₁₅ O ₁₂	1123, 7	9,4	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+

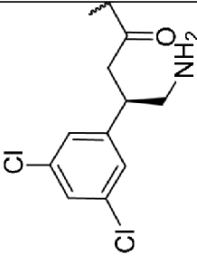
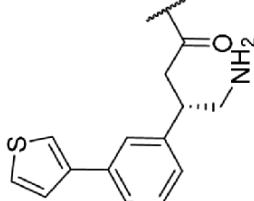
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t_R de HPLC (min)	m/z
19	(S)-4-amino-3-(3-isopropilfenil)butanoil - Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Thr-Dab-Dab-Thr]		Leu	Thr	1	C50H87 N15O13	1105, 7	7,6	1107 [MH+] 554 [M+2H] 2+
20	(R)-4-amino-3-(3-isopropilfenil)butanoil - Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Thr-Dab-Dab-Thr]		Leu	Thr	1	C50H87 N15O13	1105, 7	7,8	1107 [MH+] 554 [M+2H] 2+

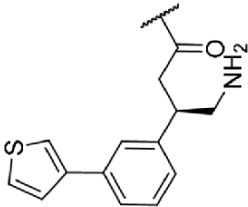
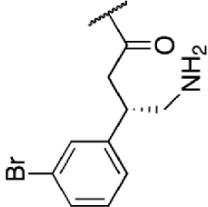
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t_R de HPLC (min)	m/z
21	(S)-4-amino-3-(<i>m</i> -tolil)butanoil- Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C53H85 N15O12	1123, 7	8,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+
22	(R)-4-amino-3-(<i>m</i> -tolil)butanoil- Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DPhe-Leu-Dab-Dab-Thr]		Phe	Leu	3a	C53H85 N15O12	1123, 7	8,9	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+

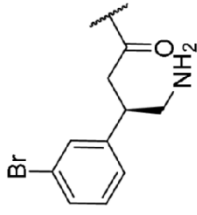
Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t_R de HPLC (min)	m/z
23	(S)-4-amino-3-(3-clorofenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	2	C47H80 C15NO12 2	1081,6	9,2	1083 [MH+] 542 [M+2H] 2+
24	(S)-3-([1,1'-bifenil]-3-yl)-4-aminobutanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3b	C53H85 N15O12	1123,7	8,5	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+

Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t_R de HPLC (min)	m/z
25	(R)-3-([1,1'-bifenil]-3-il)-4-aminobutanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3b	C53H85 N15O12	1123, 7	8,7	1125 [MH+] 563 [M+2H] 2+
26	(S)-4-amino-3-(3-isobutylfenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H89 N15O12	1103, 7	8,9	1105 [MH+] 553 [M+2H] 2+

Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	<i>t_R</i> de HPLC (min)	m/z
27	(<i>R</i>)-4-amino-3-(3-isobutylfenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H89 N15O12	1103, 7	9,1	1105 [MH+] 553 [M+2H] 2+
28	(<i>S</i>)-4-amino-3-(3,5-diclorofenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DnorLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Norleu	Abu	2	C47H79 Cl2N15O12	1115, 5	8,0	1117 [MH+] 559 [M+2H] 2+

Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t _R de HPLC (min)	m/z
29	(R)-4-amino-3-(3,5-diclorofenil)butanoil--Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DnorLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Norleu	Abu	2	C47H79 Cl2N15O 12	1115, 5	8,1	1117 [MH+] 559 [M+2H] 2+
30	(S)-4-amino-3-(3-(tiofen-3- il)fenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H83 N15O12 S	1129, 6	8,4	1131 [MH+] 566 [M+2H] 2+

Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t_R de HPLC (min)	m/z
31	(R)-4-amino-3-(3-(tiofen-3-il)fenil)butanoil-Thr-Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C51H83 N15O12 S	1129, 6	8,5	566 [M+2H] 2+
32	(S)-4-amino-3-(3-bromofenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr]		Leu	Abu	3a	C47H80B rN15O12	1125, 5	7,1	1128 [MH+] 564 [M+2H] 2+

Ej.	Nombre	-R	AA-6	AA-7	Método general	Fórmula	Masa	t_R de HPLC (min)	m/z
33	(R)-4-amino-3-(3-bromofenil)butanoil-Thr- Dap-Ciclo[Dab-Dab-DLeu-Abu-Dab-Dab-Thr].		Leu	Abu	3a	C47H80BrN15O12	1125, 5	7,5	1128 [MH+] 564 [M+2H] 2+

Resultados biológicos

Los compuestos de la invención se probaron, y los resultados se compararon con ejemplos comparativos, que incluyen compuestos descritos previamente en la técnica.

Determinación de MIC

El inóculo se preparó haciendo una suspensión directa de colonias aisladas (seleccionadas de una placa de agar Mueller-Hinton de 18-24 horas) ajustada al estándar de 0,5 McFarland. La prueba de MIC se realizó mediante diluciones de antibióticos seriadas dos veces en caldo Mueller-Hinton ajustado en cationes en placas de microtitulación de 96 pocillos estériles en un volumen total de 170 μ l (150 μ l de caldo que contenía el agente antimicrobiano, 20 μ l de inóculo). Los ensayos se realizaron por duplicado. Las placas se incubaron de forma aerobia sin agitación durante 18-20 horas a 35 °C con la MIC definida como la concentración más baja de fármaco que impidió un crecimiento visible. Varios de los compuestos se sometieron a múltiples pruebas, y cuando este fue el caso, la MIC presentada es el valor mediano obtenido. Los valores de MIC se citan en μ g/ml.

Ensayo de toxicidad de células renales in vitro

El ensayo de toxicidad de células renales *in vitro* se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo.

Las células HK-2 se mantuvieron y ensayaron en medio de queratinocito-SFM complementado con 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 50 μ g/ml de extracto de pituitaria bovina (BPE). Las células se sembraron a 7.500 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. La polimixina B (PMB) y los

compuestos de ensayo se disolvieron en DMSO al 10 % en agua para dar una solución madre de 20 y 60 mg/ml, respectivamente. Los compuestos de ensayo se diluyeron para proporcionar una concentración máxima de 3.000 o 1.000 µg/ml con diluciones semi-logarítmicas un intervalo de concentración de 9 puntos más el vehículo de control. La PMB también se diluyó para dar una concentración máxima de 1.000 µg/ml con diluciones semi-logarítmicas. Los niveles de agua y DMSO se mantuvieron constantes en el 5 % y el 0,5 %, respectivamente. Los compuestos de ensayo se incubaron con células durante 24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 % en una atmósfera humidificada. Se diluyó CellTiter-Blue en PBS (1:4) y se añadió al 20 % (v/v) y se incubó a 37 °C durante 2 h antes de que se detectara el producto fluorescente.

Los valores de fondo de solo medios se restaron antes de analizar los datos utilizando GraphPad Prism. Los valores individuales se normalizaron con respecto a los pocillos de vehículo de control para cada compuesto. Los valores de concentración del compuesto se representaron gráficamente como valores logarítmicos para permitir el ajuste de una curva de dosis-respuesta. La parte inferior de la curva se limitó a cero y se determinaron los valores de CI₅₀.

Los valores de CI₅₀ se expresan en relación con los de PMB en el mismo experimento. Cuando se han realizado múltiples determinaciones, se presentan valores medianos.

Mediciones de nivel en el riñón en cuatro horas

Los compuestos se dosificaron por vía subcutánea a 17,2 mg/kg de base libre a ratones (n = 2 o 3). Cuatro horas después

de la dosificación, los animales se sacrificaron y se extrajeron los riñones, se les recortó la grasa y el tejido conjuntivo, se pesaron y se congelaron inmediatamente. Después de descongelar a temperatura ambiente, se colocaron el par de
5 riñones de cada animal en tubos cónicos de 2 ml que contenían perlas de óxido de zirconio estabilizadas con cerio previamente pesadas. Se añadió ácido trifluoroacético, TFA (0,25 ml, 0,15 % v/v en agua) y los tubos se cargaron en un homogeneizador FastPrep-24 (MP Biomedicals Europe) y se sometieron a 3 ciclos
10 de 30 segundos cada uno a una velocidad de 6 m/s. Una alícuota (200 µl) del homogeneizado se diluyó con un volumen calculado de solución de TFA (0,15 % v/v en agua) para dar una concentración final de 0,167 gramos de riñón/gramo de homogeneizado.

15

Los homogeneizados de riñón (100 µl) se mezclaron con metanol (190 µl) y TFA (110 µl, 10 % v/v en agua) y se almacenaron durante la noche a -20 °C para la precipitación de proteínas. Después de 10 min de centrifugación a 13.000 rpm y
20 6 °C, se transfirieron 200 µl de los sobrenadantes a insertos de vidrio y se analizaron por LC-MS-MS.

Tabla 2 - Resultados biológicos

Ej.	AlogP	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>		HK-2 rel. con PMB	Nivel en el riñón en 4 h (µg/g)*	Nivel en el riñón en 4 h/Rel HK-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
1	-6,3	4	0,125	8	0,125	0,25	0,06	0,06	0,06	8,8	267	30
2	-6,3	8	0,25	2	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	7,2	538	75
3	-6,3	32	1	65	0,5	0,5	0,5	1	2	ND	ND	ND
4	-6,3	16	0,5	16	0,25	0,5	0,25	1	1	ND	ND	ND
5	-6,3	8	0,125	16	0,125	0,25	0,25	0,06	0,125	11,6	170	15
6	-6,3	8	0,125	8	0,125	0,5	0,125	0,5	0,5	7,8	381	49
7	-6,9	16	0,25	32	ND	0,25	0,125	0,125	0,125	ND	ND	ND
8	-6,9	16	0,125	32	ND	0,5	0,06	0,25	0,125	ND	ND	ND

Ej.	AlogP	E. coli		K. pneumoniae		P. aeruginosa		A. baumannii		HK-2 rel. con PMB	Nivel en el riñón en 4 h (µg/g)*	Nivel en el riñón en 4 h/Rel HK-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
9	-6,5	8	0,25	64	0,25	0,5	0,125	0,125	0,25	12,0	159	13
10	-6,5	8	0,125	16	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25	8	346	43
11	-5,9	4	0,5	16	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	5,2	163	32
12	-5,9	4	0,5	8	0,5	0,5	0,125	0,25	0,25	ND	ND	ND
13	-6,2	8	0,5	16	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	ND	ND	ND
14	-6,2	8	1	32	0,5	1	0,5	0,5	0,5	ND	ND	ND
15	-6,1	4	0,125	16	0,125	0,5	0,25	0,06	0,06	52,1	443	8,5
16	-6,1	16	0,5	8	0,25	1	0,5	0,5	0,5	ND	ND	ND
17	-6,5	8	0,125	16	0,125	0,25	0,125	0,06	0,06	29,0	231	8

Ej.	AlogP	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>A. baumannii</i>		HK-2 rel. con PMB	Nivel en el riñón en 4 h (µg/g)*	Nivel en el riñón en 4 h/Rel HK-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
18	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	32,8	535	16,3
19	-7,9	32	0,25	64	0,25	1	0,25	0,25	0,25	101,4	386	4
20	-7,9	64	1	64	2	2	0,5	1	2	ND	ND	ND
21	-6,5	16	0,125	32	0,25	0,5	0,25	0,125	0,125	26,7	209	8
23	-7,4	32	0,125	64	0,125	0,5	0,25	0,125	ND	>41	263	<6,4
22	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,5	0,25	1	1	ND	ND	ND
24	-6,5	4	0,125	16	0,25	0,25	0,125	0,06	0,03	21,8	203	9
25	-6,5	16	0,25	2	0,5	0,5	0,25	0,125	0,125	ND	ND	ND
26	-6,4	8	0,06	8	0,5	0,5	0,25	0,03	0,06	>58	353	<6,1

Ej.	AlogP	E. coli		K. pneumoniae		P. aeruginosa		A. baumannii		HK-2 rel. con PMB	Nivel en el riñón en 4 h (µg/g)*	Nivel en el riñón en 4 h/Rel HK-2
		CA58	ATCC 25922	CA64	ATCC 13822	CCUG 59347	ATCC 27853	NCTC 13424	ATCC BAA-747			
27	-6,4	16	0,25	2	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125	ND	ND	ND
28	-6,5	16	0,125	8	0,125	0,25	0,25	0,06	0,125	68,5	408	6,0
29	-6,5	16	0,25	8	0,25	0,5	0,25	0,125	0,125	ND	ND	ND
30	-6,8	8	0,125	16	0,125	0,5	0,25	0,06	ND	37,5	252	6,7
31	-6,8	16	0,125	4	0,25	0,25	0,25	0,125	ND	ND	ND	ND
32	-7,3	32	0,25	32	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125	ND	ND	ND
33	-7,3	64	0,5	16	0,5	0,5	0,5	1	1	ND	ND	ND

ND - no determinado (no probado)

Datos biológicos adicionales

Comparación de toxicidad renal - Ejemplo 5 y Ejemplos de referencia D77 y 38

5 A los ratones (n = 6) se les dosificó por vía subcutánea tres veces al día polimixina B, sulfato de colistina, Ejemplo de referencia D77, Ejemplo de referencia 38 o Ejemplo 5 a 17,2 mg de base libre/kg. Comenzando inmediatamente después de la

10 primera dosis el día 4, los ratones se transfirieron a jaulas metabólicas individuales y la orina se recolectó durante las siguientes 24 horas para la determinación de los niveles de biomarcadores (albúmina, cistatina C, KIM-1). Los niveles de biomarcadores medios geométricos se presentan en la siguiente

15 tabla:

Compuesto	Albúmina (µg/24 h)	Cistatina C (ng/24 h)	KIM-1 (ng/24 h)
PMB	1.154 - 1.912	1.155 - 1.400	4 - 22
Colistina	2.353 - 2.548	1.266 - 1.678	42 - 89
Ejemplo de ref. D77	3.639	7.542	130
Ejemplo de ref. 38	2.362	14.015	79
Ejemplo 5	1.004	827	3

Los valores de PMB muestran el rango de 4 experimentos y la colistina de 2 experimentos.

20 La elevación de la albúmina, cistatina C o KIM-1 en la orina son signos de daño renal. El ejemplo 5 mostró los niveles más bajos de los 3 biomarcadores de toxicidad renal.

25 El Ejemplo de referencia D77 se describe en el documento WO 2015/135976. El Ejemplo de referencia 38 se describe en el documento WO 2016/083531.

Comparación de toxicidad renal - Ejemplos 5, 9 y 17

A los ratones (n = 6) se les dosificó por vía subcutánea PMB, Ejemplo 5, Ejemplo 9 o Ejemplo 17 a 25 mg de base libre/kg para cuatro dosis en intervalos de 8 h. Después de la cuarta dosis, los animales se transfirieron a jaulas metabólicas individuales y se recogió la orina durante 24 horas para la determinación de los biomarcadores urinarios. Después de recoger la orina, los ratones se sacrificaron y los riñones se extrajeron para la histopatología.

Compuesto	Albúmina (µg/24 h)	Cistatina C (ng/24 h)	KIM-1 (ng/24 h)
PMB	1.147	1.425	58
Ejemplo 5	343	448	1
Ejemplo 9	749	754	2

Ninguno de los animales en los grupos del Ejemplo 5 o del Ejemplo 9 mostró signos de degeneración o regeneración mediante histopatología. Por el contrario, los 6 animales tratados con PMB mostraron una regeneración tubular mínima.

En un experimento separado, el Ejemplo 17 se comparó con la PMB.

20

Compuesto	Elevación en comparación con el vehículo de control		
	Albúmina	Cistatina C	KIM-1
PMB	29 ×	2 ×	771 ×
Ejemplo 17	2,7 ×	1,8 ×	4,7 ×

También se evaluaron los signos histopatológicos:

	PMB	Ejemplo 17
Degeneración tubular/necrosis	4 normal/1 mínimo	Todos normales
Túbulos basófilos	4 mínimo/1 leve	3 normal/2 mínimo

Comparación de la toxicidad renal del Ejemplo 5 y PMB en mono Cynomolgus

5 A monos Cynomolgus macho (n = 3) se les dosificó una infusión intravenosa durante 1 h a 20 mg/kg/dosis, 3 veces al día durante 7 días con el Ejemplo 5. En un experimento separado, a los monos macho (n = 3) se les administró PMB durante el mismo periodo a 4 mg/kg/dosis. En ambos experimentos, a los
10 animales de control se les dosificó 3 veces al día una solución salina.

Al final del periodo de 7 días, se tomaron muestras de sangre y se determinaron los niveles séricos de nitrógeno
15 ureico en sangre y creatinina como indicadores de daño renal. En el caso del Ejemplo 5, los niveles medios de BUN y creatinina se elevaron en menos del 50 % en comparación con los animales de control con solución salina. Sin embargo, para los animales que recibieron PMB, el nivel de BUN se elevó al 76 % en
20 comparación con los animales de control y el nivel de creatinina fue del 2,6 × más alto.

Los riñones se extrajeron al final del periodo de dosificación de 7 días y se examinaron microscópicamente. De
25 los tres animales tratados con PMB, 2 mostraron degeneración tubular leve y 1 mínima. De los animales tratados con el Ejemplo 5, 1 mostró una degeneración tubular leve y 2 mostraron una degeneración mínima.

30 La dosis en estos experimentos fue un 5 × más alta para

el Ejemplo 5 que para PMB pero se redujeron los signos de toxicidad renal. La exposición al fármaco de un ciclo de dosificación el día 7 de la dosis (AUC0-8 h) fue de 234 µg.h/ml para el Ejemplo 5 y 117 µg.h/ml para PMB.

5

Eficacia de los compuestos en un modelo de muslo murino neutropénico infectado con E. coli ATCC 25922

Después de hacerlos neutropénicos (ciclofosfamida 150
10 mg/kg d-4, 100 mg/kg d-1), se inocularon ratones CD-1 (n = 5) en cada muslo con aprox. 10⁵ ufc de *E. coli* ATCC25922. A los ratones se les administró una dosis intravenosa de 0,125, 0,5 y 3 mg/kg de sulfato de PMB o compuesto de ensayo (base libre de peso equivalente) 1, 3,5 y 6 h después de la infección. 9 h
15 después de la infección, los ratones se sacrificaron y los muslos se prepararon para el recuento de colonias.

La disminución en los recuentos de colonias en relación con el vehículo de control se muestra en la tabla a
20 continuación. En cada caso, la disminución observada con PMB en el mismo experimento se muestra entre paréntesis:

Compuesto	Descenso log en ufc en comparación con el vehículo de control		
	0,125 mg/kg	0,5 mg/kg	3 mg/kg
Ejemplo 5	0,1 (0,4)	2,2 (2,6)	3,4 (3,5)
Ejemplo 9	0,1 (0,4)	0,5 (0,6)	3,7 (3,9)
Ejemplo 17	0 (0,1)	1,3 (1,1)	3,7 (3,7)
Ejemplo 24	0 (0)	0,4 (0,5)	2,4 (2,9)

Todos los compuestos fueron eficaces de forma similar para PMB.

25

Eficacia de los compuestos en un modelo de musculo murino

neutropénico infectado con *K. Pneumoniae* ATCC 43816

Después de hacerlos neutropénicos (ciclofosfamida 150 mg/kg d-4, 100 mg/kg d-1), se inocularon ratones CD-1 (n = 5) en cada muslo con aprox. 10⁵ ufc de *K. pneumoniae* ATCC43816. A los ratones se les administraron IV dosis adecuadas de sulfato de PMB o compuesto de ensayo (base libre de peso equivalente) 2, 6 y 10 h después de la infección. 16 h después de la infección, los ratones se sacrificaron y los muslos se prepararon para el recuento de colonias.

La disminución en los recuentos de colonias en relación con el vehículo de control se muestra en la tabla a continuación. En cada caso, la disminución observada con PMB en el mismo experimento se muestra entre paréntesis:

Dosis (mg/kg)	Descenso log en ufc en comparación con el vehículo de control	
	Ejemplo 5	Ejemplo 24
0,125	0 (0,2)	0 (0,2)
0,25	ND	0,2 (0,2)
0,5	4,8 (4,9)	0,2 (0,9)
1	4,8 (5,2)	ND
2	ND	4,7 (4,0)
4	5,3 (5,6)	ND

ND = No determinado

Ambos compuestos fueron eficaces de forma similar para PMB.

Eficacia de los compuestos en un modelo de musculo murino neutropénico infectado con *A. baumannii* NCTC13301

Después de hacerlos neutropénicos (ciclofosfamida 150

mg/kg d-4, 100 mg/kg d-1), se inocularon ratones CD-1 (n = 5) en cada muslo con aprox. 105 ufc de *A. baumannii* NCTC13301. A los ratones se les administró una dosis intravenosa de 0,125, 0,5, 1 y 4 mg/kg de sulfato de PMB o compuesto de ensayo (base libre de peso equivalente) 2, 6 y 10 h después de la infección. 16 h después de la infección, los ratones se sacrificaron y los muslos se prepararon para el recuento de colonias.

La disminución en los recuentos de colonias en relación con el vehículo de control se muestra en la tabla a continuación. En cada caso, la disminución observada con PMB en el mismo experimento se muestra entre paréntesis:

Dosis (mg/kg)	Descenso log en ufc en comparación con el vehículo de control	
	Ejemplo 5	Ejemplo 24
0,125	0,4 (0,3)	0,1 (0,1)
0,5	3,1 (4,2)	2,2 (4,1)
1	6,7 (5,8)	5,5 (5,0)
4	7,4 (6,5)	5,7 (5,3)

Ambos compuestos fueron eficaces de forma similar para PMB.

Eficacia de los compuestos en un modelo de pulmón murino neutropénico infectado con A. baumannii NCTC13301

Después de hacerlos neutropénicos (ciclofosfamida 200 mg/kg d-4, 150 mg/kg d-1), se inocularon ratones CD-1 (n = 8) por vía intranasal con aprox. 107 ufc por pulmón de *A. baumannii* NCTC13301. A los ratones se les administró SC sulfato de PMB (20 mg/kg) o dosis apropiadas de compuesto de ensayo (base libre de peso equivalente) 2, 6 y 10 h después de la infección. 16 h después de la infección, los ratones se

sacrificaron y los pulmones se prepararon para el recuento de colonias.

La disminución en los recuentos de colonias en relación con el vehículo de control se muestra en la tabla a continuación. En cada caso, la disminución observada con PMB en el mismo experimento se muestra entre paréntesis:

Dosis (mg/kg)	Descenso log en ufc en comparación con el vehículo de control	
	Ejemplo 5	Ejemplo 24
2,5	0	0,9
10	0	1,6
20	2,5 (0)	2,7 (0)
30	4,0	3,9

La PMB no fue eficaz en este modelo a la dosis máxima tolerada. El ejemplo 5 fue más eficaz a 20 mg/kg y también podría administrarse a niveles más altos para lograr un mayor efecto debido a la toxicidad reducida.

Eficacia de los compuestos en un modelo de pulmón murino neutropénico infectado con P. aeruginosa ATCC 27853

Después de hacerlos neutropénicos (ciclofosfamida 200 mg/kg d-4, 150 mg/kg d-1), se inocularon ratones CD-1 (n = 8) por vía intranasal con 10⁴ – 10⁵ ufc por pulmón de *P. aeruginosa* ATCC27853. A los ratones se les administraron SC dosis adecuadas de sulfato de PMB o compuesto de ensayo (base libre de peso equivalente) 2, 6 y 10 h después de la infección. 16 h después de la infección, los ratones se sacrificaron y los pulmones se prepararon para el recuento de colonias.

La disminución en los recuentos de colonias en relación con el vehículo de control se muestra en la tabla a continuación. En cada caso, la disminución observada con PMB en el mismo experimento se muestra entre paréntesis:

5

Dosis (mg/kg)	Descenso log en ufc en comparación con el vehículo de control	
	Ejemplo 5	Ejemplo 24
2,5	0 (0)	0,8 (0,3)
5	0 (0)	ND
7,5	ND	3,2 (1,0)
10	2 (0,7)	ND
20	3,6 (2,6)	4,4 (3,7)
40	ND	5,7

ND = No determinado

Ambos compuestos mostraron una eficacia superior a PMB en este modelo.

10 *Valores de MIC para el Ejemplo 5 en presencia de Rifampicina*

Organismo	Cepa colección N.º	Genotipo de resistencia conocida	Polimixina B (PMB)	PMB+Rif (1 µg/ml)	Ejemplo 5	Ej. 5+Rif (1 µg/ml)
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	NA	0,25	≤0,015	0,125	≤0,015
	CDF-1	MCR-1	4	0,06	8	0,06
	IHMA 940398	NA	16	0,06	32	0,125
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13882	NA	0,25	0,06	0,125	0,06
	IHMA 580884	NA	8	0,06	16	0,125
	IHMA 520329	SHV-12, KPC-2	64	0,125	>64	0,06

Organismo	Cepa colección N.º	Genotipo de resistencia conocida	Polimixina B (PMB)	PMB+Rif (1 µg/ml)	Ejemplo 5	Ej. 5+Rif (1 µg/ml)
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	NA	0,5	0,125	0,25	0,125
	IHMA 517175	NA	8	0,25	8	0,5
	IHMA 644636	NA	32	0,5	32	1
<i>A. baumannii</i>	NCTC 13301	OXA-23	0,25	≤0,015	0,06	≤0,015
	IHMA 851735	OXA-23	8	0,03	0,25	≤0,015
	IHMA 517303	NA	>64	0,125	>64	0,03

Los valores de MIC (µg/ml) se determinaron mediante microdilución en caldo en condiciones CLSI.

5 Tanto PMB como el Ejemplo 5 muestran una fuerte sinergia con la rifampicina incluso contra cepas con susceptibilidad reducida a las polimixinas.

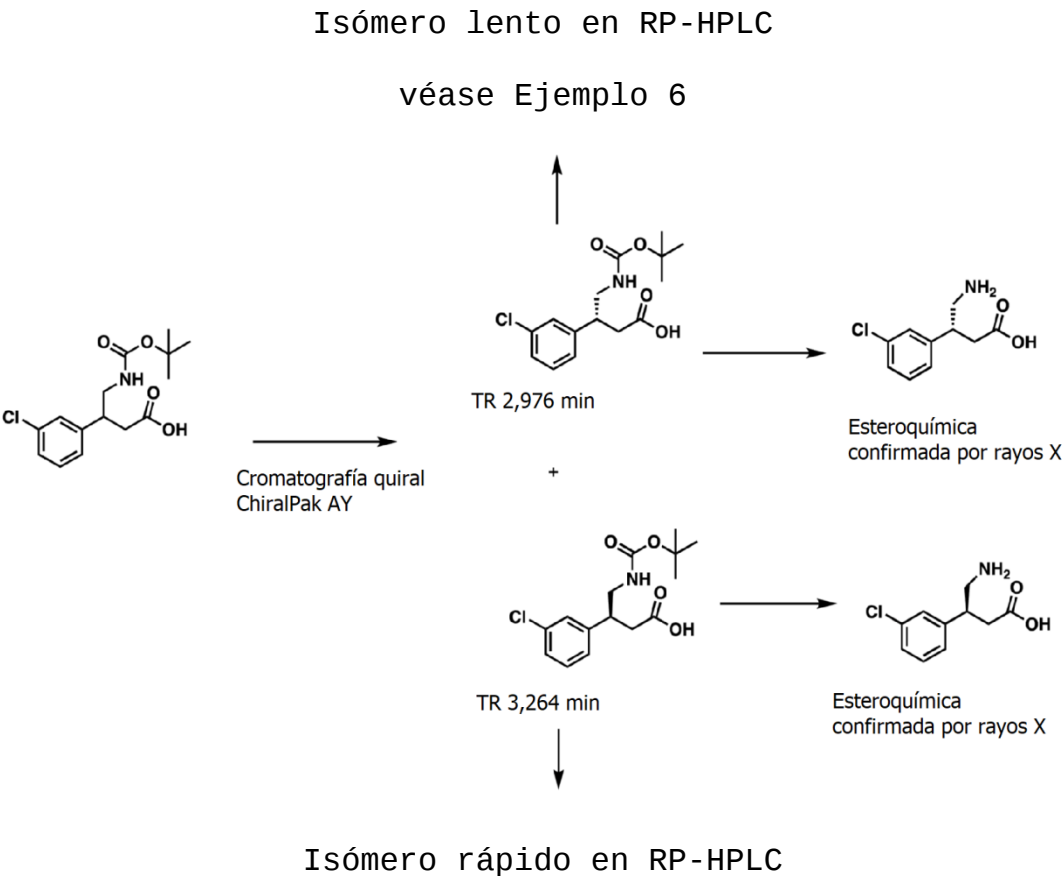
Estudio estereoquímico

10 Los compuestos de la invención contienen un estereocentro en la posición β del grupo γ-aminopropilo en el resto N-terminal. Sorprendentemente, se ha encontrado que uno de los estereoisómeros en esta posición está usualmente asociado con

15 una menor citotoxicidad y menores niveles de fármacos en el riñón. Este es el estereoisómero que se eluye más rápidamente en la cromatografía de fase inversa.

Por ejemplo, en el par de diastereoisómeros relacionados con los Ejemplos 5 y 6, el diastereómero que se eluye más rápido de una columna de HPLC de fase inversa muestra una menor exposición renal y menor citotoxicidad que el isómero más lento correspondiente. El diastereómero más rápido (Ejemplo 5) se deriva del ácido (S)-4-amino-3-(3-clorofenil butanoico), mediante análisis de rayos X de molécula pequeña del aminoácido correspondiente (como se muestra en el siguiente esquema).

10 Esquema 1



15

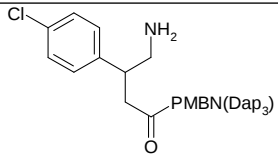
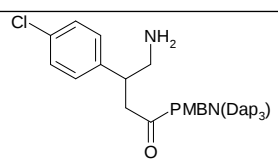
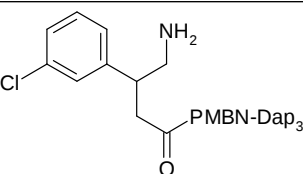
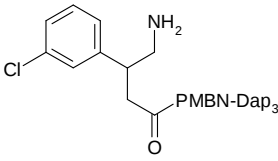
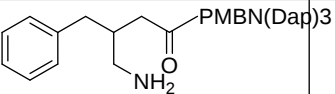
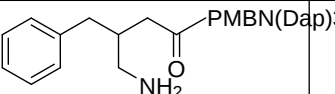
Se muestran comparaciones adicionales en la Tabla 3 a continuación. Los diastereómeros (epímeros en el grupo N-terminal) que se eluyen más rápidamente en la cromatografía de fase inversa, y que tienen desplazamientos químicos de RMN similares a los dados para el Ejemplo 5, probablemente tengan la misma estereoquímica absoluta que el Ejemplo 5, como se ha descrito anteriormente.

20

La estereoquímica absoluta asignada a cada uno de los compuestos en la Tabla 3 se muestra en la Tabla 1.

Tabla 3 - Resultados de estereoquímica

5

Ejemplo	Estructura	Citotoxicidad	Nivel de fármaco en el riñón	Nivel en el riñón en 4 h/citotoxicidad rel.
1	 Isómero "rápido"	8, 8	268	30
2	 Isómero "lento"	7, 2	538	75
5	 Isómero "rápido"	11, 6	170	15
6	 Isómero "lento"	7, 8	381	49
9	 Isómero rápido	12, 0	159	13
10	 Isómero lento	8, 0	346	43

La citotoxicidad se refiere a la CI₅₀ medida en relación con la registrada para la Polimixina B contra una línea celular HK-2.

El nivel de fármaco se refiere a la cantidad de compuesto encontrada en el riñón 4 horas después de una dosis sc de 17,2 mg/kg (µg/g) en un modelo de ratón.

5 **Datos adicionales**

Toxicidad renal del Ejemplo 24 en comparación con PMB después de cuatro dosis en ratón

10 A grupos de ratones macho CD-1 (n = 5) se les administró por vía subcutánea cuatro veces en intervalos de 8 h Polimixina B (PMB) a 12,5 o 25 mg de base libre/kg, o el compuesto del Ejemplo 24 a 25, 50 o 75 mg de base libre/kg. Inmediatamente después de la cuarta dosis, los ratones se transfirieron a

15 jaulas metabólicas y se recogió la orina durante 24 h para la determinación de biomarcadores urinarios. Después de la recolección de orina, los ratones se sacrificaron para la histopatología renal. Los niveles medios de biomarcadores se muestran en la Tabla 4 a continuación.

20

Tabla 4 - Biomarcadores urinarios

Compuest o	Dosis (mg/kg)	Biomarcadores urinarios				
		Cistatin a C	β-2 microglobuli na	Kim-1	NGA L	Albúmin a
Vehículo	-	22,24	0,05	17,01	0,0 0	3,44
PMB	12,5	29,45	3,43	21,89	0,3 0	3,75
PMB	25	44,51	43,83	3.446,4 2	4,3 7	7,73
Ej. 24	25	31,04	0,05	27,61	0,0 0	4,78
Ej. 24	50	33,97	13,22	171,59	0,6 3	6,95

Ej. 24	75	81,44	68,51	1.203,4 1	3,7 1	10,93
--------	----	-------	-------	--------------	----------	-------

Los biomarcadores urinarios se normalizaron con respecto a la creatinina urinaria.

Para los cinco biomarcadores, la expresión a 50 mg/kg del Ej. 24 fue menor que a 25 mg/kg de PMB, y para dos (Kim-1, NGAL), la expresión de los cinco biomarcadores a 75 mg/kg de dosis fue menor que para PMB a 25 mg/kg.

Los resultados de la histopatología se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5 - Resultados de histopatología

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Histopatología		
		Degeneración tubular/necrosis	Túbulos basófilos (corteza)	Figuras mitóticas aumentadas
Vehículo	-	0/5	0/5	0/5
PMB	12,5	0/5	0/5	0/5
PMB	25	5/5 (2 min/2 leve/1 moderado*)	5/5 (1 min/2 leve/2 moderado*)	3/5 (2 min/1 leve)
Ej. 24	25	0/5	0/5	0/5
Ej. 24	50	2/5 (2 min)	2/5 (2 min)	2/5 (2 min)
Ej. 24	75	5/5 (1 min/3 leve/1 moderado))	5/5 (2 min/1 leve/1 moderado/1 marcado)	5/5 (5 min)

* Un animal murió en el estudio

La histopatología renal a la dosis de 50 mg/kg del Ejemplo 24 fue menos grave que para PMB a una dosis de 25 mg/kg, y la histopatología renal fue similar a una dosis de 75 mg/kg del

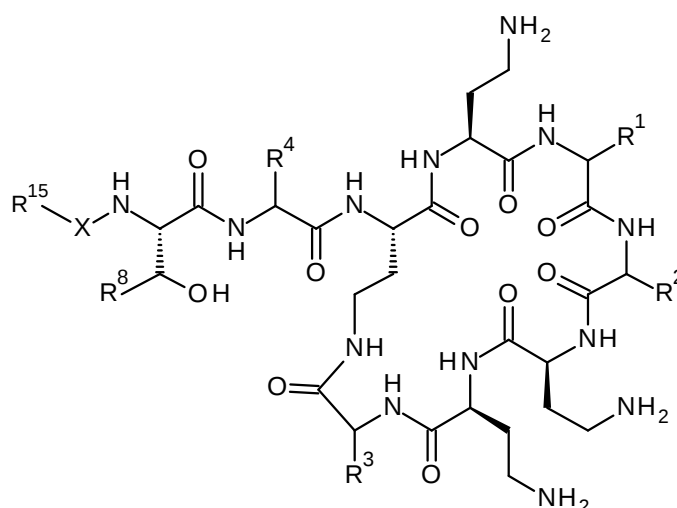
Ejemplo 24 en comparación con una dosis de PMB a 25 mg/kg.

Referencias

- 5 Todos los documentos mencionados en esta memoria
descriptiva se incorporan en el presente documento por
referencia en su totalidad.
- de Visser *et al.* *J. Peptide Res*, **61**, 2003, 298
- 10 Dolomanov *et al.* *J. Appl. Cryst.* **42**, 2009, 339
- Felluga *et al.* *Tetrahedron Asymmetry*, **19**, 2008, 945
- Sheldrick *Acta Cryst.* A71, 2015, 3-8
- Sheldrick *Acta Cryst.* C71, 2015, 3-8
- Vaara *et al.* *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, **52**, 2008.
- 15 3229
- Velkov *et al.* *ACS Chem. Biol.* **9**, 2014, 1172
- Velkov *et al.* *ACS Chem. Biol.* **9**, 2014, 1172
- WO 2014/188178
- WO 2016/083531
- 20 WO 2013/072695
- WO 2015/135976

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (I):



5 en la que:

-X- representa -C(O)-;

-R¹ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de fenilalanina, leucina, norleucina, valina o norvalina;

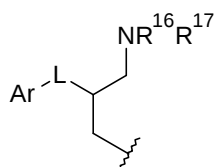
10 -R² es alquilo C₁₋₄ opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo;

-R³ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de treonina;

15 -R⁴ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es Dap;

-R⁸ es hidrógeno o metilo; y

-R¹⁵ es un grupo:



en la que:

20 -R¹⁶ es hidrógeno;

-R¹⁷ es hidrógeno;

-L- es un enlace covalente o metileno;

-Ar es arilo opcionalmente sustituido, tal como fenilo

sustituido

y sales, solvatos y formas protegidas de los mismos.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que $-R^1$, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de fenilalanina o leucina.

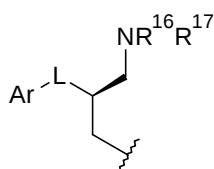
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que $-R^2$, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de leucina, aminobutirato, iso-leucina, treonina, valina o nor-valina.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que $-R^2$, junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es un residuo de leucina o aminobutirato.

5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que $-R^4$ junto con el grupo carbonilo y nitrógeno alfa al carbono al que está unido, es L-Dap.

6. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que $-R^8$ es metilo.

7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que $-R^{15}$ es:



8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que -L- es un enlace covalente.

5

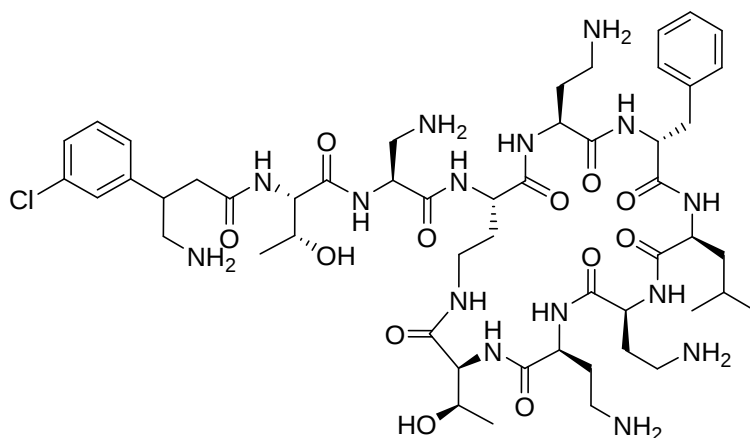
9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en el que -L- es metileno.

10. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las
10 reivindicaciones anteriores, en el que -Ar es fenilo opcionalmente sustituido.

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el fenilo sustituido con uno o dos grupos -R^S, donde cada
15 -R^S se selecciona independientemente de halo, alquilo, haloalquilo y arilo.

12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el fenilo sustituido con uno o dos grupos -R^S, donde cada
20 -R^S se selecciona independientemente de cloro, propilo, fenilo y tiofenilo.

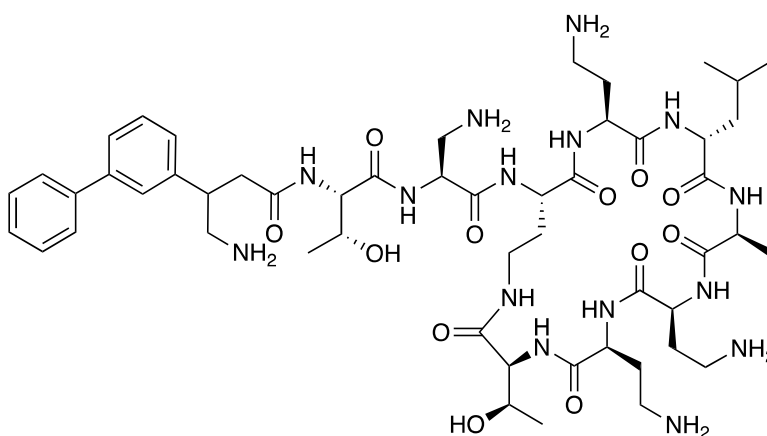
13. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de fórmula (II):



25

y sales, solvatos y formas protegidas del mismo.

14. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, que es un compuesto de fórmula (II):



5 y sales, solvatos, profármaco y formas protegidas del mismo.

15. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14,
10 opcionalmente junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición farmacéutica de
15 acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en un método de tratamiento o profilaxis.

17. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición farmacéutica de
20 acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en un método para tratar una infección microbiana.

18. Un compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la infección es una infección
25 bacteriana.

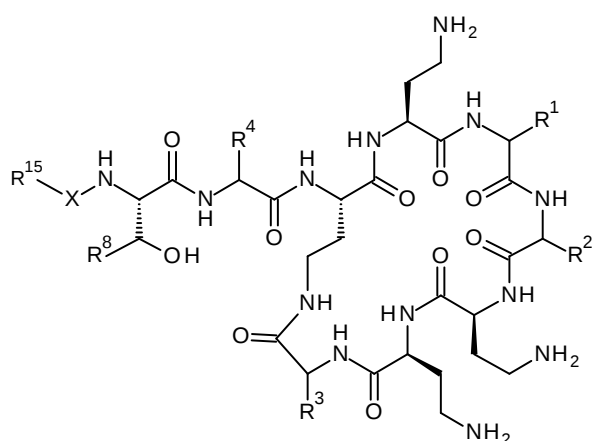
19. Un compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la infección bacteriana es una infección bacteriana gramnegativa.

5 20. Un compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la infección bacteriana gramnegativa se selecciona de *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Yersinia*
10 *pseudotuberculosis* y otras Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio*, bacterias de ácido acético, *Legionella* y alfa-proteobacterias.

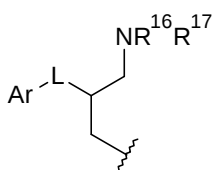
RESUMEN

COMPUESTOS

5 La invención proporciona un compuesto de polimixina de fórmula (I) y sales, solvatos y formas protegidas del mismo, composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de fórmula (I), y el uso de los compuestos y composiciones en métodos de tratamiento, tales como métodos para el tratamiento
10 de infecciones microbianas. Los compuestos de fórmula (I) se representan de este modo:



en la que -R¹⁵ es un grupo:



15 y -R¹⁶ es hidrógeno; -R¹⁷ es hidrógeno; -L- es un enlace covalente o metileno; y
-Ar es arilo opcionalmente sustituido. Los grupos -X-, -R¹, -R², -R³, -R⁴, y -R⁸ son como se definen en el presente documento.