



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2296651 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07D 413/14 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2012.12.10
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.07.18
(86)	Europeisk søknadsnr	09742552.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.05.08
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.03.23
(30)	Prioritet	2008.05.09, WO, PCT/IB08/051854
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Actelion Pharmaceuticals Ltd., Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Sveits
(72)	Oppfinner	HUBSCHWERLEN, Christian, 15 rue de la gendarmerie, F-68480 Durmenach, Frankrike LOCHER, Hans, Lindenstrasse 22, CH-4102 Binningen, Sveits
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	5-hydroksymetyl-oksazolidin-2-on-derivater for behandling av bakterielle intestinale sykdommer
(56)	Anførte publikasjoner	SU-A3- 1 156 597 US-A- 4 461 773 WO-A-02/059116 WO-A-03/032962 WO-A-2004/096221 WO-A-2005/058886 WO-A-2008/056335 ERA-CABRERA L ET AL: "In vitro activities of DA-7157 and DA-7218 against Mycobacterium tuberculosis and Nocardia brasiliensis" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 50, no. 9, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 3170-3172, XP002473516 ISSN: 0066-4804

5-HYDROKSYMETYL-OksAZOLIDIN-2-ON-DERIVATER FOR BEHANDLING AV BAKTERIELLE INTESTINALE SYKDOMMER

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelsen av visse 5-hydroksymetyl-oksazolidin-2-on-derivater for forebygging eller behandling av intestinale sykdommer som er forårsaket av *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus*.

Visse stammer av *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus* produserer toksiner som forårsaker diaré. Forekomsten av disse toksinproduserende stammene er ofte knyttet til anvendelsen av antibiotika.

Blant disse stammene forårsaker *Clostridium difficile* en anaerob, sporedannende, Gram-positiv bakterie som produserer to enterotoksiner (A og B), ikke bare diaré, men også mer alvorlige intestinale tilstander slik som livstruende psevdomembranøs kolitt. Den er for øyeblikket den vanligste kilden til smittsom diaré på sykehus og langtidspleiefasiliteter i den industrialiserte verden. Over de siste årene har dens utbredelse økt progressivt og er nå et betydelig klinisk problem i Nord-Amerika og Europa. Risikofaktorene inkluderer forutgående behandling med antibiotika, alder og et kompromittert immunsystem som skyldes f.eks. cytotoxisk kjemoterapi eller organtransplantasjon.

Den rådende behandling for *Clostridium difficile*-assosiert diaré (CDAD) er enten vankomycin eller metronidazol. I begge tilfeller observeres imidlertid høye tilbakefallsrater og produksjonen av toksiner og sporer forhindres ikke. Videre er behandlingen med vankomycin eller metronidazol en ytterligere faktor for å fremme utviklingen av vankomycin-resistente *Enterococcus spp.* (*E. faecalis* og *E. faecium*) og *Staphylococcus aureus*-stammer (henholdsvis VRE og VRSA) i tarmen (se W.N. Al-Nassir et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, publisert forut for trykking 28. april 2008). Enterococci er gram-positive cocci som er normale beboere i det gastrointestinale systemet. Imidlertid kan de også bli signifikante patogener som forårsaker endokarditt og urinveis-, blodstrøms- og sårinfeksjoner. Når man har fått det, kan intestinal kolonisering av VRE vare i årevis, å tjene som et reservoar for potensiell infeksjon av den koloniserte pasienten og for spredning av VRE til andre pasienter. VRE kan forekomme som ko-infeksjon i pasienter smittet med *C. difficile*, eller oftere forårsake infeksjon i visse høyrisikopasienter slik som

hematologi- og onkologipasienter, pasienter i intensivheter, eldre pasienter i langtidspleiefasiliteter og pasienter som mottar faste organtransplantater.

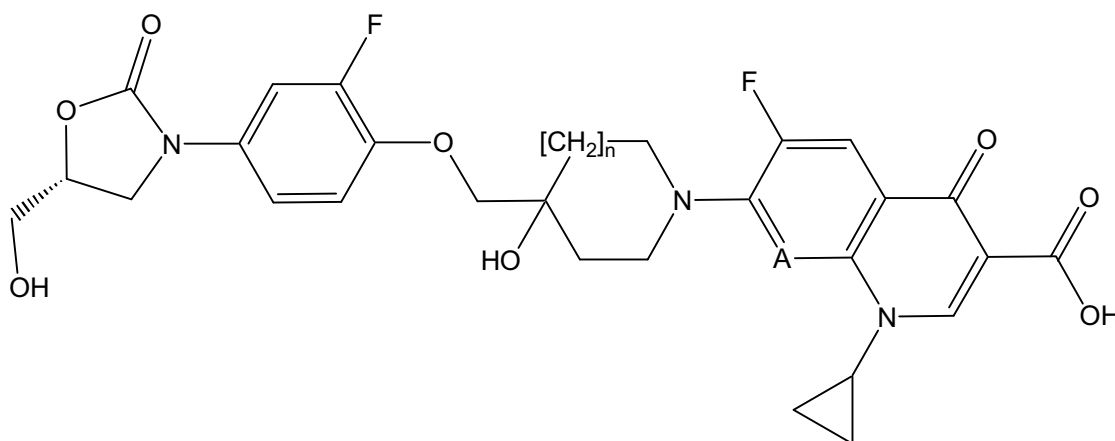
- Derfor er det et behov for en bedre behandling for tilfeller av CDAD og relaterte infeksjoner spesielt ved å identifisere forbindelser med sterk aktivitet mot *C. difficile* som
- 5 signifikant reduserer toksinbelastningen, produksjonen av sporer og som overvinner VRE samtidig som de har en liten innvirkning på den kommensale tarmflora.

- WO 03/032962, WO 2004/096221 og WO 2005/058888 beskriver antibakterielle forbindelser som inneholder en oksazolidinenhet og en 1-cyklopropyl-6-fluor-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksylsyre eller 1-cyklopropyl-6-fluor-4-okso-1,4-dihydro-
- 10 [1,8]naftyridin-3-karboksylsyre.

Dessuten har forbindelsene med formel I som definert i det følgende og deres antibakterielle aktivitet blitt beskrevet tidligere i PCT-søknad nr. PCT/IB2007/054557.

Forskjellige utførelsesformer av oppfinnelsen presenteres i det følgende:

- i) I henhold til dens første hovedutførelsesform vedrører foreliggende oppfinnelse
- 15 forbindelsene med formel I



I

hvor

A er N eller CH; og

n er 0 eller 1;

eller de farmasøytisk akseptable salter derav, for anvendelse i forebygging eller behandling av intestinale sykdommer som forårsakes av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus*.

- 5 De følgende avsnitt gir definisjoner for diverse uttrykk bruk heri og er ment å gjelde ensartet gjennom hele beskrivelsen og kravene med mindre en på annen måte uttrykkelig fremsatt definisjon gir en bredere eller smalere definisjon.

- 10 Uttrykket "forebygging av", "å forebygge" eller "forebygging" anvendt med referanse til en sykdom betyr enten at sykdommen ikke forekommer i pasienten eller dyret, eller at, selv om dyret eller pasienten er angrepet av sykdommen, er del eller alle symptomene på sykdommen enten redusert eller fraværende.

Uttrykket "behandling av", "å behandle" eller "en behandling" anvendt med referanse til en sykdom betyr enten at sykdommen er helbredet i pasienten eller dyret, eller at, selv om dyret eller pasienten forblir angrepet av sykdommen, er del eller alle symptomene på sykdommen enten redusert eller eliminert.

- 15 Uttrykket "farmasøytisk akseptable salter" viser til ikke-toksiske, uorganiske eller organiske syre- og/eller baseaddisjonssalter. Referanse kan gjøres til "Salt selection for basic drugs", *Int. J. Pharm.* (1986), **33**, 201-217.

Uttrykket "halogen" viser til fluor, klor, brom eller jod, og fortrinnsvis til fluor eller klor.

- 20 Med mindre det er brukt angående temperaturer viser uttrykket "omkring" plassert foran en tallverdi "X" i gjeldende søknad til et intervall som strekker seg fra X minus 10 % av X til X pluss 10 % av X, og fortrinnsvis til et intervall som strekker seg fra X minus 5 % av X til X pluss 5 % av X. I det spesielle tilfellet med temperaturer viser uttrykket "omkring" plassert foran en temperatur "Y" i den gjeldende søknaden til et intervall som strekker seg fra temperaturen Y minus 10 °C til Y pluss 10 °C, og fortrinnsvis til et intervall som strekker seg fra Y minus 5 °C til Y pluss 5 °C. I tillegg skal romtemperatur i den gjeldende patentsøknaden bety 25 °C.

ii) Fortrinnsvis vil forbindelsen med formel I som definert i utførelsesform i), eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, gi effektiv forebygging eller behandling av diareesykdommer assosiert med enterotoksogene stammer av *Clostridium difficile*,

Clostridium perfringens eller *Staphylococcus aureus* uten å øke konsentrasjonen av vankomycin-resistent enterococci (VRE) i tarmen.

iii) Mer foretrukket vil forbindelsen med formel I som definert i utførelsesform i), eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, gi effektiv forebygging eller behandling av diare-

5 sykdommer assosiert med enterotoksogene stammer av *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus* og reduksjon av konsentrasjonen av VRE i tarmen.

iv) Fortrinnsvis vil forbindelsene med formel I som definert i en av utførelsesformene i) til iii), eller de farmasøytisk akseptable saltene derav være slik at A er CH.

10 v) Fortrinnsvis vil også forbindelsene med formel I som definert i en av utførelsesformene i) til iv), eller de farmasøytisk akseptable saltene derav være slik at n er 1.

vi) I henhold til foretrukne underutførelsesformer av utførelsesformer i) til iii) vil forbindelsen med formel I eller dens farmasøytisk akseptable salt være valgt fra:

- 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-

15 fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksytsyre;

- 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-

fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-[1,8]naftyridin-

3-karboksytsyre;

- 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{3-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-

20 fenoksymetyl]-3-hydroksy-pyrrolidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksytsyre;

og de farmasøytisk akseptable saltene derav.

vii) I henhold til mer foretrukne underutførelsesformer av utførelsesformene i) til iii) vil forbindelsen med formel I eller dens farmasøytisk akseptable salt være 1-cyklopropyl-

6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-

25 4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksytsyre eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

viii) I henhold til ett aspekt av utførelsesformene i) til vii) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre forbindelsene med formel I som definert i en av utførelsesformene i) til vii), eller de farmasøytisk akseptable saltene derav, for anvendelse i behandling av de intestinale

sykdommene som forårsakes av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*.

ix) I henhold til ett foretrukket aspekt av utførelsesform viii) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre forbindelsene med formel I som definert i en av utførelsesformene i) til vii), eller
5 de farmasøytisk akseptable saltene derav, for anvendelse i behandling av de intestinale sykdommene som forårsakes av *Clostridium difficile* (især av en toksinproduserende stamme av *Clostridium difficile*).

x) I henhold til et annet hovedaspekt av utførelsesformene i) til vii) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre forbindelsene med formel I som definert i en av utførelsesformene i)
10 til vii), eller de farmasøytisk akseptable saltene derav, for anvendelse i forebygging av de intestinale sykdommene som forårsakes av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*.

xi) I henhold til ett foretrukket aspekt av utførelsesform x) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre forbindelsene med formel I som definert i en av utførelsesformene i) til vii), eller
15 de farmasøytisk akseptable saltene derav, for anvendelse i forebygging av de intestinale sykdommene som forårsakes av *Clostridium difficile* (især av en toksinproduserende stamme av *Clostridium difficile*).

xii) Fortrinnsvis vil pasientene i hvilke de intestinale sykdommene nevnt i utførelsesformene i) til xi) er tiltenkt å bli forebygget være pasienter behandlet med andre
20 antibiotika eller med antivirale terapier, pasienter med et immunkompromittert system slik som cytotoksisk kjemoterapi eller organtransplanterte pasienter, eldre (65 år eller eldre) pasienter, eller pasienter på intensiv enheter eller på langtidspleiefasiliteter.

xiii) Enda en annen hovedutførelsesform av denne oppfinnelsen vedrører anvendelsen i forebygging eller behandling i en pasient med en intestinal sykdom som er forårsaket av
25 bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*, nevnte anvendelse omfatter administrasjonen til nevnte pasient av en effektiv mengde av en forbindelse med formel I som definert i en av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, i en varighet tilstrekkelig for å forebygge eller behandle den intestinale sykdommen.

xiv) Fortrinnsvis vil anvendelsen i utførelsesform xiii) gi effektiv forebygging eller behandling av diareysykdommer assosiert med enterotoksogene stammer av *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus* uten å øke konsentrasjonen av vankomycin-resistente enterococci (VRE) i tarmen.

- 5 xv) Mer foretrukket vil anvendelsen i utførelsesform xiii) gi effektiv forebygging eller behandling av diareysykdommer assosiert med enterotoksogene stammer av *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus* og reduksjon av konsentrasjonen av VRE i tarmen.

- 10 xvi) I henhold til ett aspekt av utførelsesformene xiii) til xv) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre en anvendelse ved behandling i en pasient av en intestinal sykdom som er forårsaket av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*, nevnte anvendelse omfatter administrasjonen til nevnte pasient av en effektiv mengde av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, i en varighet
- 15 tilstrekkelig for å behandle den intestinale sykdommen.

xvii) I henhold til ett foretrukket aspekt av utførelsesform xvi) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre en anvendelse ved behandling i en pasient av en intestinal sykdom som er forårsaket av *Clostridium difficile* (især av en toksinproduserende stamme av *Clostridium difficile*).

- 20 xviii) I henhold til et annet aspekt av utførelsesformene xiii) til xv) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre en anvendelse ved forebygging i en pasient av en intestinal sykdom som er forårsaket av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*, nevnte anvendelse omfatter administrasjonen til nevnte pasient av en effektiv mengde av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, i en varighet
- 25 tilstrekkelig for å forebygge den intestinale sykdommen.

- xix) I henhold til ett foretrukket aspekt av utførelsesform xviii) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre en anvendelse ved forebygging i en pasient av en intestinal sykdom som er forårsaket av *Clostridium difficile* (især av en toksinproduserende stamme av
- 30 *Clostridium difficile*).

xx) Fortrinnsvis vil pasientene underkastet en anvendelse i én av utførelsesformene xiii) til xix) være pasienter behandlet med andre antibiotika eller med antivirale terapier, pasienter med et immunkompromittert system slik som cytotoxisk kjemoterapi eller organtransplanterte pasienter, eldre (65 år eller eldre) pasienter, eller pasienter i intensiv-

5 enheter eller i langtidspleiefasiliteter.

xxi) Enda et ytterligere aspekt av denne oppfinnelsen vedrører anvendelsen av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, for fremstillingen av et medikament tiltenkt å forebygge eller behandle en intestinal sykdom som er forårsaket av bakterier

10 valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*.

xxii) I henhold til ett aspekt av utførelsesform xxi) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre anvendelsen av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, for fremstillingen av et medikament tiltenkt å behandle en intestinal sykdom som er forårsaket av bakterier valgt

15 fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*.

xxiii) I henhold til ett foretrukket aspekt av utførelsesform xxii) vil den intestinale sykdommen tiltenkt å bli behandlet være forårsaket av *Clostridium difficile* (især av en toksinproduserende stamme av *Clostridium difficile*).

xxiv) I henhold til et annet aspekt av utførelsesform xxi) vil foreliggende oppfinnelse

20 vedrøre anvendelsen av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, for fremstillingen av et medikament tiltenkt å forebygge en intestinal sykdom som er forårsaket av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*.

xxv) I henhold til ett foretrukket aspekt av utførelsesform xxiv) vil den intestinale

25 sykdommen tiltenkt å bli forebygget være forårsaket av *Clostridium difficile* (især av en toksinproduserende stamme av *Clostridium difficile*).

xxvi) Fortrinnsvis vil pasientene for hvilke medikamentet fremstilt ifølge én av utførelsesformene xxi) til xxv) være tiltenkt være pasienter behandlet med andre antibiotika eller med antivirale terapier, pasienter med et immunkompromittert system slik

som cytotoksisk kjemoterapi eller organtransplanterte pasienter, eldre (65 år eller eldre) pasienter, eller pasienter i intensivenheter eller i langtidspleiefasiliteter.

xxvii) Et annet aspekt av denne oppfinnelsen vedrører en anvendelse ved forebygging eller behandling i et dyr (f.eks. i en hund, en katt, en gris, en ku eller en hest) av en intestinal sykdom forårsaket av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*, nevnte anvendelse omfatter administrasjonen til nevnte dyr av en effektiv mengde av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, i en varighet tilstrekkelig for å behandle den intestinale sykdommen.

xxviii) I henhold til ett aspekt av utførelsesform xxvii) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre en anvendelse ved behandling i et dyr (f.eks. i en hund, en katt, en gris, en ku eller en hest) av en intestinal sykdom som er forårsaket av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*, nevnte anvendelse omfatter administrasjonen til nevnte pasient av en effektiv mengde av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, i en varighet tilstrekkelig for å behandle den intestinale sykdommen.

xxix) I henhold til et annet aspekt av utførelsesform xxvii) vil foreliggende oppfinnelse vedrøre en anvendelse ved forebygging i et dyr (f.eks. i en hund, en katt, en gris, en ku eller en hest) av en intestinal sykdom som er forårsaket av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*, nevnte anvendelse omfatter administrasjonen til nevnte pasient av en effektiv mengde av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, i en varighet tilstrekkelig for å forebygge den intestinale sykdommen.

De intestinale sykdommene tiltenkt å bli forebygget eller behandlet i henhold til utførelsesformene i) til xxix) av denne oppfinnelsen omfatter spesielt diaré, kolitt og psevdomembranøs kolitt. Fortrinnsvis vil nevnte intestinale sykdommer være forårsaket av *Clostridium difficile* (og spesielt av en toksinproduserende stamme av *Clostridium difficile*).

Den mest formålstjenlige administrasjonsruten for forbindelsene med formel I anvendt i henhold til utførelsesformene i) til xxix) ifølge foreliggende oppfinnelse vil være den orale

ruten. Administrasjon kan være daglig (f.eks. én til fire ganger daglig) eller kan være mindre hyppig (f.eks. annenhver dag eller én eller to ganger i uken).

Selv om de nøyaktige administrasjonsdosene av en forbindelse med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii), eller av et farmasøytisk akseptabelt salt derav, vil måtte
5 bestemmes av den behandlende legen eller veterinæren, er det forventet at en mengde på mellom 0,5 og 50 mg av forbindelsen med formel I eller farmasøytisk akseptabelt salt derav per kg av pasientens kroppsvekt per dag (for eksempel en mengde på mellom 1 og 5 mg av forbindelsen med formel I eller farmasøytisk akseptabelt salt derav per kg av pasientens kroppsvekt per dag) gitt én eller to ganger daglig med en varighet på 3 til 15
10 dager (for eksempel med en varighet på 7 til 14 dager) vil være passende.

Produksjonen av farmasøytiske sammensetninger som inneholder forbindelser med formel I som definert i én av utførelsesformene i) til vii) eller farmasøytisk akseptable salter derav kan utføres på en måte som vil være velkjent for enhver fagmann (se for eksempel Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 21. utgave (2005), Del 5,
15 “Pharmaceutical Manufacturing” [publisert av Lippincott Williams & Wilkins]) ved å bringe den beskrevne forbindelsen med formel I eller dens farmasøytisk akseptable salter, eventuelt i kombinasjon med andre terapeutisk verdifulle substanser, i en galenisk administrasjonsform sammen med passende, ikke-toksiske, inerte, terapeutisk kompatible faste eller flytende bærematerialer og, om ønsket, vanlige farmasøytiske adjuvanter.

20 Forbindelsene med formel I kan fremstilles i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse ved å anvende prosedyrene beskrevet i det følgende.

FREMSTILLING AV FORBINDELSER MED FORMEL I

Forkortelser:

De følgende forkortelsene anvendes gjennom hele beskrivelsen og eksemplene:

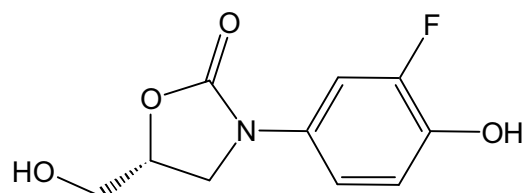
	AcOH	eddiksyre
5	AD-mix α	1,4- <i>bis</i> (dihydrokinin)ftalazin, $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3 og $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$
	AD-mix β	1,4- <i>bis</i> (dihydrokinidin)ftalazin, $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3 og $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$
	Alloc	allyloksykarbonyl
10	aq.	vandig
	Boc	<i>tert</i> -butoksykarbonyl
	<i>t</i> -BuOK	kalium- <i>tert</i> -butylat
	Cbz	benzyloksykarbonyl
	CDAD	<i>Clostridium difficile</i> assosiert diaré
15	CFU	kolonidannende enheter
	CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
	DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
	DCM	diklormetan
	DIAD	diisopropylazodikarboksylat
20	DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyletylamin
	DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
	DMSO	dimetylsulfoksid
	EA	etylacetat
	EDC	1-(dimetylaminopropyl)-3-etylkarbodiimid-hydroklorid
25	ESI	Elektronsprayionisasjon
	eter eller Et_2O	dietyleter
	FC	flashkromatografi

	h	time
	Hex	<i>n</i> -heksan
	IC50	konsentrasjon som reduserer virkningen med 50 %
	LZD-R	linezolid-resistent
5	MeCN	acetonitril
	MCPBA	<i>meta</i> -klorperbenzosyre
	MIC	minimum hemmende konsentrasjon for å hemme bakterievekst
	MIC90	laveste hemmende konsentrasjon for å hemme veksten av ≥ 90 % av stammer
10	MRSA	methicillin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i>
	MeOH	metanol
	MS	Massespektroskopi
	NaOMe	natriummetylat
	NMP	<i>N</i> -metylpyrrolidinon
15	OD595	optisk tetthet målt ved 595 nm
	org.	organisk
	Pd/C eller Pd(OH) ₂ /C	palladium eller dihydroksypalladium på trekull
	PPh ₃	trifenylfosfin
	rt	romtemperatur
20	sat.	mettet
	SiO ₂	silikagel
	TBDMSCl	<i>tert</i> -butyldimetylsilylchlorid
	TEA	trietylamin
	TFA	trifluorediksyre
25	THF	tetrahydrofuran
	TMSCl	trimetylsilylchlorid

Generelle fremstillingsmetoder:

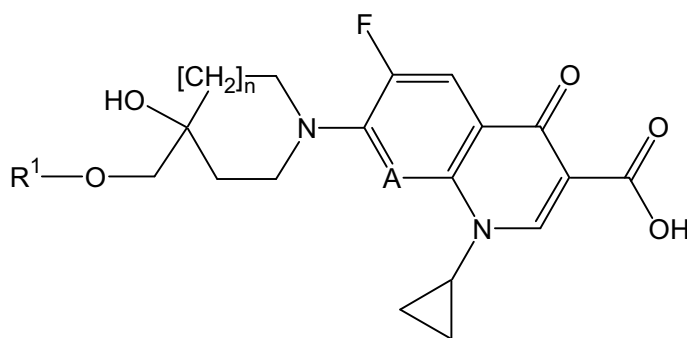
Forbindelsene med formel I kan fremstilles i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse ved

a) reaksjon av forbindelsen med formel II



II

5 med en forbindelse med formel III



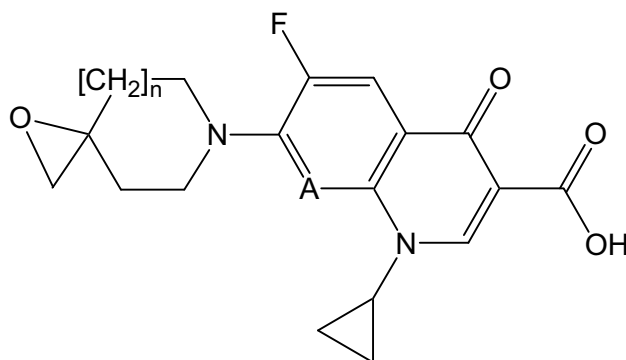
III

hvor n og A er som definert i formel I og R^1 er (C_1-C_3) alkylsulfonfyl (f.eks. metylsulfonfyl), trifluormetylsulfonfyl eller arylsulfonfyl (f.eks. fenyl- eller *p*-tolylsulfonfyl) fortrinnsvis mellom omkring 10 °C og 100 °C (mer foretrukket mellom omkring 40 °C og 80 °C), i nærvær av en uorganisk base slik som K_2CO_3 eller en organisk base slik som TEA i et organisk løsemiddel (f.eks. DMF);

eller

- 13 -

b) reaksjon av en forbindelse med formel II med en forbindelse med formel IV

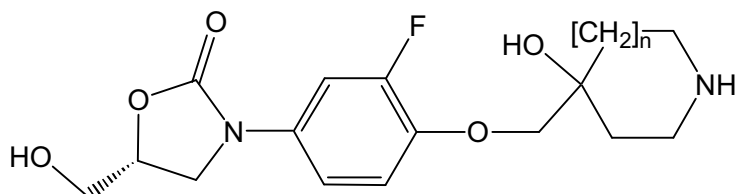


IV

hvor n og A er som definert i formel I, som beskrevet i paragraf a). Nevnte forbindelser med formel IV kan oppnås ved behandling av forbindelser med formel III i nærvær av en organisk base (f.eks. TEA) eller en uorganisk base (f.eks. K_2CO_3 eller et alkalimetylat slik som NaOMe eller et alkalihydrid slik som NaH) i et organisk løsemiddel (f.eks. DMF);

eller

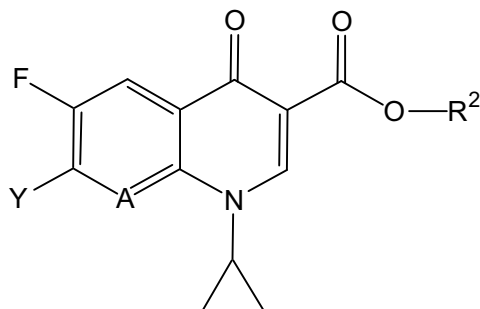
c) reaksjon av en forbindelse med formel V



V

hvor n er som definert i formel I,

med en forbindelse med formel VI

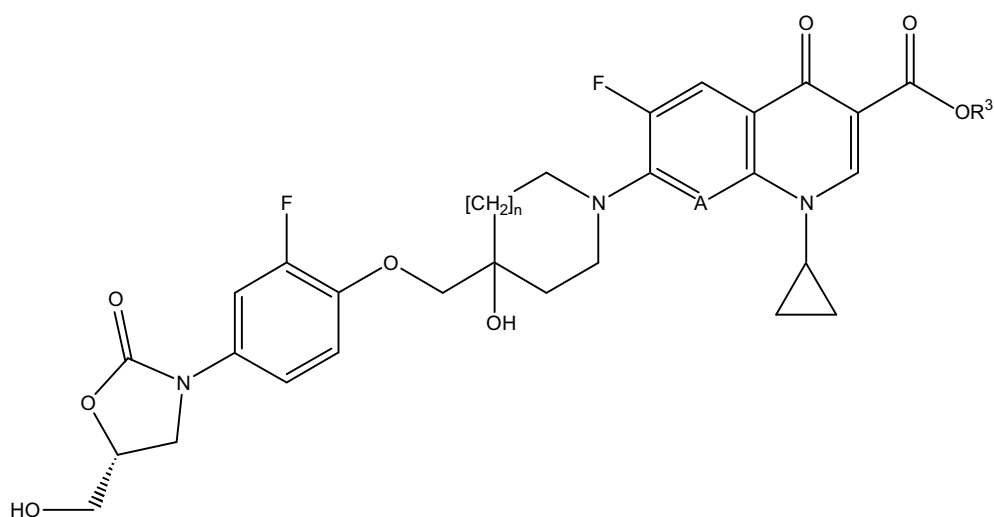


VI

hvor A er som definert i formel I, Y er halogen og R² er hydrogen, BF₂ eller B(OC(=O)(C₁-C₄)alkyl)₂, (C₁-C₅)alkyl (f.eks. metyl, etyl, *n*-propyl, *iso*-propyl eller *tert*-butyl), allyl, aryl-(C₁-C₅)alkyl (f.eks. benzyl, *p*-nitrobenzyl eller *p*-metoksybenzyl),
 5 tri-(C₁-C₅)alkylsilyl (f.eks. trimetylsilyl eller *tert*-butyldimetylsilyl) eller diaryl-(C₁-C₅)alkylsilyl (f.eks. *tert*-butyldifenylsilyl), fortrinnsvis mellom omkring 10 °C og 100 °C, mer foretrukket mellom omkring 40 °C og 80 °C i nærvær av en organisk base, slik som TEA eller DIPEA, i et organisk løsemiddel, f.eks. NMP;

eller

10 d) omdannelse av en forbindelse med formel VII



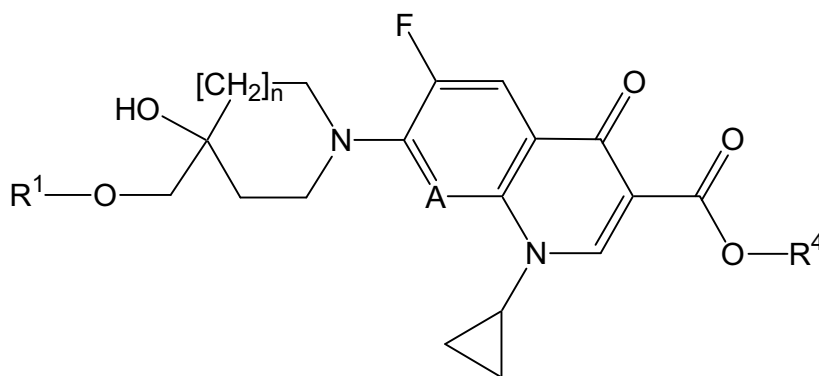
VII

hvor R³ er (C₁-C₅)alkyl (f.eks. metyl, etyl, *n*-propyl, *iso*-propyl eller *tert*-butyl), aryl-(C₁-C₅)alkyl (f.eks. benzyl, *p*-nitrobenzyl eller *p*-metoksybenzyl), allyl,

tri-(C₁-C₅)alkylsilyl (f.eks. trimetylsilyl eller *tert*-butyldimetylsilyl) eller diaryl-(C₁-C₅)alkylsilyl (f.eks. *tert*-butyldifenylsilyl) og n og A er som definert i formel I til den tilsvarende forbindelsen med formel I ved hydrolyse, forsåpning eller hydrogenolyse (f.eks. som omtalt i *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994)).

5 Med hensyn til fremgangsmåten over skal det følgende bli bemerkes:

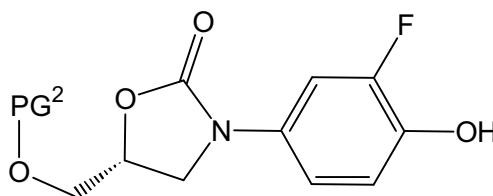
- ❖ angående variant a) kunne forbindelsen med formel III også bli erstattet av en ester derav, dvs. en forbindelse med formel III_E



III_E

10 hvori n, A og R¹ er som definert i formel III og R⁴ representerer alkyl, allyl eller arylalkyl, i hvilket tilfelle et esteravbeskyttelsestrinn ville etterfølge reaksjonen av forbindelsen med formel III_E med forbindelsen med formel II (generelle metoder for å utføre esteravbeskyttelsestrinnet har blitt omtalt i *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994));

- ❖ angående variant a) kunne forbindelsen med formel II også bli erstattet av en silyleter derav, dvs. en forbindelse med formel II_{PG}

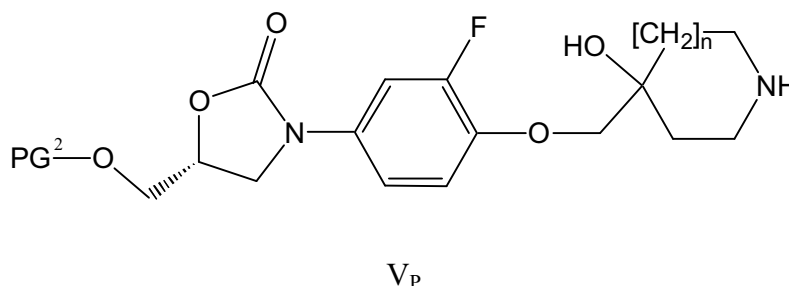


II_{PG}

15 hvori PG² representerer en silylbeskyttende gruppe for en alkoholfunksjon slik som et tri-(C₁-C₅)alkylsilyl (f.eks. trimetylsilyl eller *tert*-butyldimetylsilyl) eller diaryl-(C₁-C₅)alkylsilyl (f.eks. *tert*-butyldifenylsilyl), i hvilket tilfelle et avbeskyttelses-

trinn ville etterfølge reaksjonen av forbindelsen med formel III eller III_E med forbindelsen med formel II_{PG} (generelle metoder for å utføre slike reaksjoner har blitt omtalt i Protecting groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994));

- ❖ angående variant c) kunne forbindelsen med formel V også bli erstattet av en forbindelse med formel V_P



hvor n er som definert i formel V og PG² representerer en beskyttelsesgruppe for en alkoholfunksjon (f.eks. en alkylsilyl- eller diarylalkylsilylgruppe slik som trimetylsilyl, *tert*-butyldimetylsilyl eller *tert*-butyldifenylsilyl), i hvilket tilfelle det passende avbeskyttelsestrinnet ville etterfølge reaksjonen av forbindelsen med formel V_P med forbindelsen med formel VI (generelle metoder for å utføre slike reaksjoner har blitt omtalt i Protective groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994));

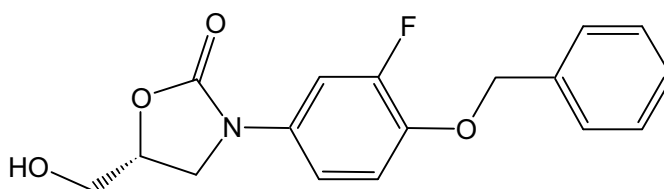
- ❖ angående variant c), når R² ikke er H, er et ytterligere esteravbeskyttelsestrinn nødvendig (generelle metoder for å utføre slike reaksjoner har blitt omtalt i Protective groups, Kocienski, P.J., Thieme (1994)), bortsett fra i tilfellene hvor R² er BF₂ eller B(OC(=O)(C₁-C₄)alkyl)₂ hvor hydrolysen skjer allerede under den sure opparbeidingen.

De således oppnådde forbindelsene med formel I kan, hvis ønsket, omdannes til sine salter, og især til sine farmasøytisk akseptable salter.

Dessuten, når forbindelsene med formel I oppnås i form av blandinger av enantiomerer, kan enantiomerene separeres ved å anvende metoder kjent for fagmannen (f.eks. ved dannelse og separasjon av diastereomere salter eller ved kromatografi over en kiral stasjonær fase). Når forbindelsene med formel I oppnås i form av blandinger av diastereomerer, kan de separeres ved en passende kombinasjon av silikagelkromatografi, HPLC og krystalliseringsteknikker.

*Fremstilling av de forskjellige synteseintermediatene:**Fremstilling av forbindelsen med formel II*

Forbindelsen med formel II kan oppnås ved hydrogenering av forbindelsen med formel VIII

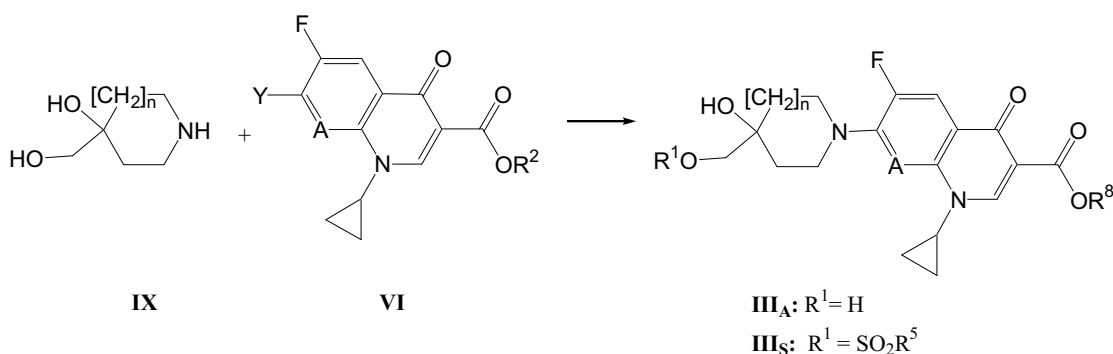


VIII

- 5 over en edelmetallkatalysator slik som palladium eller platina på trekull i et løsemiddel slik som THF, MeOH eller EA mellom 0 °C og 40 °C eller ved hydrolyse i nærvær av en løsning av HBr i vann eller AcOH mellom 0 °C og 80 °C i et løsemiddel slik som AcOH.

Fremstilling av forbindelsene med formel III

Forbindelsene med formel III kan fremstilles som oppsummert i Skjema 1 nedenfor.

**Skjema 1**

- 10 I Skjema 1 er R² H, alkyl, allyl eller arylalkyl, og de andre symbolene er som tidligere.

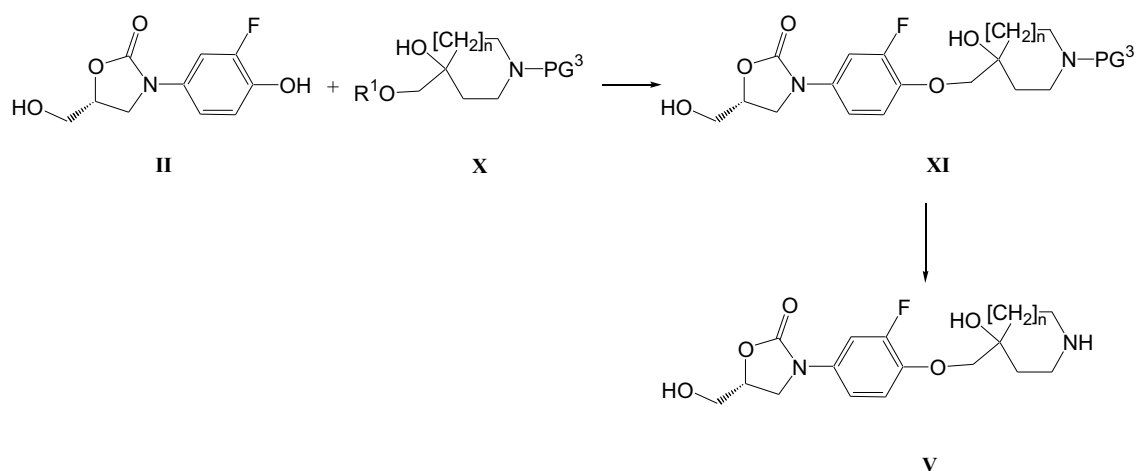
Forbindelsene med formel III hvori R¹ er SO₂R⁵, R⁵ er alkyl, trifluormetyl eller aryl som fenyl eller *p*-tolyl kan oppnås (Skjema 1) fra forbindelsene med formel III_A hvori R¹ er H ved reaksjon med de tilsvarende sulfonylklorider i nærvær av en organisk base slik som TEA i et løsemiddel slik som DCM eller THF mellom -10 °C og 50 °C. Forbindelsene med

15 formel III_A kan fremstilles ved reaksjon av forbindelsene med formel VI med piperidinene

eller pyrrolidinene med formel IX i nærvær av en organisk base slik som TEA eller DIPEA mellom 40 °C og 100 °C i et løsemiddel slik som THF, DMF eller NMP. Hvis R² er benzyl, kan karboksylsyren med formel III_s frigjøres i henhold til standardprosedyrer som beskrevet i *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994) (f.eks. hydrogenering over Pd/C).

Fremstilling av forbindelsene med formel V

Forbindelsene med formel V kan fremstilles som oppsummert i Skjema 2 nedenfor.



Skjema 2

Forbindelsene med formel V kan oppnås ved å avbeskytte forbindelsene med formel XI hvori PG³ representerer en aminobeskyttelsesgruppe slik som alkoksykarbonyl (f.eks. Boc), benzyloksykarbonyl (f.eks. Cbz), Alloc eller benzyl. Generelle metoder for å utføre slike beskyttelses- / avbeskyttelsessekvenser av sekundære aminer har blitt omtalt i *Protective groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994).

Forbindelsene med formel XI kan oppnås ved å reagere en forbindelse med formel II med forbindelsene med formel X hvori R¹ er SO₂R⁵, R⁵ er alkyl, trifluormetyl eller aryl som fenyl eller *p*-tolyl, eller ved å reagere en forbindelse med formel II med de tilsvarende epoksidene avledet fra forbindelsene med formel X. Nevnte epoksider kan oppnås fra forbindelsene med formel X, hvori R¹ er SO₂R⁵ ved behandling med enten en organisk base slik som TEA, pyridin eller DBU eller en uorganisk base slik som K₂CO₃ i et løsemiddel slik som THF, eter eller DCM mellom -10 °C og 40 °C. Forbindelsene med formel X hvori R¹ er H er enten kommersielt tilgjengelige (f.eks. forbindelser X hvori PG³

= Boc, $n = 1$ og $R^1 = H$, eller epoksidet avledet fra forbindelser med formel X hvori $PG^3 = Boc$, $n = 0$) eller kan lages som forklart senere. Alternativt kan forbindelsene med formel XI oppnås ved reaksjon av forbindelsen med formel II med forbindelsene med formel X hvori R^1 er H under Mitsunobu-betingelser.

5 *Fremstilling av forbindelsene med formel VI*

Forbindelsene med formel VI hvori R^2 er hydrogen, Me eller Et er kommersielt tilgjengelige (f.eks. forbindelser hvori $A = CH$, $Y = Cl$ og $R^2 = H$, Me eller Et, eller $Y = F$ og $R^2 = BF_2$, eller forbindelser hvori $A = N$, $Y = Cl$ og $R^2 = H$ eller Et). Forbindelsene med formel VI hvori R^2 er $B(OC(=O)(C_1-C_4)alkyl)_2$ kan oppnås fra forbindelser med formel VI hvori R^2 er H i henhold til WO 88/07998. De andre forbindelsene med formel VI kan oppnås i henhold til standardmetoder fra forbindelser med formel VI hvori R^2 er H.

Fremstilling av forbindelsene med formel VII

Forbindelsene med formel VII kan oppnås ved å koble forbindelser med formel V eller, alternativt, forbindelser med formel V_P som tidligere definert med forbindelser med formel VI som tidligere definert bortsett fra at R^2 representerer $(C_1-C_5)alkyl$ (f.eks. metyl, etyl, *n*-propyl, *iso*-propyl eller *tert*-butyl), aryl- $(C_1-C_5)alkyl$ (f.eks. benzyl, *p*-nitrobenzyl eller *p*-metoksybenzyl), allyl, tri- $(C_1-C_5)alkylsilyl$ (f.eks. trimetylsilyl eller *tert*-butyldimetylsilyl) eller diaryl- $(C_1-C_5)alkylsilyl$ (f.eks. *tert*-butyldifenylsilyl), under de samme betingelsene som de beskrevet for reaksjonen av forbindelsene med formel V med forbindelsene med formel VI. Hvis forbindelsene med formel V_P anvendes, kan avbeskyttelsestrinnet utføres etter koblingsreaksjonen.

Fremstilling av forbindelsen med formel VIII

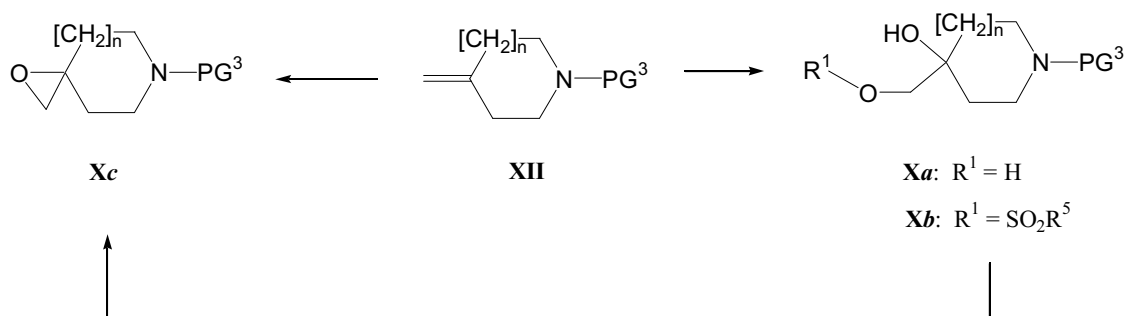
Forbindelsen med formel VIII kan oppnås i samsvar med WO 2004/096221.

Fremstilling av forbindelsene med formel IX

Forbindelsene med formel IX kan oppnås ved å avbeskytte forbindelsene med formel X ($R^1 = H$), f.eks. ved behandling av de tilsvarende Boc-beskyttede forbindelsene med TFA eller ved hydrogenering av de tilsvarende Cbz-beskyttede forbindelsene over Pd/C.

Fremstilling av forbindelsene med formel X

Forbindelsene med formel X kan fremstilles fra metylidenderivatene med formel XII som oppsummert i Skjema 3 nedenfor.



Skjema 3

Forbindelsene med formel Xb, dvs. forbindelsene med formel X hvori R¹ er SO₂R⁵, fremstilles fra de tilsvarende forbindelsene med formel Xa hvori R¹ er H ved å anvende de samme metodene anvendt for omdannelsen av forbindelser med formel III_A til forbindelser med formel III_S. Forbindelser med formel Xa oppnås enten fra de kjente metylidene-derivatene med formel XII (f.eks. de hvori n = 0 og PG³ = benzyl, Boc eller benzyloksykarbonyl - se EP 241206 og EP 550025; eller de hvori n = 1 og PG³ = benzyl, Boc som er kommersielle) enten ved osmiumtetroksidkatalysert *cis*-dihydroksylering eller ved dens asymmetriske versjon (Sharpless dihydroksylering ved å anvende AD-mix α eller β) som beskrevet i *J. Am. Chem. Soc.* (1988), **110**, 1968. Forbindelsene med formel Xc, dvs. epoksidet avledet fra forbindelser med formel Xb oppnås enten ved intramolekylær ringlukking av forbindelser med formel Xb med en uorganisk base slik som K₂CO₃ eller NaH eller en organisk base slik som TEA eller DBU, eller ved epoksidering av metylidendobbelbindingen i forbindelser med formel XII med en persyre slik som MCPBA. Alternativt kan forbindelser med formel Xc også oppnås ved reaksjon av de tilsvarende oksoderivatene (kommersielle når n = 0 eller 1 og PG³ = Cbz eller Boc) med trimetylsulfoksoniumjodid eller trimetylsulfoniumjodid i nærvær av et alkalihydroksid slik som kaliumhydroksid i et polart løsemiddel slik som MeCN mellom 20 og 100 °C (som beskrevet i *J. Am. Chem. Soc.* (1965), **87**, 1353-1364 og *Tetrahedron Lett.* (1987), **28**, 1877-1878).

Spesielle utførelsesformer av oppfinnelsen er beskrevet i de følgende eksemplene, som tjener til å illustrere oppfinnelsen i større detalj uten å begrense dens omfang på noen måte.

EKSEMPLER

Alle temperaturer er angitt i °C. Alle analytiske og preparative HPLC-undersøkelser på ikke-kirale faser utføres ved å anvende RP-C18-baserte kolonner. Analytiske HPLC-undersøkelser utføres på to forskjellige instrumenter med syklustider på henholdsvis ~2,5 min og ~3,5 min. Med mindre annet er angitt tilsvarer verdiene indikert for MS hovedtoppene ((M+H)⁺ med en variasjon på +/- 0,5 enheter). I NMR-spektre er koblingskonstantene J gitt i Hz.

Standard opparbeidingsprosedyre:

Etter fortynning i det passende org. løsemidlet (se tilsvarende eksempeltekst), separeres den org. fasen og vaskes sekvensielt med vann og saltløsning. I tilfelle med reaksjon utført i et vannløselig løsemiddel (f.eks. MeOH, THF eller DMF), tilbakevaskes de kombinerte aq. sjiktene med det samme løsemidlet anvendt for å utføre opparbeidingen. De kombinerte org. fasene tørkes over MgSO₄ og filtreres. Filtratet inndampes under redusert trykk.

Standard kromatografiprosedyre:

Råmaterialet løses i minimalt med eluent (se tilsvarende eksempeltekst) og kromatograferes over SiO₂. De relevante fraksjonene ble slått sammen og inndampet under redusert trykk.

Eksempel 1: 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksytsyre:

1.i. (R)-3-(3-fluor-4-hydroksy-fenyl)-5-hydroksymetyl-oksazolidin-2-on:

En løsning av (R)-3-(4-benzyloksy-3-fluor-fenyl)-5-hydroksymetyl-oksazolidin-2-on (6,34 g, fremstilt i overensstemmelse med WO 2004/096221) i THF/MeOH (1:1; 200 ml) ble hydrogenert over Pd/C 10 % (1 g) natten over. Katalysatoren ble filtrert fra, filtratet inndampet under redusert trykk og residuet omrørt i EA. Krystallene ble samlet ved filtrering, og ga 3,16 g (70 % utbytte) av et fargeløst fast stoff.

¹H NMR (DMSO-d₆; δ ppm): 3,5 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,74 (dd, J = 8,8, 6,4, 1H), 3,99 (t, J = 8,8, 1H), 4,64 (m, 1H), 5,16 (t, J = 5,6, 1H), 6,93 (dd, J = 9,7, 8,8, 1H), 7,08 (ddd, J = 8,8, 2,6, 1,2, 1H), 7,45 (dd, J = 13,5, 2,6, 1H), 9,66 (s, 1H).

MS (ESI): 228,1.

1.ii. 4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-okszolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-karboksylysyre-benzylester:

En løsning av intermediat 1.i (1,27 g) og 1-oksa-6-aza-spiro[2,5]oktan-6-karboksylysyre-benzylester (1,60 g; fremstilt i overensstemmelse med US 4244961) ble løst i DMF (15 ml) og behandlet med Na₂CO₃ (1,16 g). Blandingen ble varmet ved 100 °C natten over. Residuet oppnådd etter opparbeiding (DCM) ble omrørt i EA, og det faste stoffet ble samlet ved filtrering og vasket sekvensielt med EA og Hex, som ga 2,52 g (94,5 % utbytte) av et beige fast stoff.

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1,57 (m, 4H), 3,14 (m, 2H), 3,54 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,79 (m, 5 H), 4,03 (t, J = 9,1, 1 H), 4,66 (m, 1 H), 4,78 (s, 1 H), 5,05 (s, 2 H), 5,16 (t, J = 5,6, 1 H), 7,18 (m, 2 H), 7,32 (m, 5 H), 7,55 (d, J = 12, 1 H).

MS (ESI): 475,0.

1.iii. (R)-3-[3-fluor-4-(4-hydroksy-piperidin-4-ylmetoksy)-fenyl]-5-hydroksymetyl-okszolidin-2-on:

En suspensjon av intermediat 1.ii (2,5 g) i EA/MeOH (1:1; 100 ml) ble hydrogenert over Pd/C i 48 h. Suspensjonen ble varmet ved 40 °C og katalysatoren ble filtrert fra. Filtratet ble inndampet under redusert trykk og ga 1,61 g (89 % utbytte) av et gult pulver.

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1,4-1,63 (m, 4H), 2,67 (m, 2H), 2,83 (m, 2H), 3,53 (dd, J = 4,0, 12,0, 1H); 3,66 (dd, J = 3,3, 12,0, 1H), 3,71 (s, 2H); 3,80 (m, 1H), 4,05 (t, J = 9,0, 1H), 4,48 (s, 1H), 4,68 (m, 1H), 5,20 (s, 1H), 7,20 (m, 2H), 7,57 (d, 1H).

MS (ESI): 341,5.

1.iv. 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksylysyre:

En løsning av intermediat 1.iii (200 mg), 7-klor-1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-okso-3-kinolinkarboksylysyre-bordiacetat-kompleks (241 mg; fremstilt i overensstemmelse med
 5 WO 88/07998) og DIPEA (100 µl) i NMP (2 ml) ble omrørt ved 85 °C i 5 h. Reaksjonsblandingen ble inndampet under redusert trykk og residuet ble tatt opp i 5 M HCl i MeOH (3 ml) og omrørt. Det resulterende faste stoffet ble samlet ved filtrering og vasket med MeOH for å gi 230 mg (67 % utbytte) av et gult fast stoff.

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1,66-1,35 (m, 4H), 1,75 (d, J = 12,8, 2H), 1,95 (m, 2H),
 10 3,33 (t bred, J = 11,0, 2H), 3,57 (m, 3H), 3,67 (dd, J = 12,3, 3,3, 1H), 3,83 (m, 2H), 3,92 (s, 2H), 4,06 (t, J = 9,0, 1H), 4,69 (m, 1H), 7,24 (m, 2H), 7,60 (m, 2H), 7,90 (d, J = 13,3, 1H), 8,66 (s, 1H).

MS (ESI): 585,9.

Eksempel 2: 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-[1,8]naftyridin-3-karboksylysyre:
 15

En løsning av 7-klor-1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-okso-1,8-naftyridin-3-karboksylysyre (166 mg; kommersiell) og intermediat 1.iii (200 mg) i NMP (5 ml) ble behandlet med TEA (0,32 ml) og TMSCl og varmet ved 85 °C i 5 h. Reaksjonsblandingen
 20 ble inndampet under redusert trykk og residuet ble tatt opp i 5 M HCl i MeOH (3 ml) og omrørt i 30 min. Løsningen ble inndampet under redusert trykk og residuet ble tatt opp i EA. Det resulterende faste stoff ble samlet ved filtrering og vasket med EA, som ga 271 mg (78 % utbytte) av et gult fast stoff.

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 0,89-1,27 (m, 4H); 1,78 (d, J = 12,8, 2H); 1,90-2,04 (m, 2H);
 25 3,53-3,88 (m, 6H); 3,88 (s, 2H), 4,06 (t, J = 9,0, 1H), 4,42 (d bred, J = 13,2, 2H), 4,44 (m, 1H); 7,11 (m, 2H); 7,55 (d, J = 14,5, 1H); 8,05 (d, J = 13,5, 1H); 8,60 (s, 1H).

MS (ESI): 586,8.

Eksempel 3: 1-cyklopropyl-6-fluor-7- $\{$ (*RS*)-3-[2-fluor-4-((*R*)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-3-hydroksy-pyrrolidin-1-yl $\}$ -4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksylysyre:

3.i. Diallyl-karbamidsyre-benzylester:

- 5 Benzoylchlorid (15,5 ml) ble tilsatt dråpevis over 30 min til en løsning av diallylamin (12,3 ml) og TEA (21 ml) i DCM (100 ml) ved 0 °C. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved rt i 16 h. Residuet oppnådd etter opparbeiding (DCM) ble renset ved kromatografi (Hex/EA 95:5) for å gi 20,71 g (88 % utbytte) av en fargeløs væske.
- ¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 3,83 (dt, J = 1 og J = 6, 4H); 5,05-5,18 (m, 6H); 5,70-5,86 (m, 10 2H); 7,27-7,48 (m, 5H).

3.ii. 2,5-dihydro-pyrrol-1-karboksylysyre-benzylester:

- Benzyliden-bis(tricykloheksylfosfin)diklorrutenium (5 g) ble satt til en løsning av intermediat 3.i (17,56 g) i DCM (1,5 l) ved rt under nitrogen. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 40 °C i 2 h og konsentrert *in vacuo*. Residuet ble renset ved FC (Hex/EA 15 90:10) for å gi 14,08 g (91 % utbytte) av en gul væske.
- ¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 4,05-4,16 (m, 4H); 5,08 (s, 2H); 5,81-5,92 (m, 2H); 7,27-7,41 (m, 5H).

3.iii. (RS)-3-hydroksy-pyrrolidin-1-karboksylysyre-benzylester:

- En 1 M løsning av boran i THF (9 ml) ble satt til en løsning av intermediat 3.ii (1,81 g) i 20 THF (25 ml) ved 0 °C under nitrogen. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved rt i 16 h og ble avkjølt til 0 °C. 20 % NaOH (1,8 ml) ble forsiktig tilsatt dråpevis etterfulgt av 35 % aq. hydrogenperoksid (1,2 ml). Blandingen ble omrørt ved 0 °C i 30 min og ved rt i 2 h. Et₂O og en aq. 40 % natriumbisulfittløsning ble tilsatt og reaksjonsblandingen omrørt kraftig i 15 min. Residuet oppnådd etter opparbeiding (Et₂O) ble renset ved FC (Hex/EA 5:5 til 3:7) 25 for å gi 1,01 g (51% utbytte) av en fargeløs olje.
- ¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1,67-1,82 (m, 1H); 1,82-1,96 (m, 1H); 3,16-3,25 (m, 1H); 3,28-3,44 (m, 3H); 4,20-4,29 (bred, 1H); 4,92 (d, J = 3, 1H); 5,06 (s, 2H); 7,27-7,41 (m, 5H).

3.iv. 3-okso-pyrrolidin-1-karboksytsyre-benzylester:

En løsning av intermediat 3.iii (1,10 g) i DCM (8 ml) ble avkjølt til 0 °C og DIPEA (2,5 ml) ble tilsatt dråpevis, etterfulgt av en løsning av svoveltrioksid-pyridin-kompleks (1,79 g) i DMSO (6,5 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 0 °C i 1 h og ble stanset ved tilsetning av vann (6 ml). Det aq. sjikt ble ekstrahert med Et₂O/Hex (1:1, 3 x 5 ml) og de kombinerte org. sjiktene ble konsentrert *in vacuo*. Residuet oppnådd etter opparbeiding (Et₂O/Hex 1:1) ble rensset ved FC (Hex/EA 5:5) for å gi 1,05 g (96 % utbytte) av en gulaktig olje.

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 2,48-2,61 (m, 2H); 3,61-3,80 (m, 4H); 5,09 (s, 2H); 7,27-7,41 (m, 5H).

3.v. 3-metylen-pyrrolidin-1-karboksytsyre-benzylester:

t-BuOK (617 mg) ble tilsatt i én porsjon til en hvit suspensjon av metyl-trifenylfosfonium-bromid (1,98 g) i THF (10 ml) ved rt under nitrogen. Den gule suspensjonen ble omrørt ved rt i 1 h og deretter avkjølt til -10 °C. En løsning av intermediat 3.iv (1,05 g) i THF (2 ml) ble tilsatt dråpevis over 10 min og reaksjonsblandingen ble tillatt å varme til rt over 2 h. Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av sat. aq. NH₄Cl (1 ml) og fortynnet med EA. Residuet oppnådd etter opparbeiding (EA) ble rensset ved kromatografi (Hex/EA 90:10) for å gi 633 mg (64 % utbytte) av en gulaktig væske.

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 2,48-2,61 (m, 2H); 3,36-3,53 (m, 2H); 3,84-4,01 (m, 2H); 4,97-5,03 (m, 2H); 5,08 (s, 2H); 7,27-7,41 (m, 5H).

3.vi. 1-oksa-5-aza-spiro[2,4]heptan-5-karboksytsyre-benzylester:

En løsning av intermediat 3.v (7,21 g) i DCM (400 ml) ble behandlet med MCPBA (20,1 g) og NaHCO₃ (22,3 g) ved rt. Reaksjonen ble omrørt ved rt i 2 h, fortynnet med DCM (200 ml) og helt i en løsning av Na₂SO₃ (45 g) i vann (400 ml). Blandingen ble omrørt i 10 min og det org. sjiktet ble separert. Residuet oppnådd etter opparbeiding (DCM) ble rensset ved FC (Hex/EA 6:4) for å gi 4,37 g (56 % utbytte) av en gul olje.

¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1,70-1,83 (m, 1H); 2,22-2,37 (m, 1H); 2,90-2,94 (m, 1H); 2,95-2,99 (m, 1H); 3,15 (t, J = 11, 1H); 3,39-3,77 (m, 3H); 5,09 (s, 2H); 7,27-7,41 (m, 5H).

3.vii. (RS)-3-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-3-hydroksy-pyrrolidin-1-karboksytsyre-benzylester:

K₂CO₃ (274 mg) ble satt til en suspensjon av intermediat 1.i (300 mg) og intermediat 3.vi (338 mg) i DMF (3 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 80 °C i 3 h og løsemidlet ble fjernet *in vacuo*. Residuet oppnådd etter opparbeiding (DCM) ble renset ved FC (DCM/MeOH 95:5) for å gi 531 mg (87 % utbytte) av et beige skum.

- 5 ¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1,80-1,92 (m, 1H); 1,96-2,08 (m, 1H); 3,32-3,59 (m, 5H); 3,66 (ddd, J = 3, J = 6 og J = 13, 1H); 3,80 (dd, J = 6 og J = 9, 1H); 3,97-4,09 (m, 3H); 4,64-4,72 (m, 1H); 5,07 (s, 2H); 5,19 (t, J = 6, 1H); 5,23 (s, 1H); 7,18-7,23 (m, 2H); 7,27-7,38 (m, 5H); 7,57 (dd, J = 2 og J = 14, 1H).
MS (ESI): 460,9.

- 10 3.viii. (R)-3-[3-fluor-4-((RS)-3-hydroksy-pyrrolidin-3-ylmetoksy)-fenyl]-5-hydroksymetyl-oksazolidin-2-on:

En løsning av intermediat 3.vii (259 mg) i THF/MeOH (1:1; 20 ml) ble hydrogenert over 10 % Pd/C (60 mg) i 20 h ved rt. Reaksjonsblandingen ble konsentrert *in vacuo*, tatt i DCM/MeOH 90:10 (20 ml) og omrørt ved rt i 30 min. Katalysatoren ble filtrert fra og
15 filtratet konsentrert *in vacuo* for å gi 184 mg (100 % utbytte) av et oransje skum.

MS (ESI): 327,3.

3.ix. 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{(RS)-3-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-3-hydroksy-pyrrolidin-1-yl}-4-okso-1,4 dihydro-kinolin-3-karboksytsyre:

- 20 En løsning av intermediat 3.viii (226 mg) og 7-klor-1-cyklopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-okso-3-kinolinkarboksytsyre-bordiacetat-kompleks (270 mg; fremstilt i overensstemmelse med WO 88/07998) i NMP (5 ml) ble behandlet med DIPEA (120 µl) og omrørt ved 60 °C i 2 h. Reaksjonsblandingen ble konsentrert *in vacuo* og residuet ble tatt i 5 M HCl i MeOH (2 ml). Løsningen ble omrørt ved rt i 1 h, konsentrert *in vacuo* og residuet ble renset ved
25 FC (DCM/MeOH/AcOH 95:4:1 til 90:9:1). Det skumaktige residuet ble tatt i MeOH (2 ml), omrørt i 1 h og filtrert. Krystallene ble samlet og tørket *in vacuo* for å gi 23 mg (6 % utbytte) av et beige fast stoff.

- ¹H NMR (DMSO_{d6}; δ ppm): 1,10-1,34 (m, 4H); 1,98-2,10 (m, 1H); 2,14-2,26 (m, 1H); 3,48-3,70 (m, 3H); 3,71-3,89 (m, 5H); 4,05 (t, J = 9, 1H); 4,09-4,18 (m, 2H); 4,66-4,74 (m,
30 1H); 5,19 (t, J = 6, 1H); 5,40 (s, 1H); 7,09 (d, J = 8, 1H); 7,18-7,31 (m, 2H); 7,59 (dd, J = 2 og J = 14, 1H); 7,82 (d, J = 14, 1H); 8,59 (s, 1H); 15,52 (s, 1H).

MS (ESI): 572,3.

Eksempel 4: antibakteriell *in vitro*-aktivitet av oppfinnelsens forbindelser mot referansestammer av *Clostridium difficile* eller *Clostridium perfringens*:

4.i. Eksperimentell metode:

- 5 Minimum hemmende konsentrasjoner (MICer) ble bestemt med et buljong mikrofortynningsassay. Brucella-buljong supplert med en sluttkonsentrasjon på 0,5 mg/l av vitamin K₁ og 5 mg/l hemin ble anvendt som testmediet. Kort fortalt ble bruksløsninger av forbindelsene fremstilt i DMSO (5,12 mg/ml), og 5 µl av en rekke dobbelte serielle fortynninger i 50 % DMSO/50 % H₂O ble dispensert i 96-brønns mikrotiterplater
- 10 inneholdende 45 µl supplert Brucella-buljong og ristet i 5 min. For å fremstille inokulaen ble 24 h gamle kolonier av *C. difficile* dyrket på Brucella-agar supplert med 5 % «laked» saueblod, 5 µg hemin/ml og 1 µg vitamin K₁/ml suspendert i supplert Brucella-buljong og justert til en tetthet som passer til 0.5 McFarland standard. 50 µl av en 50-gangers fortynning av denne suspensjonen ble brukt for å inokulere brønnene i 96-brønns platen
- 15 som resulterte i ca. 10⁴ kolonidannende enheter (CFU) per brønn. Den endelige DMSO-konsentrasjonen var 2,5 %. Sluttkonsentrasjonsområdet var 0,03 – 16 µg /ml. Platene ble inkubert under anaerobe betingelser i 48 h ved 37 °C. Etter inkubasjon ble platene avlest i en plateleser ved OD₅₉₅ (Ultramark, Biorad Laboratories). MICene ble i begynnelsen lest ved den laveste konsentrasjonen som viser >90 % veksthemning sammenlignet med
- 20 kontrollbrønner. Platene ble også sjekket visuelt ved hjelp av et avlesningsspeil, og MICer ble bekreftet ved fraværet av synlig vekst.

4.ii. Resultater:

- Forbindelsene fra eksempel 1-3 ble testet *in vitro* for sin aktivitet til å hemme vekst av tre referansestammer av *C. difficile* eller *Clostridium perfringens*. De oppnådde resultatene er
- 25 oppsummert i tabell 1 nedenfor.

Forbindelse testet	MIC som gjelder <i>C. difficile</i> ATCC 43596 (µg/ml)	MIC som gjelder <i>C. difficile</i> ATCC 9689 (µg/ml)	MIC som gjelder <i>C. difficile</i> NC 13366 (µg/ml)	MIC som gjelder <i>C. perfringens</i> DSM 756 (µg/ml)
Ciprofloksacin	8	8	> 16	0,25

Forbindelse testet	MIC som gjelder <i>C. difficile</i> ATCC 43596 (µg/ml)	MIC som gjelder <i>C. difficile</i> ATCC 9689 (µg/ml)	MIC som gjelder <i>C. difficile</i> NC 13366 (µg/ml)	MIC som gjelder <i>C. perfringens</i> DSM 756 (µg/ml)
Linezolid	8	2	1	4
Eksempel 1	0,125	0,125	0,06	≤ 0,03
Eksempel 2	0,06	0,125	0,03	≤ 0,03
Eksempel 3	0,25	0,5	0,25	0,125

Tabell 1

Forbindelsene fra eksempel 1-3 viste potent *in vitro*-aktivitet mot stammene av *C. difficile* og *C. perfringens* testet. Sterk aktivitet ble også observert mot den kinolon-resistente hypervirulente stammen NC13366. Forbindelsene fra eksempel 1 og 2 var litt mer aktive enn forbindelsen fra eksempel 3 og all eksempelforbindelsene var klart mer aktive enn ciprofloksacin og linezolid.

Eksempel 5: antibakteriell *in vitro*-aktivitet av forbindelsen fra eksempel 1 mot en samling av kliniske isolater av *Clostridium difficile*:

5.i. Eksperimentell metode:

Den CLSI-anbefalte referanseagarfortynningsmetoden for anaerobe (M11-A6) ble brukt for susceptibilitetstesting. Brucella-agar supplert med 5 % “laked” saueblod, 5 µg hemin/ml og 1 µg vitamin K₁/ml var testmediet. Testforbindelsene ble serielt fortynnet og satt til den smeltede supplerte agaren. Vekstkontroller ble gjort på medikamentfrie plater. Før testing ble alle isolater subkultivert to ganger på berikede brucella-agarplater. Bakteriekolonier ble suspendert i brucella-buljong. Standardisering med et Vitek kolorimeter ble brukt for å fremstille hvert inoculum til ekvivalenten av en 0.5 McFarland-standard, som nærmer seg 10⁴-10⁵ CFU per flekk etter applikasjon med en Steers-replikator. Platene ble inkubert under anaerobe betingelser i 48 h ved 37 °C. Den minimum hemmende konsentrasjonen (MIC) var konsentrasjonen som fullstendig hemmet synlig vekst sammenlignet med den medikamentfrie kontrollen. Alle antibiotika ble fremstilt og testet sammen med vankomycin og metronidazol som kontroller.

5.ii. Resultater:

Forbindelsen fra eksempel 1 ble testet for sin aktivitet til å hemme vekst av en samling av 209 forskjellige kliniske isolater av *C. difficile in vitro*. Forbindelsen fra eksempel 1 viste en MIC₉₀ (minimum hemmende konsentrasjon til å hemme veksten av 90 % av stammene eller mer) på 0,25 µg/ml, MICene oppnådd strakk seg fra 0,06 til 0,5 µg/ml. Den var i
 5 gjennomsnitt mer aktiv enn vankomycin, metronidazol og linezolid, som hadde MIC₉₀er på henholdsvis 2, 1 og 8 µg/ml.

Eksempel 6: antibakteriell *in vitro*-aktivitet av oppfinnelsens forbindelser mot aerobe Gram-positive bakterier:

6.i. Eksperimentell metode:

10 Minimum hemmende konsentrasjoner (MICer) ble bestemt med et buljong mikrofortynningsassay ved å følge rettingslinjene til Clinical Laboratory Standards Institute [CLSI, formerly NCCLS, 1997]. Kort fortalt ble bruksløsninger av forbindelsene fremstilt i DMSO (5,12 mg/ml), serielt fortynnet i kation-justert Mueller-Hinton Buljong II (CaMHB), og dispensert i mikrotiterplater ved hjelp av en Biomek 2000 pipeterende robot
 15 (Beckman Coulter). Den endelige DMSO-konsentrasjonen var 2,5 % eller lavere. Plater ble inokulert for å oppnå en konsentrasjon på generelt $3-6 \times 10^5$ CFU/ml. Etter inkubering ved 37 °C i 18-24 h ble platen avlest i en plateavleser ved OD₅₉₅ (Ultramark, Biorad Laboratories). MICene ble i begynnelsen avlest ved den laveste konsentrasjonen som viste >90 % veksthemming sammenlignet med kontrollbrønner. Plater ble også sjekket visuelt
 20 ved hjelp av et avlesningsspeil, og MICene ble bekreftet ved fraværet av synlig vekst.

6.ii. Resultater:

Forbindelsen fra eksempel 1 ble testet mot Gram-positive aerobe bakterier. De oppnådde resultatene er oppsummert i tabell 2 nedenfor.

Stamme	MIC målt for vankomycin (µg/ml)	MIC målt for ciprofloksacin (µg/ml)	MIC målt for linezolid (µg/ml)	MIC målt for forbindelsen fra eksempel 1 (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1	0,25	2	0,25
<i>S. aureus</i> A-798 (MRSA)	1	> 16	2	0,25
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	1	0,25	2	0,25
<i>S. aureus</i> S1 (LZD-R)	1	0,25	> 32	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1	2	2	0,25
<i>E. faecalis</i> H 4060	> 32	> 16	2	0,25
<i>E. faecalis</i> H 6279	> 32	> 16	2	0,25
<i>E. faecalis</i> H 6897	> 32	> 16	4	1
<i>E. faecalis</i> H 7094	> 32	> 16	4	0,5
<i>E. faecalis</i> H 7460	> 32	> 16	16	1
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	1	8	2	0,25
<i>E. faecium</i> H 9070	> 32	> 16	2	1
<i>E. faecium</i> H 7969	> 32	> 16	4	1
<i>E. faecium</i> H 7966	> 32	> 16	1	0,5
<i>E. faecium</i> H 7965	> 32	> 16	2	0,5
<i>E. faecium</i> H 7937	> 32	> 16	1	0,25
<i>E. faecium</i> A 962	> 32	> 16	4	0,5
<i>E. faecium</i> A 949	> 32	> 16	2	1
<i>E. faecium</i> L1 (LZD-R)	0,5	> 16	> 32	2

Tabell 2

I korthet hadde forbindelsen fra eksempel 1 potent *in vitro*-aktivitet mot stammer av *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* MRSA, *Enterococcus faecalis* og *Enterococcus faecium*. Den var aktiv mot stammer resistente for vankomycin, ciprofloksacin eller linezolid.

Eksempel 7: antibakteriell *in vitro*-aktivitet av forbindelsen fra eksempel 1 mot spesielle anaerobe bakteriestammer:

Ved å anvende den eksperimentelle metoden beskrevet i eksempel 5 (se 5.i) ble forbindelsen fra eksempel 1 (Eks. 1) testet *in vitro* for evnen til å hemme veksten av visse anaerobe bakterier som er kjent eller mistenkt å spille en rolle i den normale tarmflora og i opprettholdelsen av dens rolle i beskyttelse mot *C. difficile* overvekst (i det følgende samlet kalt “de kommensale tarmbakterier”). Som referanser ble forbindelsen fra eksempel 5 i WO 2005/058888 (R1) og ciprofloksacin (CP) testet samtidig. De således oppnådde MICene er vist i tabell 3 nedenfor.

Stammer	MIC [$\mu\text{g/ml}$]		
	R1	Eks. 1	CP
<i>Clostridium difficile</i> A-1179 NC 13366	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	> 32
<i>Fusobacterium necrophorum</i> A-1260 DSM 20698	1	1	4
<i>Bacteroides ovatus</i> A-991 ATCC 8483	8	16	16
<i>Bacteroides fragilis</i> A-992 ATCC 25285	2	8	8
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> A-990 ATCC 29741	4	8	16
<i>Bacteroides vulgatus</i> A-989 ATCC 8482	1	2	32
<i>Bacteroides fragilis</i> A-502 T 7403	2	4	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-348 T 8673	1	2	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-217 B 6306	2	4	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-501 B 8039	4	4	32
<i>Bacteroides fragilis</i> A-294 T 9174	2	4	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-293 B 2518	2	4	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-260 T 9865	1	4	8
<i>Eubacterium limosum</i> A-1259 DSM 20698	0,125	1	2

Strains		MIC [$\mu\text{g/ml}$]		
		R1	Ex. 1	CP
<i>Finegoldia magna</i> A-1254	DSM 20470	$\leq 0,06$	0,25	2
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> A-1257	DSM 20083	$\leq 0,06$	0,5	2
<i>Bifidobacterium bifidum</i> A-1258	DSM 20456	0,125	0,5	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> A-1255	DSM 20079	$\leq 0,06$	0,5	32
<i>Lactococcus lactis</i> A-1256	DSM 20069	$\leq 0,06$	0,5	1

Tabell 3 (fortsatt)

I korthet viste forbindelsen fra eksempel 1 redusert aktivitet med hensyn til de kommensale tarmbakteriene sammenlignet med *C. difficile*. For *Bacteroides* spp., som er viktige medlemmer i den menneskelige beskyttende tarmfloraen, aktiviteten er 30 til 200 ganger lavere. Denne selektive aktiviteten gir potensial for selektiv dreping av *C. difficile* i tarmen mens viktige bakterier i tarmfloraen spares.

I tillegg viste, når sammenlignet med forbindelsen i eksempel 5 i WO 2005/058888, forbindelsen fra eksempel 1 i de fleste tilfeller 2 til 4 ganger mindre aktivitet mot den testede *Bacteroides* spp., 4 ganger mindre aktivitet mot *Eubacterium limosum* A-1259- eller *Finegoldia magna* A-1254-stammene, 4 til 8 ganger mindre aktivitet mot den testede *Bifidobacterium* spp. og 8 ganger mindre aktivitet mot *Lactobacillus acidophilus* A-1255- og *Lactococcus lactis* A-1256-stammene.

Derfor, når sammenlignet med forbindelsen i eksempel 5 i WO 2005/058888 (R1), var forbindelsen fra eksempel 1 signifikant mindre aktiv mot de kommensale tarmbakteriene, som indikerer en fordel for selektiv dreping av *C. difficile* i tarmen.

Eksempel 8: effekt av forbindelsen fra eksempel 1 på *C. difficile* toksinproduksjon:

8.i. Eksperimentell metode:

Hypertoksigen *C. difficile* stamme NC13366 ble dyrket anaerobt i supplert Brucella-buljong i 24 h ved 37 °C til en celletetthet på omtrent 1×10^8 CFU/ml. Bakterier ble vasket

ved sentrifugering og resuspendert i det samme volumet med supplert Brucella-buljong inneholdende antibiotika ved henholdsvis 1 og 8 µg/ml. Kontrollen inneholdt intet antibiotikum. Kulturene ble ytterligere inkubert anaerobt ved 37 °C. På dag 5 ble kultur-supernatanter samlet og analysert for toksin A og toksin B som beskrevet nedenfor.

- 5 Toksin A ble detektert ved Western Blotting ved å anvende NuPage Large Protein Analysis System (Invitrogen LP0001, i overensstemmelse med kit-instruksjoner). Western Breeze anti Mouse Immunodetection kit (Invitrogen WB7103) med anti-CdTA mus monoklonale antistoffer (PCG4.1, Biodesign C70517M) ble anvendt.

- 10 *C. difficile* cytotoksisk toksin (toksin B) ble semikvantitativt detektert ved testing av supernatanter av *C. difficile*-kulturer for cellekrumningsaktivitet i CHO-celler. CHO-celler ble sådd i 96-brønns flatbunnede plater (1x10⁵ celler/brønn) og tillatt å feste seg i 3 h. Passende fortynninger av filtersteriliserte supernatanter ble satt til cellene og ytterligere inkubert ved 37 °C, i 5 % CO₂. Etter 20 h med inkubasjon ble cellekrumning bestemt ved å anvende et invertert mikroskop. Toksin-titeren ble definert som den høyeste serielle 10-
15 ganger fortynning av supernatanten som resulterte i >90 % cellekrumning.

Kolonidannende enheter (CFU) ble bestemt ved å plettere passende fortynninger av testprøver på supplert Brucella-agar og kolonitelling etter 48 h inkubasjon ved 37 °C under anaerobe betingelser.

8.ii. Resultater:

- 20 Utseendet til en Western Blot-plate for å analysere toksin A-produksjon i supernatanter med statisk høy tetthet cellekulturer av *C. difficile* NC 13366 (en toksin-hyperproduserende NAPI/027-type stamme som forårsaket utbrudd på sykehus med høy mortalitet) er vist i figur 1.

- 25 Den eksperimentelle metoden nevnt i avsnitt 8.i ble brukt for å oppnå resultatet vist i figur 1. På dag 1 (D1) ble kulturer behandlet med enten forbindelsen fra eksempel 1 (Eks. 1), vankomycin (V), metronidazol (M) ved 1 og 8 µg/ml eller etterlatt ubehandlet (U); på dag 5 (D5) ble innholdet av toksin A i supernatantene analysert og sammenlignet med de observert på D1 (se figur 1). I høy tetthet fem dager gamle stasjonærfasekulturer av toksigene *C. difficile* hemmet forbindelsen fra eksempel 1 *de novo* toksin A-produksjon
30 ved konsentrasjoner på 1 og 8 µg/ml, dvs. ved 2 og 16x MIC (se figur 1). Derimot hemmet

ikke metronidazol og vankomycin toksin A-produksjon under disse betingelsene eller gjorde det bare svakt.

5 Dyrkningssupernatanter ble også analysert for det cytotoksiske toksin B ved å anvende det cellebaserte cellekrumningsassay nevnt i avsnitt 8.i. Aktiviteter i supernatantene fra kulturer behandlet med forbindelsen fra eksempel 1 ble redusert til >90 % sammenlignet med den ubehandlede kontrollen. Derimot ble ikke aktiviteter i supernatanter fra vankomycin-behandlede kulturer redusert (ved 1 µg/ml) eller redusert med kun 30 % (ved 8 µg/ml).

10 I korthet har forbindelsen fra eksempel 1 evnen til å effektivt stanse syntesen av *C. difficile* toksiner A og B selv i høy tetthet statiske kulturer og i fravær av dreping, som ikke er tilfellet for vankomycin og metronidazol, de foretrukne medikamentene som for tiden brukes for behandling av *C.difficile*-infeksjoner.

Eksempel 9: effekt av forbindelsen fra eksempel 1 på *C. difficile* sporedannelse:

9.i. Eksperimentell metode:

15 *C. difficile* A-1050 (ATCC 43596) ble dyrket til logaritmisk vekst i supplert Brucella-buljong som resulterte i turbiditet som passer til McFarland 0.5 standard (6-7 h ved 37 °C under anaerobe betingelser). Kulturer ble fortynnet 1:50 i rør inneholdende 1 ml supplert Brucella-buljong inneholdende antibiotikaene ved forskjellige konsentrasjoner i 2-gangers fortynningstrinn. Rørene ble ytterligere inkubert i 4 dager ved 37 °C under anaerobe
20 betingelser. MIC ble definert som konsentrasjonen som hemmer synlig vekst (turbiditet) fullstendig. 0,5x MIC var den høyeste konsentrasjonen av medikament som tillot synlig vekst.

Vurdering av kolonidannende enheter (CFUer) av totale celler ble utført ved å pletterte passende 10-ganger fortynninger av kulturene på Braziers agar inneholdende 4 %
25 eggeplommensuspensjon og 1 % lysert hesteblood (Lab M). Kolonier ble talt etter inkubasjon ved 37 °C i 48 h under anaerobe betingelser. Sporetellinger ble gjort ved selektiv dreping av vegetative celler ved behandling med 50 % etanol i 1 h ved rt og etterfølgende CFU-telling på Braziers agar som spesifisert over.

9.ii. Resultater:

C. difficile er en sporedannende organisme og sporer kan vedbli i lang tid i sykehusmiljø. Spor er svært resistente mot vanlige desinfeksjonsprosedyrer. Derfor spiller sporer en viktig rolle i spredningen og vedvarenheten til *C. difficile*-infeksjoner. Groende *in vitro*-kulturer av *C. difficile* ble behandlet med forskjellige sub-MIC konsentrasjoner av forbindelsen fra eksempel 1, vankomycin eller metronidazol og undersøkt for virkningen på produksjonen av sporer etter 4 dager med anaerob inkubasjon ved 37 °C (se avsnitt 9.i). Ved en konsentrasjon som representerer 0,5x MIC resulterte behandling med forbindelse fra eksempel 1 i lave sporetellinger (<1 % sporer av total celletelling). Derimot viste ubehandlede kulturer og kulturer behandlet med metronidazol eller vankomycin ved konsentrasjoner på 0,5x MIC høye sporedannelsesrater (>90 % sporer av totale celletellinger). Dette indikerer at forbindelsen fra eksempel 1 har potensiale til å redusere produksjonen av sporer under behandling av *C. difficile*-infeksjon mer effektivt enn vankomycin eller metronidazol.

Eksempel 10: *in vivo*-aktivitet av en forbindelse ifølge oppfinnelse i *C. difficile*-hamstermodell:

10.i. Eksperimentell metode:

Golden Syrian-hamstere ble gitt en enkelt injeksjon av clindamycin-fosfat (10 mg/kg s.c.), og en dag senere ble dyr smittet med magesonde med 10⁵ CFU av toksigen *C difficile*-stamme 10465. Dette resulterte i en fulminant kolitt i størstedelen (~95 %) av dyrene og utviklet seg 1 til 2 dager etter administrasjonen av *C. difficile*. Ubehandlet utvikler kolitten seg raskt og blir til alvorlig kolitt, hemoragisk nekrose av cökum og død. Forbindelsen fra eksempel 1 ble administrert oralt som en suspensjon ved tre doseringsnivåer (10 mg/kg, 30 mg/kg og 100 mg/kg; n = 10 per gruppe). Vankomycin (50 mg/kg) ble brukt som en kontroll. Dyr ble behandlet en gang daglig i 5 dager og etterpå holdt under observasjon i ytterligere 21 dager.

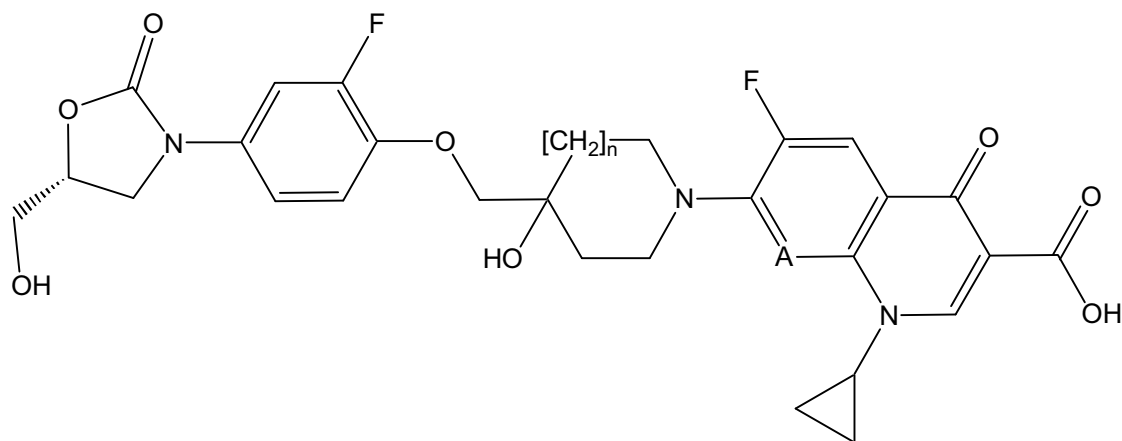
Dyrene ble observert tre ganger daglig for morbiditet og nærvær eller fravær av diaré. Det endelige slutt punkt i studien var overlevelse. Dyr vurdert å være i en døende tilstand [langvarig periode med vekttap som utvikler seg til en avmagret tilstand, anoreksi i 24-48 h, langvarig letargi (mer enn 3 dager), tegn på paralyse, skinnerosjoner eller traume, krummet kroppsholdning, oppblåst mage] ble avlivet med en enkelt injeksjon av natriumpentobarbital.

10.ii. Resultater:

Den terapeutiske anvendbarheten av forbindelsen fra eksempel 1 ble testet ved å anvende protokollen i avsnitt 10.i. Alle de smittede, ubehandlede dyrene døde mellom 2 og 5 dager etter smitte mens alle dyrene behandlet med 10, 30 eller 100 mg/kg av forbindelsen fra eksempel 1 overlevde under behandlingsperioden på 5 dager. På det laveste dosenivået overlevde 40 % av dyrene tilbakefallsfasen på 21 dager etter behandling, mens i 30 og 100 mg/kg gruppene overlevde 80 og 100 % av dyrene uten tilbakefall. Vankomycin med en 50 mg dose ble brukt som en kontroll. Disse resultatene demonstrerer at forbindelsen fra eksempel 1 har kapasitet til å behandle dyr med *C. difficile*-infeksjoner som kan sammenlignes med vankomycin.

Patentkrav

1. Forbindelse med formel I



I

hvor

A er N eller CH; og

n er 0 eller 1;

- 5 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse i forebygging eller behandling av intestinale sykdommer som forårsakes av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus*.

2. Forbindelse med formel I som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelsen nevnt i krav 1 hvor A er CH.

- 10 3. Forbindelse med formel I som definert i krav 1 eller 2, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelsen nevnt i krav 1 hvor n er 1.

4. Forbindelse med formel I som definert i krav 1, som er valgt fra:

- 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksylysyre;
- 15 - 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-[1,8]naftyridin-3-karboksylysyre; og

- 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{3-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-3-hydroksy-pyrrolidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksylysyre;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, for anvendelse i forebygging eller behandling av intestinale sykdommer som forårsakes av bakterier valgt fra

5 *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus*.

5. Forbindelse med formel I som definert i krav 1 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, som er 1-cyklopropyl-6-fluor-7-{4-[2-fluor-4-((R)-5-hydroksymetyl-2-okso-oksazolidin-3-yl)-fenoksymetyl]-4-hydroksy-piperidin-1-yl}-4-okso-1,4-dihydro-kinolin-3-karboksylysyre eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse i forebygging

10 eller behandling av intestinale sykdommer som forårsakes av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus*.

6. Forbindelse med formel I som definert i ett av kravene 1 til 5, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse i forebygging eller behandling av de intestinale sykdommene som forårsakes av *Clostridium difficile*.

15 7. Forbindelse med formel I som definert i ett av kravene 1 til 5, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse i forebygging eller behandling av de intestinale sykdommene som forårsakes av en toksinproduserende stamme av *Clostridium difficile*.

8. Forbindelse med formel I som definert i ett av kravene 1 til 5, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse i forebygging eller behandling av diareesykdommer
20 assosiert med enterotoksogene stammer av *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus* uten å øke konsentrasjonen av vankomycin-resistent enterococci i tarmen.

9. Forbindelse med formel I som definert i ett av kravene 1 til 5, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse i forebygging eller behandling av diareesykdommer
25 assosiert med enterotoksogene stammer av *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* eller *Staphylococcus aureus* og som reduserer konsentrasjonen av vankomycin-resistent enterococci i tarmen.

10. Anvendelse av en forbindelse med formel I som definert i ett av kravene 1 til 5, eller av et farmasøytisk akseptabelt salt av en slik forbindelse, for fremstillingen av et medikament

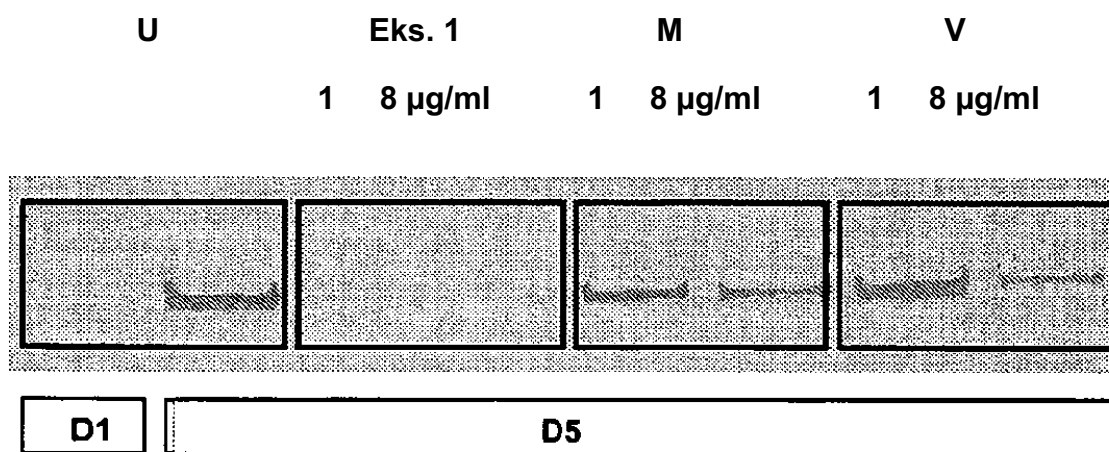
tiltenkt å forebygge eller behandle en intestinal sykdom som er forårsaket av bakterier valgt fra *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* og *Staphylococcus aureus*.

11. Anvendelse ifølge krav 10, hvori det fremstilte medikamentet er tiltenkt å behandle den intestinale sykdommen.

5 **12.** Anvendelse ifølge krav 10, hvori det fremstilte medikamentet er tiltenkt å forebygge den intestinale sykdommen.

13. Anvendelse ifølge krav 10, hvori det fremstilte medikamentet også er tiltenkt å ikke øke konsentrasjonen av vankomycin-resistent enterococci i tarmen.

10 **14.** Anvendelse ifølge krav 10, hvori det fremstilte medikamentet også er tiltenkt å redusere konsentrasjonen av vankomycin-resistent enterococci i tarmen.



Figur 1