

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 719**

51 Int. Cl.:

A61K 31/443	(2006.01)	A61K 31/165	(2006.01)
C07D 317/50	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)
C07D 405/12	(2006.01)		
C07C 235/34	(2006.01)		
C07D 491/056	(2006.01)		
A61K 31/381	(2006.01)		
A61K 31/36	(2006.01)		
A61K 31/4355	(2006.01)		
A61K 31/53	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2012 PCT/US2012/046676**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13010082**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12812134 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2731608**

54 Título: **Inhibidores del sistema de secreción de tipo III bacteriano**

30 Prioridad:

13.07.2011 US 201161507259 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.06.2018

73 Titular/es:

**MICROBIOTIX, INC. (100.0%)
One Innovation Drive
Worcester, MA 01605, US**

72 Inventor/es:

**MOIR, DONALD, T.;
AIELLO, DANIEL;
PEET, NORTON, P.;
WILLIAMS, JOHN, D. y
TORHAN, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 672 719 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores del sistema de secreción de tipo III bacteriano

5 Campo de la invención

La presente invención se encuentra comprendida en el campo de los fármacos terapéuticos para el tratamiento de infecciones y enfermedades bacterianas. En particular, la invención proporciona compuestos orgánicos que inhiben el sistema de secreción de tipo III de una o más especies bacterianas.

10

Antecedentes de la invención

El sistema de secreción de tipo III bacteriano (T3SS) es un complejo aparato multiproteico que facilita la secreción y traslocación de proteínas efectoras desde el citoplasma bacteriano directamente al citosol de la célula de mamífero. Este complejo sistema de transporte de proteínas es compartido por más de 15 especies de patógenos humanos Gram-negativos, entre ellos *Salmonella* spp., *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia* spp., *Escherichia coli* enteropatógena y enteroinvasiva y *Chlamydia* spp. (Hueck, 1998, Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:379-433; Keyser et al., 2008, Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria, J. Intern. Med. 264:17-29).

20

En el patógeno oportunista *P. aeruginosa*, T3SS es el factor de virulencia principal que contribuye al establecimiento y diseminación de las infecciones agudas (Hauser, The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection, Nat. Rev. Microbiol. 7:654-65, 2009). Se han identificado cuatro efectores del T3SS en cepas de *P. aeruginosa*: ExoS, ExoT, ExoY y ExoU. ExoS y ExoT son proteínas bifuncionales que consisten en un pequeño dominio de proteína activadora N-terminal de proteína G (GAP) y un dominio C-terminal de ribosilación de ADP; ExoY es una adenilato ciclasa y ExoU es una fosfolipasa (ver revisión en: Engel y Balachandran, Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease, Curr. Opin. Microbiol. 12:61-6, 2009).

25

En estudios con cepas productoras de cada efector por separado, ExoU y ExoS han contribuido significativamente a la persistencia, diseminación y mortalidad, mientras que ExoT ha producido efectos menores sobre la virulencia en un modelo de infección pulmonar en el ratón, y ExoY aparentemente no desempeñaba ningún papel importante en la patogénesis de *P. aeruginosa* (Shaver y Hauser, Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung, Infect. Immun. 72:6969-77, 2004). Aunque no es una toxina efectora prototípica, la flagelina (FlhC) también puede inyectarse en el citoplasma de las células huésped desde *P. aeruginosa* mediante la maquinaria de T3SS, en donde desencadena la activación del sistema inmunológico innato mediante el inflammasoma receptor de tipo NOD NLRC4. (Franchi, et al., The inflammasome: caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis, Nat. Immunol., 10:241-7, 2009; Miao, et al., *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:2562-7, 2008).

35

La presencia de un T3SS funcional se encuentra significativamente asociado a resultados clínicos pobres y a muerte en pacientes con infecciones de las vías respiratorias bajas y sistémicas causadas por *P. aeruginosa* (Roy-Burman, et al., Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections, J. Infect. Dis. 183:1767-74, 2001). Además, T3SS reduce la supervivencia en modelos de infección animal por *P. aeruginosa* (Schulert, et al., Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia, J. Infect. Dis., 188:1695-706, 2003) y resulta necesario para la diseminación sistémica de *P. aeruginosa* en un modelo de infección murina de neumonía aguda (Vance et al., Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo, Infect. Immun. 73:1706-13, 2005). Aparentemente T3SS contribuye al desarrollo de neumonía severa al inhibir la capacidad del huésped de contener y eliminar la infección bacteriana del pulmón. La secreción de toxinas T3SS, en particular ExoU, bloquea la eliminación mediada por fagocitos en el sitio de infección y facilita el establecimiento de una infección (Díaz et al., *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia, Infect. Immun. 76:4414-21, 2008). El resultado es una disrupción local de un componente esencial de la respuesta inmunológica innata, que crea un ambiente de inmunosupresión en el pulmón. Lo anterior no sólo permite a *P. aeruginosa* persistir en los pulmones sino que también facilita la sobreinfección con otras especies de bacteria.

55

Aunque varios agentes antibacterianos resultan eficaces contra *P. aeruginosa*, las elevadas tasas de mortalidad y recaída asociada a las infecciones por *P. aeruginosa* graves, incluso en pacientes con neumonía adquirida en el hospital (NAH) que reciben antibióticos activos contra la cepa causativa, reflejan la creciente incidencia de cepas resistentes a fármaco y subraya la necesidad de nuevos agentes terapéuticos (ver, por ejemplo, El Solh et al., Clinical and hemostatic responses to treatment in ventilator-associated pneumonia: role of bacterial pathogens, Crit. Care Med., 35:490-6, 2007; Rello et al., 1998, Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in ventilated patients: relapse or reinfection?, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:912-6, 1998 y Silver et al., Recurrent *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in an intensive care unit, Chest 101:194-8, 1992). Los antibióticos bacteriostáticos y bactericidas convencionales aparentemente resultan insuficientes para combatir adecuadamente dichas infecciones y los nuevos enfoques de tratamiento, tales como los inhibidores de los determinantes de la virulencia de *P.*

60

65

aeruginosa, podrían demostrar utilidad como terapias complementarias (Veesenmeyer, et al., *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies, Crit. Care Med. 37:1777-86, 2009).

El potencial del sistema de secreción de tipo III como diana terapéutica ha animado a varios grupos a realizar un cribado para inhibidores de T3SS en diversas especies bacterianas, entre ellas *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *E. coli* (Revisión en Keyser et al., Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria, J. Intern. Med. 264:17-29, 2008 y Clatworthy et al., Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy, Nat. Chem. Biol. 3:541-8, 2007). Los elevados niveles de conservación de la secuencia en diversas proteínas comprendidas en el aparato de T3SS sugieren que los inhibidores de T3SS en una especie también puede ser activos en especies relacionadas. Se ha demostrado una actividad de amplio espectro de los inhibidores de T3SS en un cribado para *Yersinia* en *Salmonella*, *Shigella* y *Chlamydia* (Hudson, et al., Inhibition of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by small-molecule inhibitors, Antimicrob. Agents Chemother., 51:2631-5, 2007; Veenendaal, et al., Small molecule type III secretion system inhibitors block assembly of the Shigella type III secretion, J. Bacteriol., 191:563-70, 2009; Wolf et al., Treatment of *Chlamydia trachomatis* with a small molecule inhibitor of the Yersinia type III secretion system disrupts progression of the chlamydial developmental cycle, Mol. Microbiol. 61:1543-55, 2006).

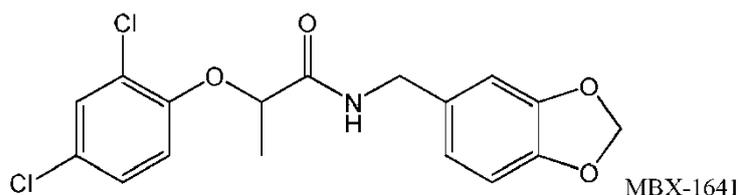
Se ha informado del cribado para inhibidores de T3SS de *P. aeruginosa*, que ha conducido a varios inhibidores selectivos de secreción mediada por T3SS de *P. aeruginosa*, uno de los cuales inhibe reproduciblemente tanto la secreción como la traslocación mediada por T3SS (Aiello, et al., Discovery and Characterization of Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion, Antimicrob. Agents Chemother., 54(5):1988-1999, 2010). El documento nº WO 2010/118046 da a conocer varios compuestos inhibidores bacterianos específicos del sistema de secreción de tipo III (T3SS), entre ellos la N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-2-(2,4-diclorofenoxi)propanamida. Yang, H-Z. et al., Pesticide Biochemistry and Physiology 29, páginas 217 a 232, 1987, da a conocer actividad insecticida de una serie de m-fenobencil ésteres de ácidos isovalérico y terc-butilacético, la posición alfa de los cuales se ha sustituido con uno de entre los grupos alquilo, alcoxilalquilo, alcoxi, bencilo, fenilo, fenoxi y anilino, medida mediante inyección en cucarachas americanas. Yang X et al., Chemistry - A European Journal (26 de septiembre de 2011) 17:11296-11304, da a conocer un método para la resolución cinética no enzimática catalítica de ácidos alcanoicos sustituidos en posición alfa. McKerrow J. D. et al., Synthetic Communications 40:1161-1179, 2010, da a conocer la utilización de bromuro de difenilyodonio en la síntesis de algunos N-fenil alfa-aminoácidos. Kobayashi T. et al., Pesticide Biochemistry and Physiology, páginas 29 a 40, 1991, da a conocer un estudio de la relación entre la estructura y la actividad insecticida contra cucarachas americanas de 80 piretroides de tipo éster de meta-fenoxibencilo.

Claramente sigue existiendo una necesidad de inhibidores potentes de T3SS bacteriana, de *P. aeruginosa* y de otras especies bacterianas.

Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona nuevos agentes antibacterianos/antivirulencia activos contra las actuales cepas resistentes a fármaco de *P. aeruginosa* y algunos otros patógenos Gram-negativos. Los compuestos de la invención muestran un nivel de potencia que comparado con los compuestos inhibidores de T3SS anteriormente publicados, los convierte en adiciones prometedoras a la creciente familia de agentes antibacterianos.

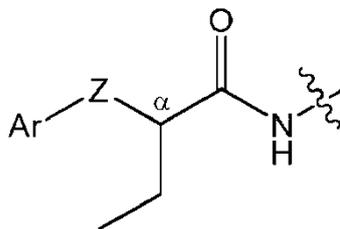
La presente invención proporciona nuevos compuestos inhibidores del sistema de secreción de tipo III bacteriano (T3SS). Los compuestos inhibidores de T3SS descritos en la presente memoria fueron identificados mediante un programa para realizar modificaciones estructurales en un andamiaje fenoxiacetamida y seguidamente para someter a ensayos los nuevos análogos utilizando ensayos celulares de secreción, traslocación y citotoxicidad. Tal como se informa en Aiello et al., 2010, op. cit, los estudios de la relación de estructura/actividad (SAR, por sus siglas en inglés) basados en el compuesto denominado MBX-1641, es decir, N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-2-(2,4-diclorofenoxi)propanamida, que presenta la fórmula



han conducido a la síntesis de análogos de inhibidor de T3SS adicionales pero ninguno que haya conducido a la optimización de la potencia y selectividad en el bloqueo de tanto la secreción como la traslocación mediada por T3SS de efectores de *P. aeruginosa* o a una reducción significativa de la citotoxicidad.

La presente invención es el resultado de un estudio SAR adicional del andamiaje fenoxiacetamida. Los resultados proporcionan incrementos significativos de la potencia (3 a 4 veces), proporcionan reducciones de la citotoxicidad (>3 veces) y demuestran importantes relaciones de estructura/actividad con respecto al andamiaje inhibidor

prototípico representado por MBX-1641. Se ha encontrado, por ejemplo, que un sustituyente etilo en el centro asimétrico, al que se hace referencia en la presente memoria como carbono α (alfa) en la fórmula ilustrativa de andamiaje acetamida unido a arilo, a continuación:



5

es un sustituyente hidrocarburo óptimo en dicho andamiaje y sirve como distinción estructural respecto a los compuestos inhibidores ariloacetamida anteriormente estudiados.

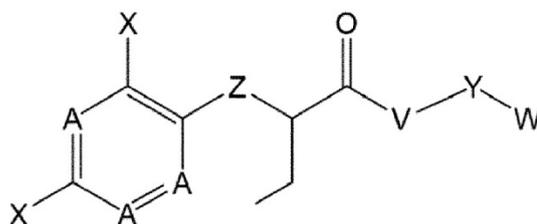
De acuerdo con lo anterior, los compuestos inhibidores T3SS descritos en la presente memoria inhiben la secreción mediada por T3SS de una exotoxina bacteriana (efector) a partir de la célula bacteriana. Más preferentemente, un compuesto inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria inhibe la secreción mediada por T3SS de un efector a partir de la célula bacteria e inhibe además la traslocación mediada por T3SS del efector de célula bacteriana a célula huésped (por ejemplo una célula humana u otra célula animal).

En una realización preferente, un compuesto inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria inhibe T3SS en una bacteria del género *Pseudomonas*, *Yersinia* o *Chlamydia*.

En otra realización, un compuesto inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria inhibe la T3SS de *Pseudomonas* y la T3SS de una bacteria de por lo menos otro género. Preferentemente, la bacteria diana *Pseudomonas* de la inhibición es *P. aeruginosa*. Preferentemente, el otro género bacteriano susceptible de inhibición de T3SS por uno o más compuestos de la invención es *Yersinia* o *Chlamydia*. Una especie diana de la inhibición preferente de *Yersinia* es *Y. pestis*. Una especie diana de inhibición preferente de *Chlamydia* es *C. trachomatis*.

La presente invención proporciona un compuesto inhibidor del sistema de secreción de tipo III bacteriano (T3SS) de fórmula I:

25



fórmula 1

en la que,

30

A es independientemente CH o N,

X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,

Z es O, S, NH; o NR^3 , en la que R^3 es alquilo,

V es NR^2 , O, o CR^3R^4 ,

35 R^2 , R^3 y R^4 son, independientemente, hidrógeno o alquilo,

Y se selecciona de entre:

un radical alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxilo, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, oxígeno,

40

o NR^5 , en la que R^5 es hidrógeno o alquilo,

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, el radical W de los cuales puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxilo, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y

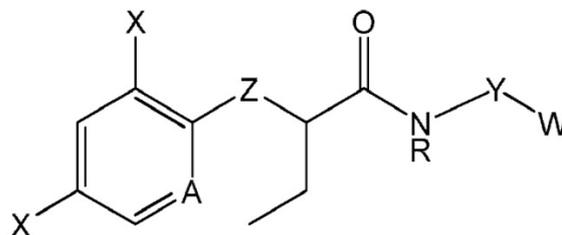
45

en el que dos sustituyentes cualesquiera juntos pueden formar una estructura de anillo aromático o no aromático fusionado con dicho radical arilo o heteroarilo W, los sustituyentes del cual presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente con Y o R^2 , o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o

50

carbocíclicos, los cuales pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos (es decir, uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados)).

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto inhibidor de T3SS de fórmula III:



fórmula III

en la que:

A es CH o N,

X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,

R es hidrógeno o metilo,

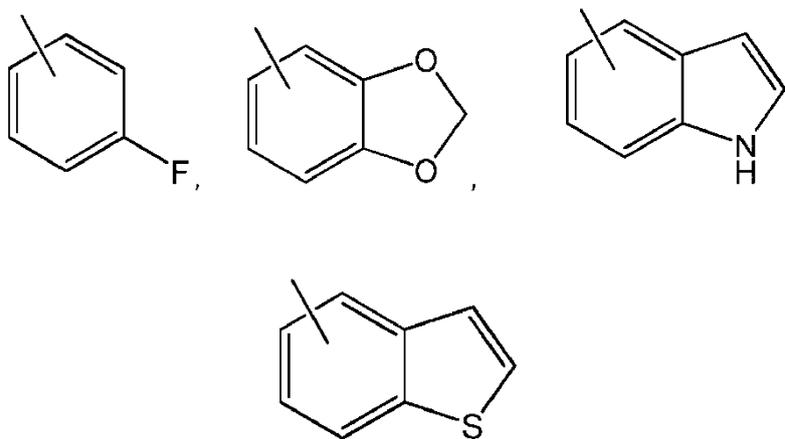
Y es un radical alquilo, alquenoilo o alquinilo de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcocarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi,

Z es O, S, o NH o NR³, y

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en el que el radical W puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, hidroxilo, amino, carboxamido, carboxilo, ciano, sulfonamido, sulfonilo, alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y en el que dos sustituyentes cualesquiera juntos pueden formar una estructura de anillo aromático o no aromático fusionado con dicho radical arilo o heteroarilo

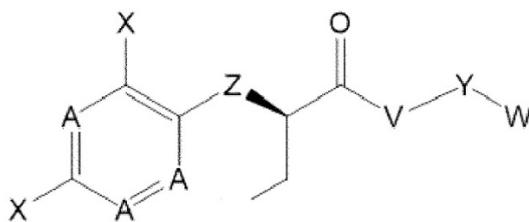
W, los sustituyentes del cual presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente a Y o R², o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, los cuales pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos (es decir, uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados)).

En todavía otra realización, la presente invención proporciona un compuesto inhibidor de T3SS de fórmula III, en la que W se selecciona de entre:



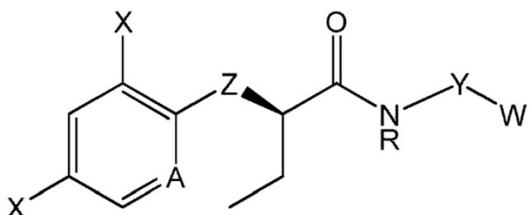
y

Resultan de particular interés los compuestos de fórmulas I y III anteriores, que son mezclas racémicas de los isómeros R y S o el isómero R aislado, considerando el carbono asimétrico (carbono α). De esta manera, los compuestos preferentes son isómeros R aislados indicados con la fórmula Ia o IIIa, a continuación:



fórmula I,

y



fórmula IIIa,

en la que A, X, Y, Z y W presentan los mismos valores indicados para las fórmulas I y III, respectivamente, indicados anteriormente.

Los compuestos según las fórmulas anteriores se sometieron a ensayo utilizando ensayos que muestran la inhibición específica de T3SS de *P. aeruginosa*. Los compuestos seleccionados se sometieron a ensayo adicionalmente para la inhibición de *Chlamydia trachomatis* y *Yersinia pestis* y mostraron una inhibición eficaz, indicando que el compuesto inhibidor de T3SS según la presente invención puede ser un inhibidor eficaz de muchos sistemas de secreción de tipo III bacterianos, actuando en diferentes especies dentro de un género y en diferentes géneros de bacterias que presentan sistemas de secreción de tipo III.

Los compuestos inhibidores de T3SS indicados en la presente memoria inhiben la transcripción de efector de T3SS por lo menos al 15% a una concentración de 50 μM utilizando un ensayo de informador transcripcional o muestran una inhibición de por lo menos 50% de la secreción de efector a una concentración de 100 μM o menos ($\text{IC}_{50} \leq 100 \mu\text{M}$) en un ensayo de secreción de efector. Los compuestos indicados anteriormente muestran una inhibición específica de T3SS en *Pseudomonas* superior a 15% utilizando un constructo de informador transcripcional *exoT-lux* transferido al interior de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (cepa informadora MDM852, descrita en la presente memoria) y/o muestran una IC_{50} inferior a 100 μM para T3SS medida en un ensayo de secreción mediada por T3SS de un ensayo de proteína de fusión de toxina efectora-informador β -lactamasa descrito en la presente memoria, utilizando *P. aeruginosa* cepa MDM973 (PAK/pUCP24GW-*lacI*^Q-*lacPO*-*exoS::blaM*). Ver la Tabla 1, *infra*. Los compuestos que inhiben la transcripción del efector en menos de 15% o con una IC_{50} superior a 200 μM no resultan generalmente útiles como inhibidores de T3SS en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria.

Preferentemente, un compuesto inhibidor de T3SS útil en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria presenta un valor de IC_{50} inferior a 200 μM según medición en un ensayo de secreción de proteína de fusión de toxina efectora-informador β -lactamasa descrito en la presente memoria (o ensayo comparable) y también presenta una citotoxicidad relativamente baja para las células humanas, tal como un valor de CC_{50} superior o igual a 200 μM ($\text{CC}_{50} \geq 200 \mu\text{M}$) medida en un ensayo estándar de citotoxicidad tal como se describe en la presente memoria o tal como se utiliza en el campo farmacéutico para antibióticos. Dichos ensayos estándares de citotoxicidad pueden utilizar cualquier célula humana utilizada típicamente en los ensayos de citotoxicidad para antibióticos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células Hep-2, células renales embrionarias (HEK) 293 humanas, células 293T y similares.

Todavía más preferentemente, un compuesto inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria presenta un valor de $\text{IC}_{50} \leq 50 \mu\text{M}$ medido en un ensayo de secreción de proteína de fusión de toxina efectora-informador β -lactamasa mediado por T3SS tal como se describe en la presente memoria o en un ensayo comparable.

Preferentemente, un compuesto inhibidor de T3SS bloquea la secreción y traslocación mediada por T3SS de una o más toxinas efectoras de células de *P. aeruginosa*. Los compuestos T3SS descritos en la presente memoria resultan útiles como agentes antivirulencia y pueden utilizarse para tratar infecciones bacterianas. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un individuo infectado o expuesto a infección bacteriana, especialmente la infección por *Pseudomonas*, *Yersinia* o *Chlamydia*, puede tratarse mediante la administración en el individuo que lo necesita de una cantidad eficaz de un compuesto según la invención.

50

La utilización de uno o más compuestos o una combinación de compuestos dados a conocer en la presente memoria para tratar la infección por bacterias que presentan un sistema de secreción de tipo III se encuentra contemplada en la presente memoria. Especialmente, la utilización de uno o más compuestos o una combinación de los compuestos indicados anteriormente para tratar la infección por *Pseudomonas*, *Yersinia* o *Chlamydia* se encuentra contemplada en la presente memoria. En particular, la utilización de uno o más compuestos o una combinación de los compuestos indicados anteriormente para el tratamiento de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis* o *Chlamydia trachomatis* se lleva a cabo ventajosamente siguiendo las enseñanzas en la presente memoria.

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que contienen uno o más de los compuestos inhibidores de T3SS dados a conocer en la presente memoria y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se da a conocer la utilización de uno o más de los compuestos inhibidores de T3SS en la preparación de un medicamento para combatir la infección bacteriana.

Puede utilizarse un compuesto inhibidor de T3SS o una combinación de compuestos inhibidores de T3SS descritos en la presente memoria como terapia de soporte o complementaria para el tratamiento de la infección bacteriana en un individuo (ser humano u otro animal). En el caso de un individuo con un sistema inmunológico sano, la administración de un inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria para inhibir T3SS en las células bacterianas o en un individuo puede resultar suficiente para permitir que el sistema inmunológico propio del individuo elimine o mate eficazmente las bacterias infecciosas o contaminantes del tejido del individuo. Alternativamente, puede administrarse un compuesto inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria en un individuo junto con (es decir, en una mezcla, secuencialmente o simultáneamente) con un agente antibacteriano, tal como un antibiótico, un anticuerpo o un agente inmunoestimulador, para proporcionar tanto la inhibición de T3SS como la inhibición del crecimiento de las células bacterianas invasoras.

Se da a conocer además en la presente memoria una composición que comprende un inhibidor de T3SS o una combinación de inhibidores de T3SS descritos en la presente memoria que puede comprender además un segundo agente (segundo ingrediente activo, segundo agente activo) que posee una actividad terapéutica o profiláctica deseada diferente de la de inhibición de T3SS. Dicho segundo agente activo incluye, aunque sin limitación, un antibiótico, un anticuerpo, un agente antivírico, un agente anticáncer, un agente analgésico (por ejemplo un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), acetaminofeno, un opioide, un inhibidor de COX-2), un agente inmunoestimulante (por ejemplo, una citoquina), una hormona (natural o sintética), un estimulante del sistema nervioso central (SNC), un agente antiemético, un antihistamínico, una eritropoyetina, un agente estimulante del complemento, un sedante, un agente relajante muscular, un agente anestésico, un agente anticonvulsivo, un antidepresivo, un agente antipsicótico y combinaciones de los mismos.

Las composiciones que comprenden un inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria pueden formularse para la administración en un individuo (humano u otro animal) mediante cualquiera de entre una diversidad de vías, incluyendo, aunque sin limitación, las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, parenteral, intraperitoneal, sublingual (bajo la lengua), bucal (mejilla), oral (para la deglución), tópica (epidermis), transdérmica (absorción a través de la piel y capas dérmicas inferiores hasta la vasculatura subyacente), nasal (mucosa nasal), intrapulmonar (pulmones), intrauterina, vaginal, intracervical, rectal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrarrenal, nasoyeyunal e intraduodenal.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que ilustra el rescate dependiente de la concentración de las células CHO de la citotoxicidad de ExoS β LA mediada por T3SS por dos compuestos fenoxiacetamida, medida tal como se ha descrito anteriormente en Aiello et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:1988-99, 2010. Se comparó un compuesto según la invención, MBX-2081, con un inhibidor de T3SS encontrado anteriormente, denominado MBX-1641, utilizado como estándar de referencia. Los resultados indican que MBX-2081 proporciona un incremento de 3 a 4 veces de la potencia respecto a MBX-1641.

La figura 2 es un gráfico de barras que muestra la progresión de las propiedades de una serie de análogos e indica que determinadas alteraciones estructurales beneficiosas en un andamiaje de acetamida puede presentar efectos aditivos. Todos los compuestos mostraron mejoras (es decir, reducciones de los valores de IC₅₀ en el ensayo de ExoS β LA) respecto a un inhibidor de referencia, MBX-1641. Se compararon los compuestos MBX-2155, MBX-2081, MBX-2263 y MBX-2264 y las estructuras de los compuestos aparecen a la izquierda del gráfico.

La figura 3 es un gráfico que muestra los efectos del compuesto MBX-1641 y sus enantiómeros R y S sobre la secreción de ExoS β LA de *P. aeruginosa*. La dependencia de la concentración de MBX-1641 y sus dos estereoisómeros, MBX-1684 (enantiómero R) y MBX-1686 (enantiómero S) se determinó a partir de la tasa de corte de la nitrocefina por el ExoS β LA secretado y se calculó como fracción de corte en ausencia de inhibidor. Se muestra la inhibición de la secreción por la mezcla racémica MBX-1641 (■, línea continua), el enantiómero R MBX-1684 (◇, línea discontinua) y el enantiómero S MBX-1686 (Δ, línea discontinua).

La figura 4 es un gráfico que muestra los efectos del compuesto α MBX-2359 y sus enantiómeros R y S sobre la secreción de ExoS β LA de *P. aeruginosa*. La dependencia de la concentración de MBX-2359 y sus dos

estereoisómeros, MBX-2401 (enantiómero R) y MBX-2402 (enantiómero S) se determinó a partir de la tasa de corte de la nitrocefina por el ExoS β LA secretado y se calculó como fracción de corte en ausencia de inhibidor. Se muestra la inhibición de la secreción por la mezcla racémica MBX-2359 (■, línea continua), el enantiómero R MBX-2401 (◊, línea discontinua) y el enantiómero S MBX-2402 (Δ, línea discontinua). También se muestran los resultados de otro compuesto sustituido con α -etilo, M BX-2263 (racemato, ○).

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona compuestos orgánicos que inhiben un sistema de secreción de tipo III bacteriano ("T3SS") que secreta y trasloca efectores producidos en la bacteria (también denominados toxinas efectoras, exotoxinas, citotoxinas y toxinas bacterianas) de la célula bacteriana hasta el interior de las células huésped animales. Los efectores traslocados al interior de las células huésped pueden inactivar eficazmente la respuesta inmunológica del huésped, tal como mediante la eliminación de fagocitos, desactivando de esta manera la respuesta inmunológica innata del huésped. De esta manera, T3SS es un factor de virulencia crítico en el establecimiento de infecciones bacterianas en un individuo (humano u otro animal) y resulta particularmente crítico para las infecciones oportunistas por *P. aeruginosa* de pacientes humanos con sistemas inmunológicos comprometidos o que se han vuelto susceptibles a la infección por bacterias tales como *P. aeruginosa*.

A fin de que la invención pueda entenderse más claramente, se definen a continuación las abreviaturas y términos siguientes.

Las abreviaturas para diversos sustituyentes (grupos laterales, radicales) de moléculas orgánicas son las utilizadas comúnmente en la química orgánica. Dichas abreviaturas pueden incluir formas "acortadas" de dichos sustituyentes. Por ejemplo, "Ac" es una abreviatura para un grupo acetilo, "Ar" es una abreviatura para un grupo "arilo" y "halo" o "halógeno" indica un radical halógeno (por ejemplo F, Cl, Br e I). "Me" y "Et" son abreviaturas utilizadas para indicar los grupos metilo (CH₃-) y etilo (CH₃CH₂-), respectivamente y "OMe" (o "MeO") y "OEt" (o "EtO") indican metoxi (CH₃O-) y etoxi (CH₃CH₂O-), respectivamente. Los átomos de hidrógeno no siempre se muestran en los diagramas de las estructuras orgánicas (por ejemplo, al final de una línea dibujada que representa un grupo CH₃) o puede mostrarse sólo selectivamente en algunos diagramas estructurales, ya que la presencia y localización de los átomos de hidrógeno en las estructuras de las moléculas orgánicas son comprendidas y conocidas por el experto en la materia. De manera similar, los átomos de carbono no siempre se abrevian específicamente con "C", ya que la presencia y localización de los átomos de carbono en los diagramas estructurales son conocidos y entendidos por el experto en la materia. Los minutos se abrevian comúnmente como "min"; las horas se abrevian comúnmente como "h".

Una composición o método descrito en la presente memoria como "comprendiendo" uno o más elementos o etapas nombrados es abierto, es decir, los elementos o etapas nombrados resultan esenciales pero pueden añadirse otros elementos o etapas dentro del alcance de la composición o método. Para evitar dilataciones innecesarias, también se entiende que cualquier composición o método descrito como "comprendiendo" (o que "comprende") uno o más elementos o etapas nombrados también describe que la composición o método correspondiente, más limitadamente, "consiste esencialmente en" (o que "consiste esencialmente en") los mismos elementos o etapas nombrados, en referencia a que la composición o método incluye los elementos o etapas esenciales nombrados y también puede incluir elementos o etapas adicionales que no afectan materialmente a la característica o características básicas y nuevas de la composición o método. También se entiende que cualquier composición o método que se describa en la presente memoria como "comprendiendo" o "que consiste esencialmente en" uno o más elementos o etapas nombrados también describe la expresión correspondiente, más limitada y cerrada de que la composición o método "consiste en" (o que "consiste en") los elementos o etapas nombrados, excluyendo cualquier otro elemento o etapa no nombrado. En cualquier composición o método dado a conocer en la presente memoria, los equivalentes conocidos o dados a conocer de cualquier elemento o etapa esencial nombrado pueden sustituirse por dicho elemento o etapa. También se entiende que un elemento o etapa "seleccionado de entre el grupo que consiste en" se refiere a uno o más de los elementos o etapas en la lista a continuación, incluyendo combinaciones de dos o más cualesquiera de los elementos o etapas listados.

Las expresiones "inhibidor del sistema de secreción de tipo III bacteriano", "inhibidor de T3SS bacteriano", "compuesto inhibidor de T3SS bacteriano" y "compuesto inhibidor de T3SS" tal como se utilizan en la presente memoria son intercambiables y se refieren a compuestos que muestran la capacidad de inhibir específicamente un sistema de secreción de tipo III bacteriano como mínimo en un 15% a una concentración de 50 μ M, por ejemplo, según se mide en un ensayo informador transcripcional de efector T3SS o la capacidad de inhibir un T3SS bacteriano, por ejemplo tal como se mide en un ensayo de secreción de toxina efectora mediada por T3SS.

En el contexto de la utilización terapéutica de los compuestos inhibidores de T3SS descritos en la presente memoria, los términos "tratamiento", "tratar" o "tratando" se refieren a cualquier uso de los compuestos inhibidores de T3SS calculados o destinados a anular o inhibir la virulencia o la secreción o traslocación de efectores mediada por T3SS de bacterias que presentan sistemas de secreción de tipo III. De esta manera, el tratamiento de un individuo puede llevarse a cabo después de cualquier diagnóstico que indique la posible infección bacteriana, es decir, si una infección por una bacteria particular ha sido confirmada o si sólo se sospecha de la posibilidad de infección, por

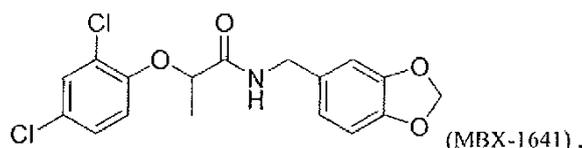
ejemplo tras la exposición a la bacteria o a otro individuo infectado por la bacteria. También se reconoce que, aunque los inhibidores de la presente invención afectan a la introducción de toxinas efectoras en las células huésped y de esta manera bloquean o reducen la virulencia o toxicidad resultante de la infección, los compuestos inhibidores no son necesariamente bactericidas o eficaces en la inhibición del crecimiento o propagación de las células bacterianas. Por este motivo, se entenderá que la eliminación de la infección bacteriana será ejecutada por el sistema inmunológico del huésped o células efectoras inmunológicas del propio huésped, o mediante la introducción de agentes antibióticos. De esta manera, se encuentra contemplado que los compuestos de la presente invención se combinen rutinariamente con otros ingredientes activos, tales como antibióticos, anticuerpos, agentes antivíricos, agentes anticáncer, analgésicos (por ejemplo un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), acetaminofeno, opioides, inhibidores de COX-2), agentes inmunoestimuladores (por ejemplo, citoquinas o moléculas orgánicas inmunoestimuladoras sintéticas), hormonas (naturales, sintéticas o semisintéticas), estimulantes del sistema nervioso central (SNC), agentes antieméticos, antihistamínicos, eritropoyetina, agentes que activan el complemento, sedantes, relajantes musculares, agentes anestésicos, agentes anticonvulsivos, antidepressivos, agentes antipsicóticos y combinaciones de los mismos.

La expresión "parcialmente aromático" indica que uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados).

El significado de otros términos se entenderá a partir del contexto tal como entenderá el experto en la materia, incluyendo los campos de la química orgánica, farmacológica y microbiología.

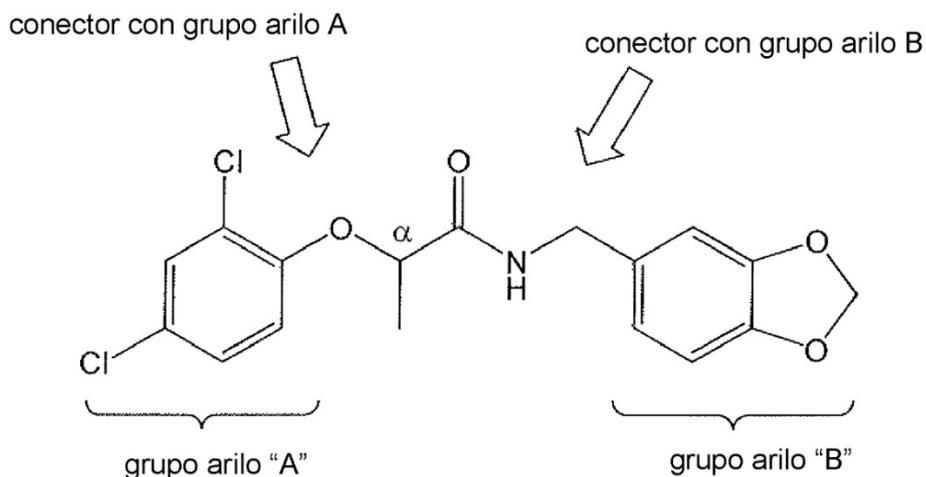
La invención proporciona compuestos orgánicos específicos que inhiben la T3SS de *Pseudomonas aeruginosa*. Se evaluaron análogos estructurales de inhibidores de T3SS anteriormente estudiados para la inhibición de la secreción mediada por T3SS de una proteína de fusión de toxina efectora-β-lactamasa (ExoS'-βLA) utilizando *P. aeruginosa* cepa MDM973 (PAK/pUCP24GW-*lacI*^q-*lacPO*-*exoS*::*blaM*, Tabla 1). Ver los Ejemplos 1 y 2, posteriormente, para la información sobre el cribado y validación de los inhibidores de T3SS iniciales.

En una serie de experimentos para comparar los efectos de modificar el andamiaje fenoxiacetamida, del que el compuesto MBX-1641 es un ejemplo prototípico,



se sintetizaron análogos con alteraciones en el grupo arilo "A", en el conector del grupo arilo "A" con la fracción metil acetamida, en el grupo arilo "B" y en el conector del grupo arilo B con la fracción metil acetamida (ver el Diagrama 1),

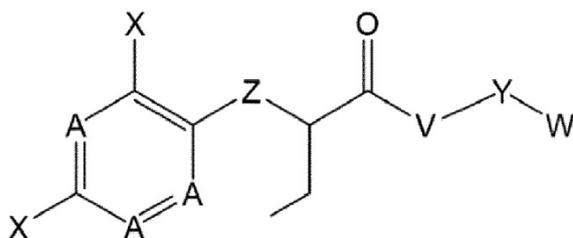
Diagrama 1



y los resultados indican limitaciones definidas a estructuras alternativas en el andamiaje metil acetamida que rendirían compuestos que también presentan actividad inhibitora específica con respecto a T3SS. Se toleraron muy pocas modificaciones del grupo arilo A sin elevar los niveles de concentración inhibitora (IC₅₀) más allá del estándar mínimo (es decir, 200 μM); sin embargo, pudo tolerarse un amplio abanico de sustituciones del grupo arilo B sin afectar adversamente y en algunos casos mejorando el comportamiento de inhibición de T3SS. En general, las

relaciones de estructura/actividad que emergen de los experimentos son características de compuestos alternativos que son reactivos con un único sitio de unión diana. Se estudiaron fracciones conectoras alternativas con el grupo arilo A y el grupo arilo B y se encontró que dichas posiciones mostraban una influencia significativa sobre las propiedades globales de los compuestos resultantes. De manera similar, los cambios para eliminar el grupo metilo en el centro quiral (carbono α) o para incrementar el tamaño del grupo sustituyente también condujeron a efectos significativos sobre las propiedades de inhibición de T3SS.

A partir del programa de síntesis de análogos y los ensayos comparativos emergió una familia de nuevos compuestos que mostraba propiedades inhibitoras de T3SS comparables y en muchos casos superiores a las de los compuestos inhibidores fenoxiacetamida que han sido descritos anteriormente. La familia de nuevos compuestos inhibidores de T3SS se definen mediante la fórmula I:



fórmula 1

en la que:

A es independientemente CH o N,
 X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,
 Z es O, S, NH; o NR^3 , en la que R^3 es alquilo,
 V es NR^2 , O, o CR^3R^4 ,
 R^2 , R^3 y R^4 son, independientemente, hidrógeno o alquilo,
 Y se selecciona de entre:

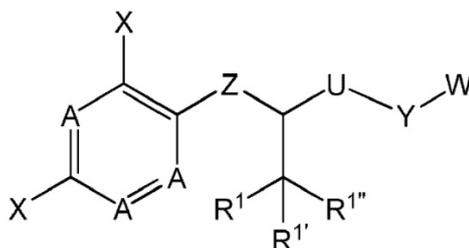
un radical alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcocarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, oxígeno,

o NR^5 , en la que R^5 es hidrógeno o alquilo,

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, el radical W de los cuales puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcocarbonilo, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y

en el que dos sustituyentes cualesquiera juntos pueden formar una estructura de anillo aromático o no aromático fusionado con dicho radical arilo o heteroarilo W, los sustituyentes del cual presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente con Y o R^2 , o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, los cuales pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos (es decir, uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados)).

En la presente memoria se da a conocer además una familia de compuestos inhibidores del sistema de secreción de tipo III bacteriano (T3sS) de fórmula II:



fórmula II

en la que:

A es independientemente CH o N,
 X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,

Z es O, S, NH; o NR^3 , en la que R^3 es alquilo,

R^1 , R^1' y $R^{1''}$ se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, halógeno, alquilo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio o ciano, en los que no más de dos de los radicales anteriormente indicados son hidrógenos,

R^2 , R^3 y R^4 son, independientemente, hidrógeno o alquilo,

U es un anillo heterocíclico de 5 o 6 elementos divalentes seleccionado de entre oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, 1,2,3 triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2-oxazina, 1,3-oxazina, pirimidina, piridazina y pirazina,

Y se selecciona de entre:

un radical alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcocarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, oxígeno,

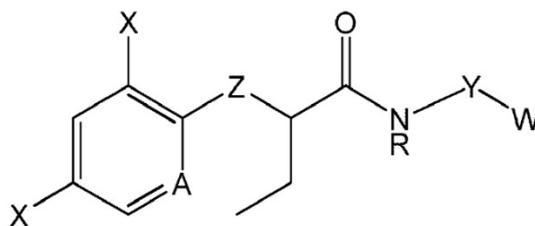
o NR^5 , en la que R^5 es hidrógeno o alquilo,

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, el radical W de los cuales puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcocarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y

en el que dos sustituyentes cualesquiera juntos pueden formar una estructura de anillo aromático o no aromático fusionado con dicho radical arilo o heteroarilo W, los sustituyentes del cual presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente con Y o R^2 , o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, los cuales pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos (es decir, uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados)).

25

En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto inhibidor de T3SS de fórmula III:



fórmula III

30 en la que:

A es CH o N,

X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,

R es hidrógeno o metilo,

35 Y es un radical alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcocarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi,

40 Z es O, S, o NH o NR^3 , y

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en los que el radical W puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, hidroxilo, amino, carboxamido, carboxilo, ciano, sulfonamido, sulfonilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y en los que dos sustituyentes cualesquiera pueden formar juntos una estructura de anillos aromáticos o no aromáticos fusionada con dicho radical arilo o heteroarilo W, en la que los sustituyentes presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente con Y o R^2 , o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, en los que los sistemas de anillos pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos (es decir, uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados)).

50

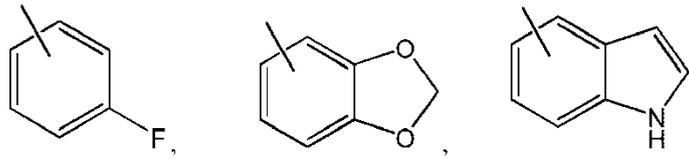
En todavía otra realización, la presente invención proporciona un compuesto inhibidor de T3SS de fórmula III:

A es CH o N,

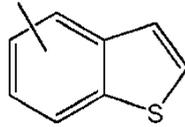
por lo menos un X es Cl y el otro X es hidrógeno, F o Cl,

55 Y es $-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, o $-C(CH_3)_2-$ y

W se selecciona de entre



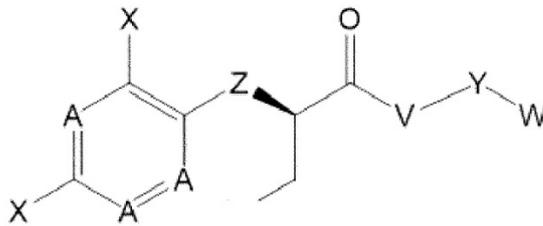
y



5

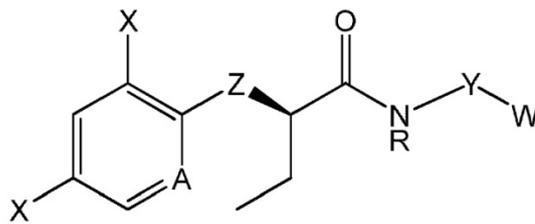
Resultan de particular interés los compuestos de fórmulas I y III anteriores, que son mezclas racémicas de los isómeros R y S o el isómero R aislado, considerando el carbono asimétrico (carbono α). De esta manera, los compuestos preferentes son isómeros R aislados indicados con la fórmula Ia o IIIa, a continuación:

10



fórmula Ia,

y

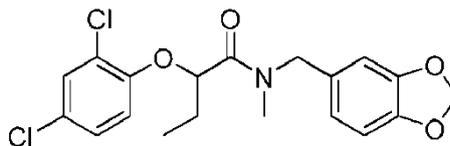
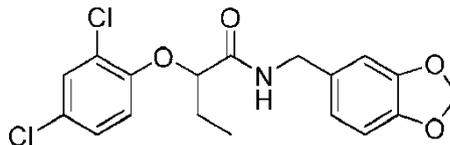


fórmula IIIa,

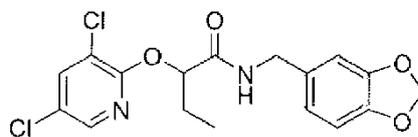
15

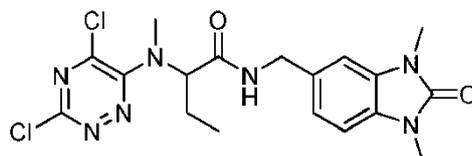
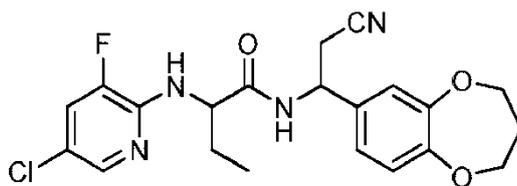
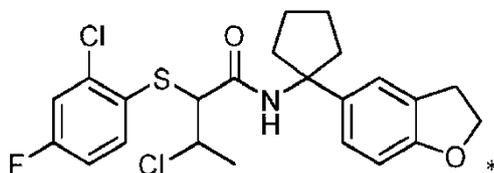
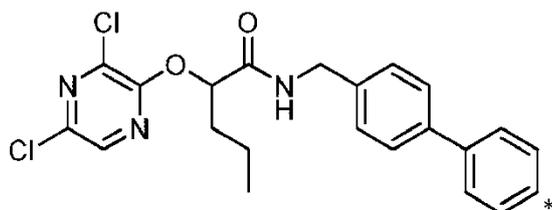
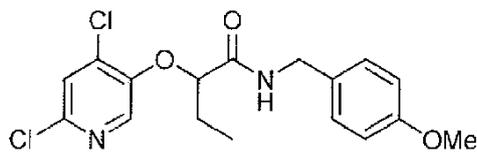
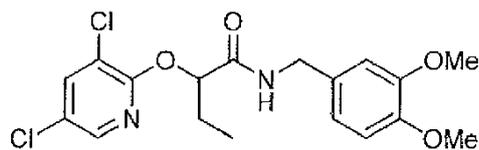
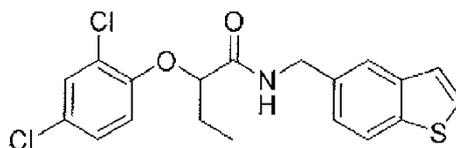
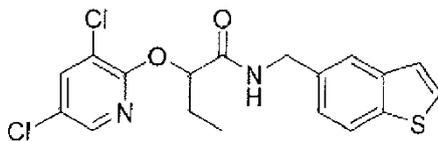
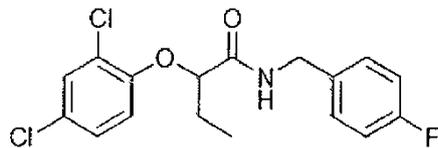
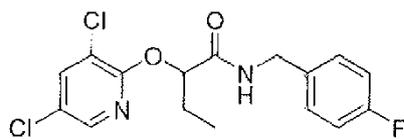
en la que A, X, Y, Z y W presentan los mismos valores indicados para las fórmulas I y III, respectivamente, indicados anteriormente.

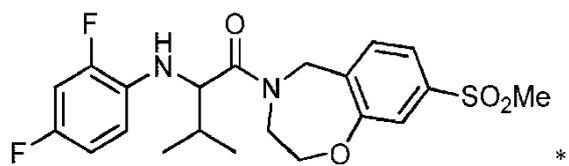
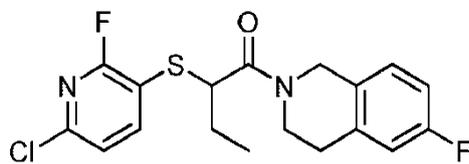
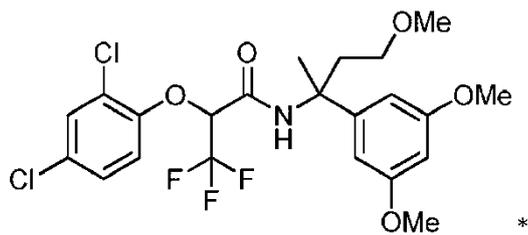
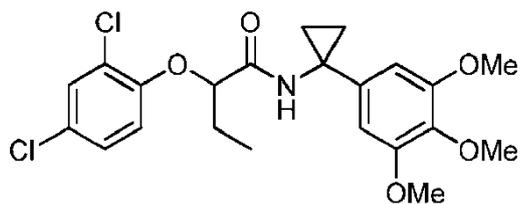
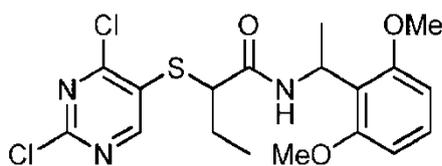
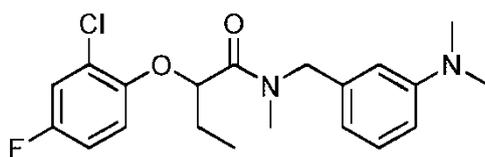
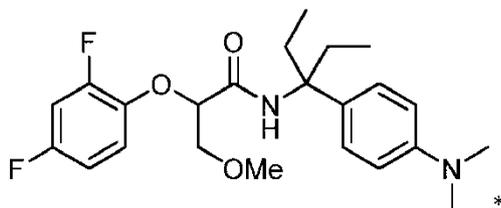
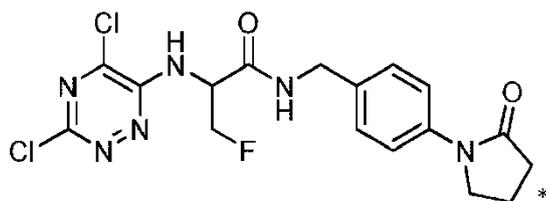
20 Entre las realizaciones particulares de la presente invención se incluyen las siguientes (los compuestos fuera del alcance de las reivindicaciones se indican con un *):

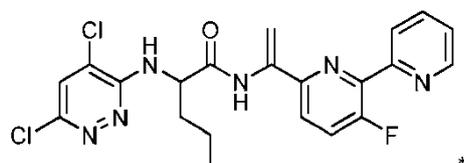
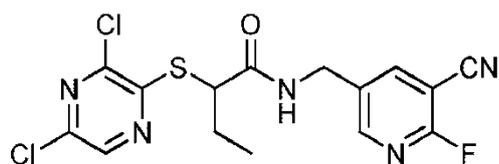
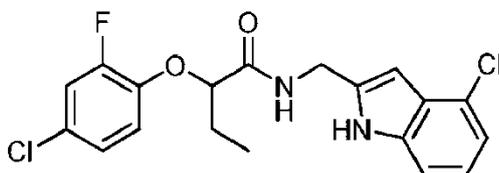
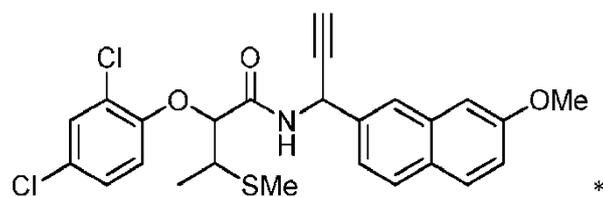
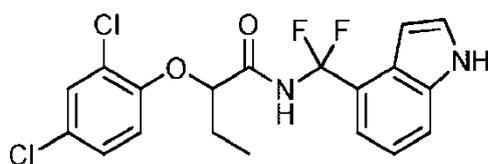
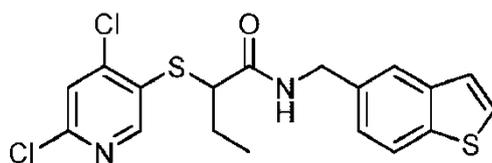
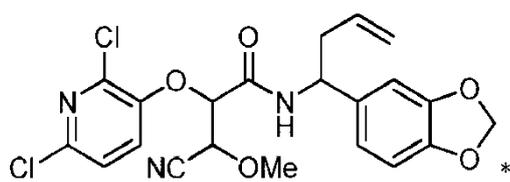
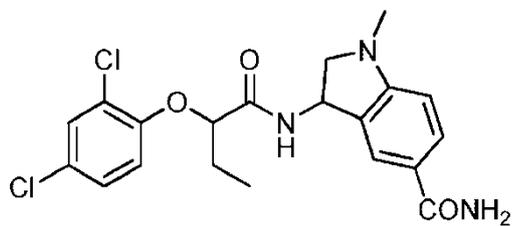
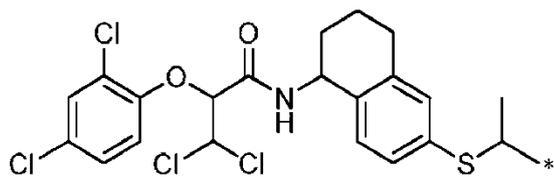


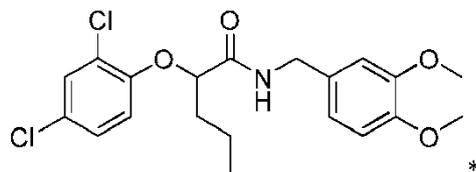
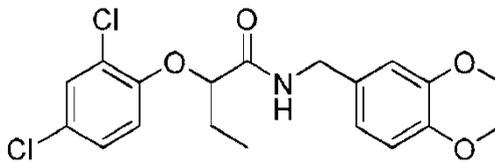
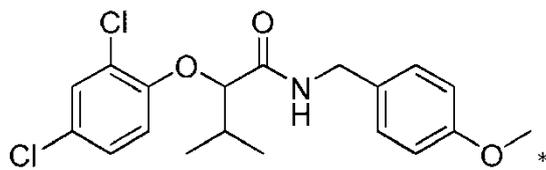
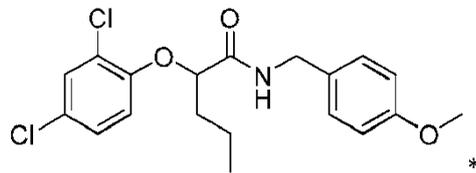
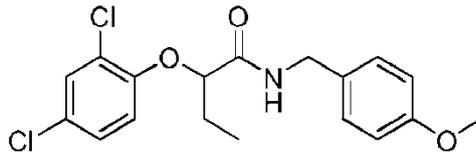
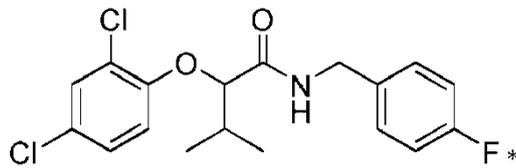
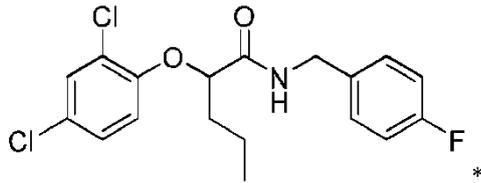
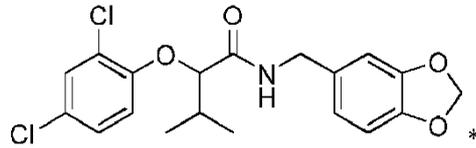
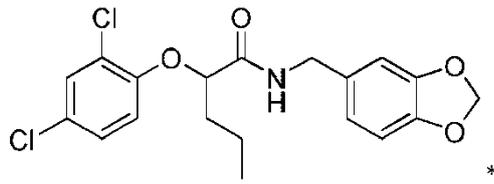
25

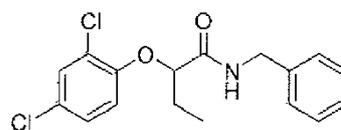
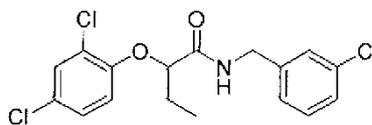
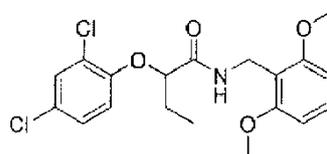
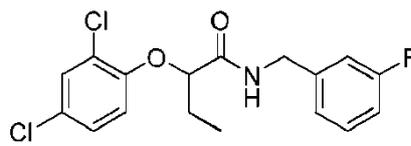
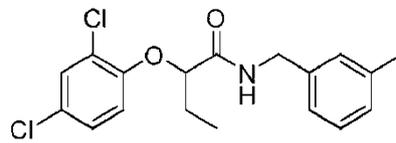
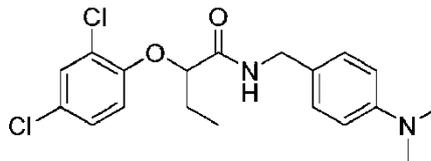
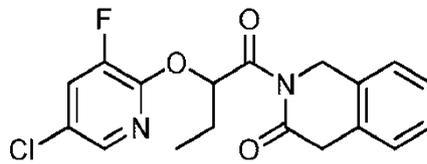
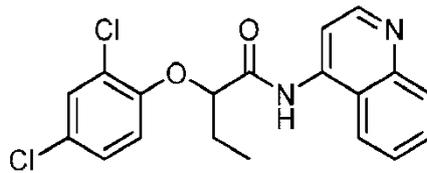
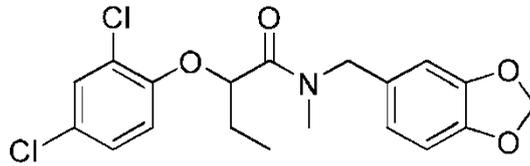
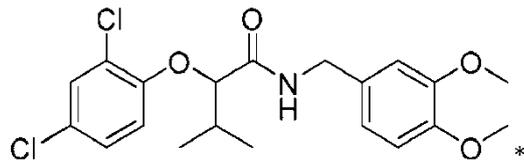


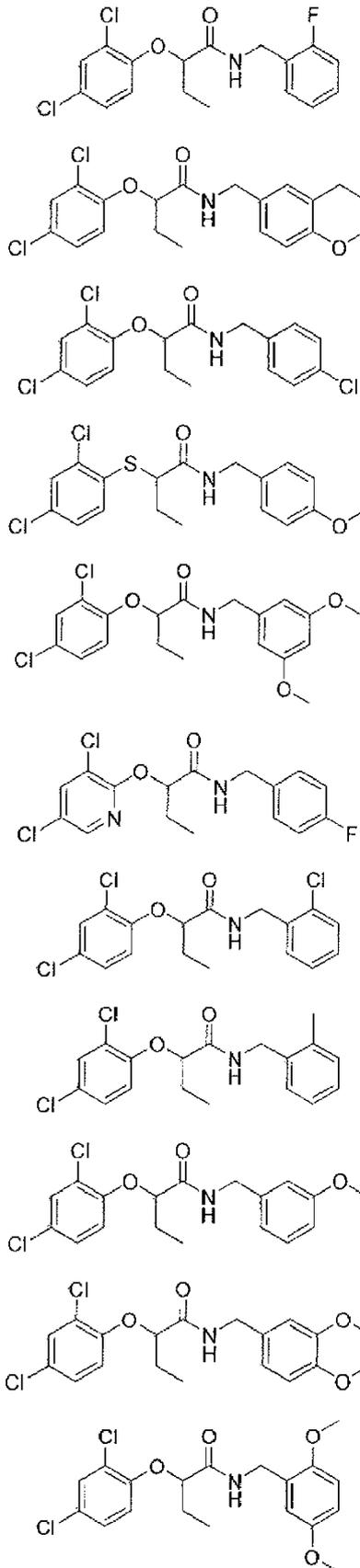


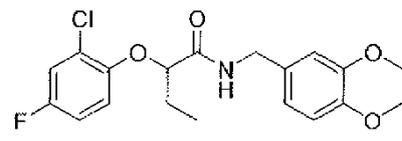
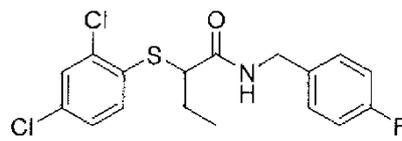
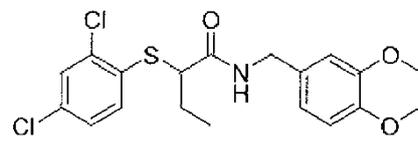
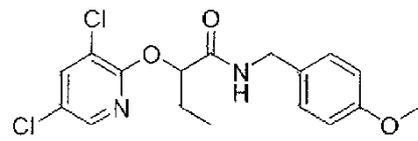
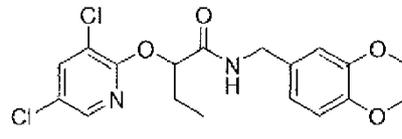
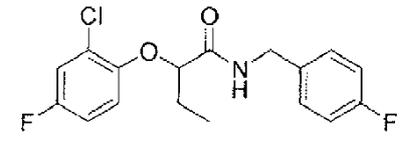
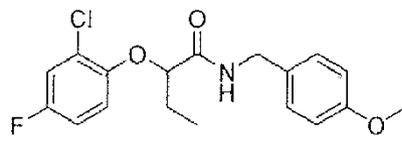
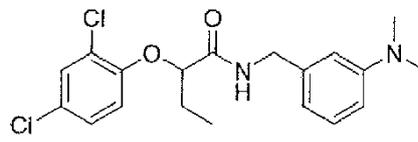
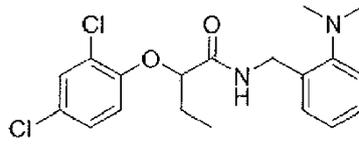
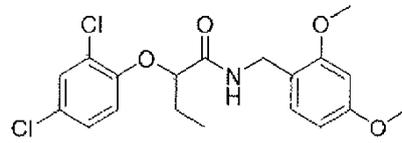
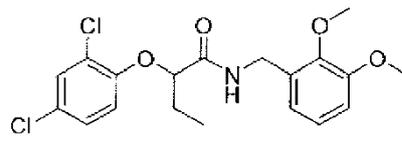


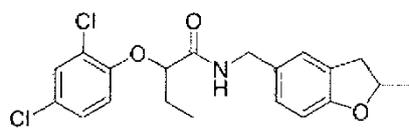
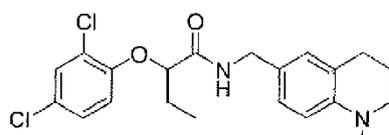
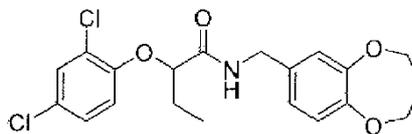
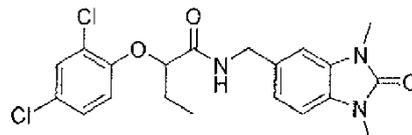
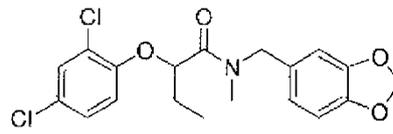
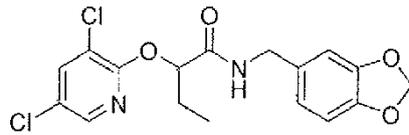
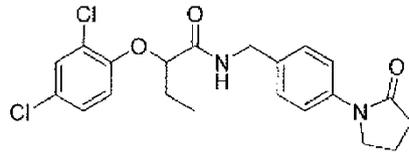
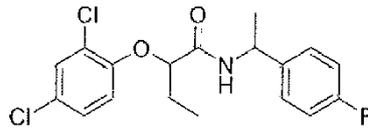
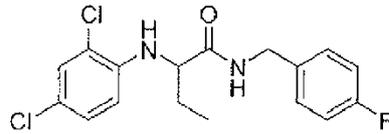
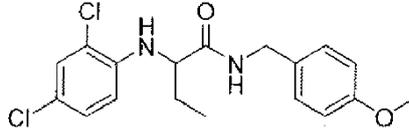
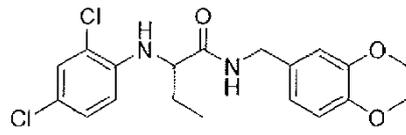


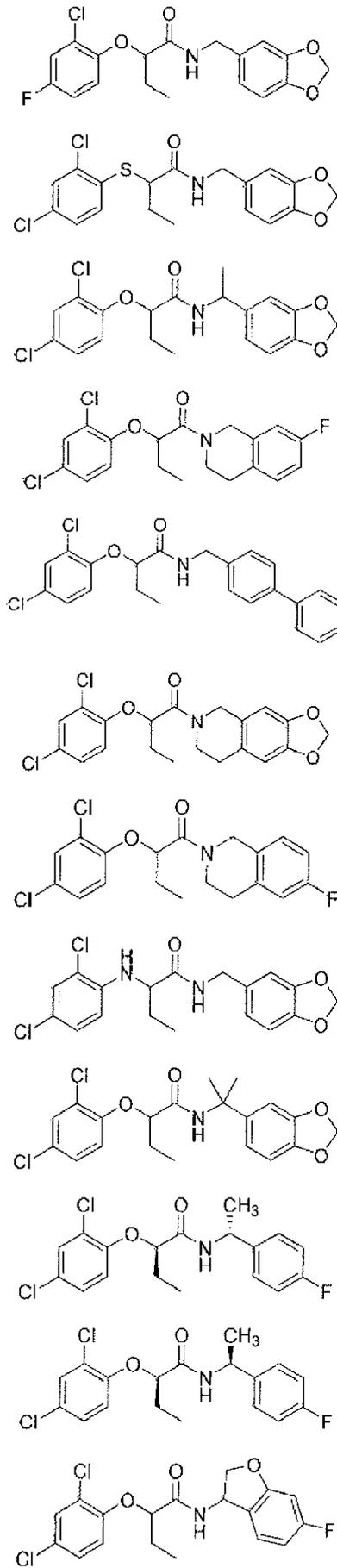


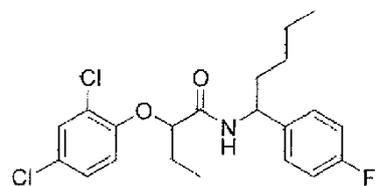
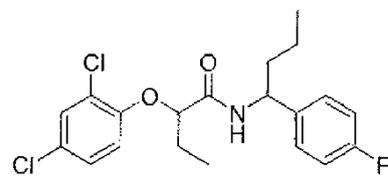
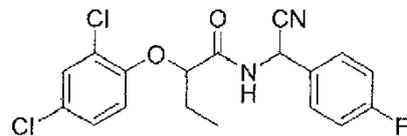
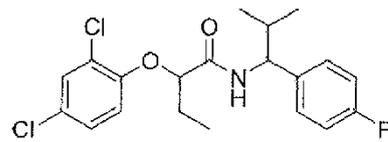
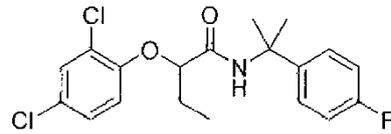
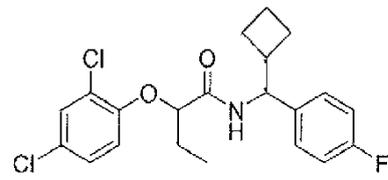
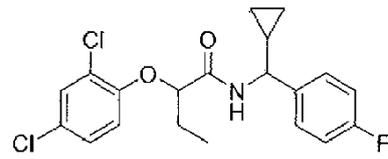
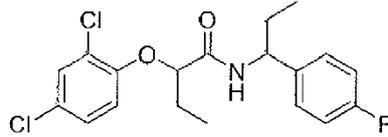
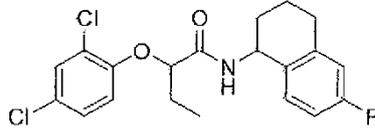
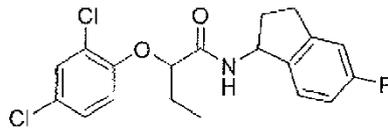


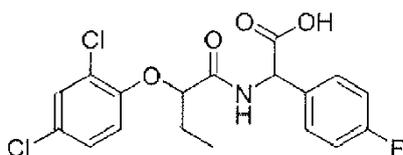
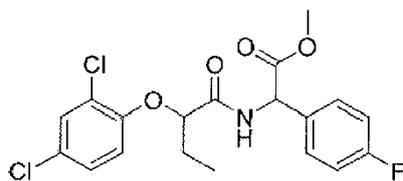
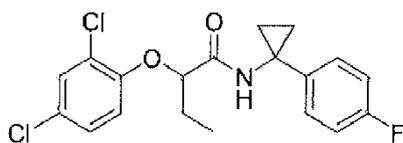












5

así como formas isoméricas particulares de cualquiera de los anteriores.

Los compuestos de la presente invención están diseñados para funcionar mediante un nuevo enfoque antivirulencia de potenciación de la actividad de los agentes antibacterianos existentes mediante el impulso del sistema inmunológico innato del huésped en lugar de eliminar directamente las bacterias invasoras. Aunque no son moduladores inmunológicos innatos clásicos, dichos agentes anti-T3SS se cree que actúan indirectamente sobre los huéspedes diana mediante la protección de los fagocitos del sistema inmunológico innato frente a la mayoría de los efectos citotóxicos agudos de las bacterias que presentan sistemas de secreción de tipo III, tales como *P. aeruginosa*. Como agentes terapéuticos, los compuestos de la invención pueden reducir la frecuencia de infecciones de neumonía asociada al ventilador (VAP, por sus siglas en inglés) polimicrobianas, que aparentemente se deben a la supresión inmunológica innata local por toxinas efectoras T3SS de *P. aeruginosa*. Diaz et al., *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia, *Infect. Immun.* 76:4414-21, 2008. Además, dichos compuestos de la presente invención son específicos de especie y en consecuencia no afectan a la flora normal, haciendo concordar ventajosamente este enfoque terapéutico con los nuevos conocimientos sobre la función protectora de la flora normal en las enfermedades infecciosas. Parillo y Dellinger, *Critical Care Medicine: Principles of Diagnosis and Management in the Adult*, 2a ed. (Moseby, New York 2007), páginas 800 a 802. En caso de aplicación en combinación con un agente antibacteriano, los nuevos compuestos inhibidores de T3SS no contribuyen a la eliminación de la flora normal y podrían permitir la utilización de dosis más bajas de antibióticos coadministrados. Finalmente, dichos compuestos inhibidores de T3SS son igualmente potentes contra múltiples cepas de *P. aeruginosa* (incluyendo aislados clínicos), no resultan afectados por mecanismos de flujo de salida de *P. aeruginosa* y se espera que no ejerzan presión selectiva que conduzca al desarrollo de resistencias exteriores al cuerpo y sólo una presión selectiva relativamente débil durante la terapia. Dicha combinación de características favorables de los compuestos junto con el nuevo mecanismo de acción proporciona un nuevo enfoque de mejora del tratamiento y prevención de las infecciones agudas por *P. aeruginosa*, tales como VAP y la bacteremia.

Los compuestos inhibidores de la presente invención inhiben la transcripción de efectores de T3SS por lo menos al 15% a una concentración de 50 μM utilizando un ensayo de informador transcripcional o muestran una inhibición de por lo menos 50% de la secreción de efector a una concentración de 100 μM o menos ($\text{IC}_{50} \leq 100 \mu\text{M}$) en un ensayo de secreción de efector. Los compuestos listados anteriormente mostraron una inhibición específica de T3SS en *Pseudomonas* superior al 15% utilizando un constructo informador transcripcional *exoT-lux* transferido al interior de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (cepa informadora MDM852, descrita en la presente memoria) y/o mostraron un valor de IC_{50} inferior a 100 μM para T3SS según medición en un ensayo de secreción mediada por T3SS de un ensayo de proteína de fusión de toxina efectora-informador β -lactamasa descrito en la presente memoria, utilizando *P. aeruginosa* cepa MDM973 (*PAK/pUCP24GW-lacI^Q-lacPO-exoS::blaM*) (Tabla 1). Los compuestos que inhiben la transcripción del efector en menos de 15% o con una IC_{50} superior a 200 μM no resultan generalmente útiles como inhibidores de T3SS en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria.

Preferentemente, un compuesto inhibidor de T3SS útil en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria presenta un valor de IC_{50} inferior a 100 μM según medición en un ensayo de secreción de proteína de fusión de toxina efectora-informador β -lactamasa descrito en la presente memoria (o ensayo comparable) y también presenta una citotoxicidad relativamente baja para las células humanas, tal como un valor de CC_{50} superior o igual a 100 μM ($\text{CC}_{50} \geq 100 \mu\text{M}$) medida en un ensayo estándar de citotoxicidad tal como se describe en la presente memoria o tal como se utiliza en el campo farmacéutico para antibióticos. Dichos ensayos estándares de citotoxicidad pueden utilizar cualquier célula humana utilizada típicamente en los ensayos de citotoxicidad para antibióticos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células Hep-2, células renales embrionarias (HEK) 293 humanas, células 293T y similares.

Todavía más preferentemente, un compuesto inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria presenta un valor de $IC_{50} \leq 25 \mu M$ medido en un ensayo de secreción de proteína de fusión de toxina efectora-informador β -lactamasa mediado por T3SS tal como se describe en la presente memoria o en un ensayo comparable. Alternativamente, los compuestos preferentes de la presente invención muestran una potencia (IC_{50}) comparable o preferentemente superior a la de *N*-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ilmetil)-2-(2,4-diclorofenoxy)propanamida (compuesto nº MBX-1641, descrito *supra*), que se utilizó como estándar interno para la comparación en los ejemplos descritos posteriormente.

En todavía otro aspecto, un compuesto inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria presenta una concentración mínima inhibidora (CMI) suficientemente elevada para indicar que inhibe T3SS específicamente.

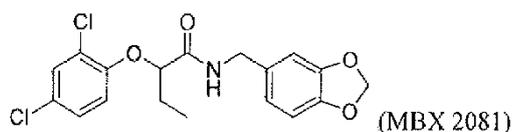
Composiciones y métodos

Los compuestos inhibidores de T3SS tal como se describen en la presente memoria también podrían sintetizarse utilizando reacciones químicas establecidas. La mayoría de los compuestos descritos en la presente memoria se produce o se obtienen en forma de mezclas racémicas de estereoisómeros.

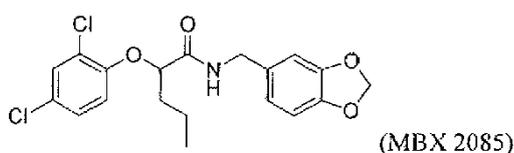
Procedimiento general



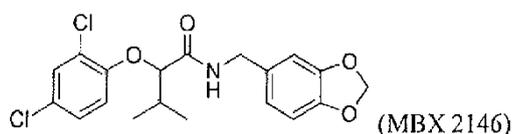
A una solución de ácido 2-(2,4-diclorofenoxy)acético en DMF se añade hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio sustituido (1,2 eq), bencilamina sustituida (1,2 eq) y diisopropiletilamina (1,3 eq). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Las reacciones se diluyeron con agua, se extrajeron con EtOAc y se sometieron a cromatografía flash. La evaporación del solvente proporcionó el producto deseado. Se prepararon los compuestos siguientes de la manera anteriormente indicada:



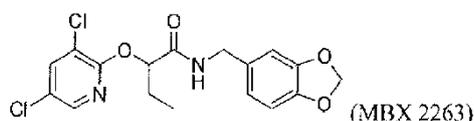
30 polvos de color marrón pálido; R_f 0,62 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 110-114°C; RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7,37 (d, 1H), 7,17 (dd, 1H), 6,82 (d, 2H), 6,72 (d, 2H), 6,67-6,65 (m, 2H), 5,94 (s, 2H), 4,61 (t, 1H) 4,32 (d, 2H), 2,08-1,99 (m, 2H), 1,04 (t, 3H); CL-EM: 384,2 (M+1).



35 polvos de color marrón pálido; R_f 0,72 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 91-94°C; RMN 1H [300 MHz, $CDCl_3$]: δ 7,36 (d, 1H), 7,16 (dd, 1H), 6,83-6,71 (m, 3H), 6,65-6,63 (m, 2H), 5,94 (s, 2H), 4,63 (t, 1H) 4,35 (d, 2H), 2,10-1,93 (m, 2H), 1,59-1,48 (m, 2H), 0,95 (t, 3H); CL-EM: 398,2 (M+1).



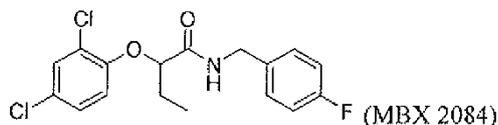
40 Perlas blancas; R_f 0,80 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 73-75°C; RMN 1H [300 MHz, $CDCl_3$]: δ 7,36 (d, 1H), 7,15 (dd, 1H), 6,80 (d, 1H), 6,71 (d, 1H), 6,64-6,62 (m, 3H), 5,94 (s, 2H), 4,43 (d, 1H), 4,36-4,33 (m, 2H), 2,38-2,32 (m, 1H), 1,10 (s, 3H), 1,07 (s, 3H); CL-EM: 396,1 (M+1).



ES 2 672 719 T3

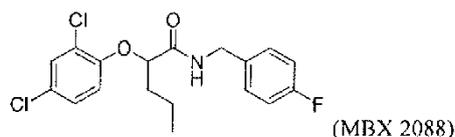
Perlas de color amarillo pálido; R_f 0,71 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 159-161°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 8,00 (d, 1H), 7,67 (d, 1H), 6,74-6,66 (m, 3H), 6,57 (br s, 1H), 5,94 (s, 2H), 5,45-5,42 (m, 1H), 4,38 (d, 2H), 2,12-2,02 (m, 1H), 1,01 (t, 3H); CL-EM: 405,0 (M+Na).

5



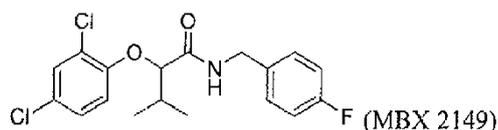
Cristales blancos; R_f 0,65 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 108-109°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,37 (d, 1H), 7,20-7,15 (m, 3H), 7,02-6,95 (m, 2H), 6,90 (br s, 1H), 6,82 (d, 1H), 4,62 (t, 1H), 4,51-4,34 (m, 2H), 2,08-1,99 (m, 2H), 1,04 (t, 3H); CL-EM: 358,3 (M+1).

10



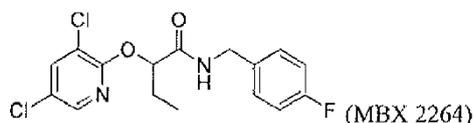
polvos de color blanco amarillento; R_f 0,72 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 119-121°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,37 (d, 1H), 7,18-7,13 (m, 3H), 7,02-6,95 (m, 2H), 6,84-6,80 (m, 2H), 4,64 (t, 1H), 4,42 (d, 2H), 2,01-1,93 (m, 2H), 1,57-1,46 (m, 2H + H_2O), 0,95 (t, 3H); CL-EM: 372,4 (M+1).

15



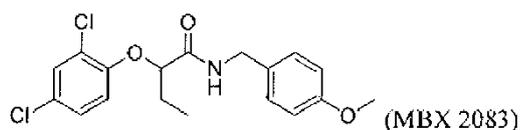
Cristales de color naranja; R_f 0,80 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 143-146°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,36 (d, 1H), 7,17-7,10 (m, 3H), 7,01-6,94 (m, 2H), 6,80 (d, 2H), 6,72 (br s, 1H), 4,49-4,34 (m, 3H), 2,39-2,31 (m, 1H), 1,09 (s, 3H), 1,07 (s, 3H); CL-EM: 370,1 (M+1).

20



Cristales de aguja blanquecinos; R_f 0,72 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 119-122°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,99 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 7,21-7,17 (m, 2H), 7,03-6,95 (m, 2H), 6,65 (br s, 1H), 5,46 (t, 1H), 4,45 (d, 2H), 2,13-2,02 (m, 2H), 1,01 (t, 3H); CL-EM: 379,0 (M+Na).

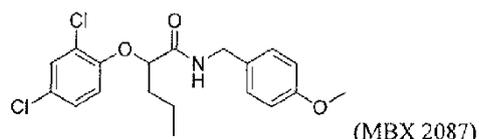
25



30

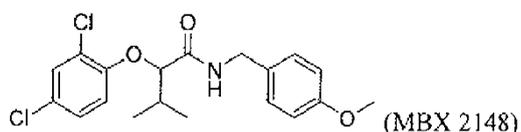
perlas blancas; R_f 0,66 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 85-88°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,36 (d, 1H), 7,18-7,10 (m, 3H), 6,85-6,81 (m, 4H), 4,61 (t, 1H), 4,47-4,34 (m, 2H), 3,79 (s, 3H), 2,08-1,99 (m, 2H), 1,04 (t, 3H); CL-EM: 392,2 (M+Na).

35



Copos blancos/translúcidos; R_f 0,68 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 103-104°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,35 (d, 1H), 7,16 (dd, 1H), 7,10 (d, 2H), 6,85-6,80 (m, 3H), 6,76 (br s, 1H), 4,63 (t, 1H), 4,39 (d, 2H), 3,79 (s, 3H), 2,01-1,93 (m, 2H), 1,56-1,48 (m, 2H), 0,95 (t, 3H); CL-EM: 406,4 (M+Na).

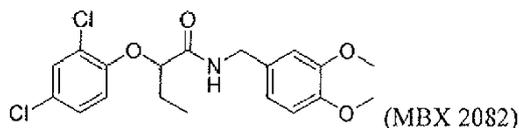
40



ES 2 672 719 T3

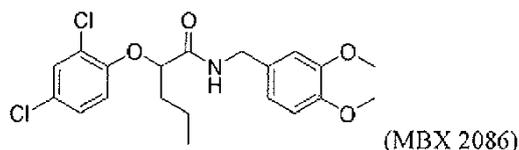
perlas blanquecinas; R_f 0,77 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 76-79°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,35 (d, 1H), 7,14 (dd, 1H), 7,09 (d, 1H), 6,82-6,78 (m, 3H), 6,63 (br s, 1H), 4,45-4,31 (m, 3H), 3,79 (s, 3H), 2,39-2,32 (m, 1H), 1,09 (s, 3H), 1,07 (s, 3H); CL-EM: 382,3 (M+1).

5



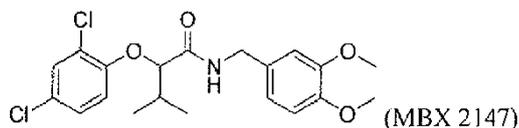
polvos blancos; R_f 0,49 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 117-118°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,37 (d, 1H), 7,16 (dd, 1H), 6,85-6,80 (m, 2H), 6,78-6,73 (m, 3H), 4,62 (t, 1H), 4,48-4,35 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 2,09-2,00 (m, 2H), 1,05 (t, 3H); CL-EM: 422,2 (M+Na).

10



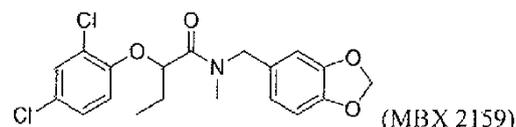
polvos blanquecinos; R_f 0,57 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 81-83°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,36 (d, 1H), 7,16 (dd, 1H), 6,84-6,71 (m, 5H), 4,64 (t, 1H), 4,40 (d, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 2,02-1,94 (m, 2H), 1,57-1,49 (m, 2H + H_2O), 0,95 (t, 3H); CL-EM: 436,2 (M+Na).

15



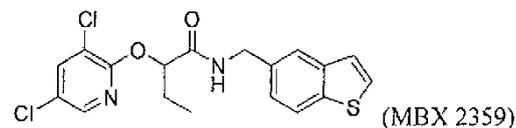
polvos blancos; R_f 0,70 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 108-110°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,36 (d, 1H), 7,15 (dd, 1H), 6,82-6,67 (m, 5H), 4,47-4,31 (m, 3H), 3,86 (s, 3H), 3,79 (s, 3H), 2,39-2,34 (m, 1H), 1,11 (s, 3H), 1,08 (s, 3H); CL-EM: 412,0 (M+1).

20



Aceite pegajoso de color amarillo pálido; R_f 0,71 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: NA; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,36 (d, 0,7H), 7,30 (d, 0,3H), 7,13 (dd, 1H), 6,89-6,81 (m, 1H), 6,69 (d, 1H), 6,61-6,57 (m, 1,4H), 6,48-6,41 (m, 0,5H), 5,94 (br s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,64 (br s, 0,5H), 4,44 (br s, 1,4H), 2,98 (s, 2,1H), 2,85 (s, 0,8H), 2,10-2,00 (m, 2H), 1,17-1,10 (m, 3H); CL-EM: 396,1 (M+1).

25



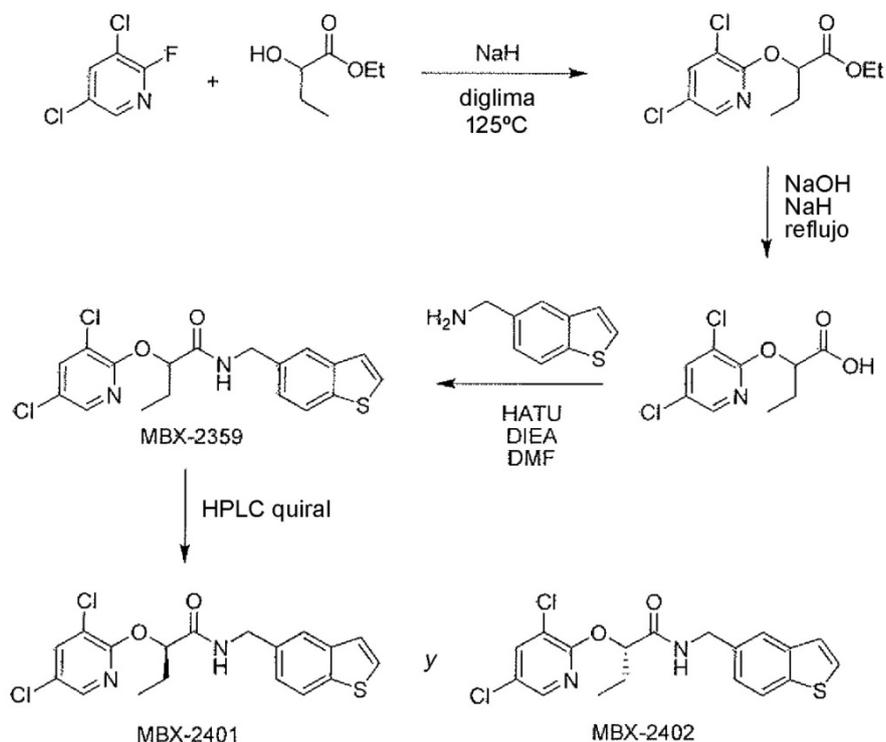
30

Cristales de aguja blanquecinas; R_f 0,73 (50% EtOAc/hexanos); p.f.: 125-127°C; RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3]: δ 7,99 (d, 1H), 7,80 (d, 1H), 7,65 (d, 2H), 7,45 (d, 1H), 7,26 (d, 1H + CHCl_3), 7,20 (dd, 1H), 6,69 (br s, 1H), 5,47 (t, 1H), 4,60 (dd, 2H), 2,12-2,06 (m, 2H), 1,03 (t, 3H); CL-EM: 394,8 (M+1).

35

Además, el Esquema 1, a continuación, proporciona un esquema de síntesis adecuado para las realizaciones preferentes, denominado MBX-2359, MBX-2401 y MBX-2402 (es decir, el racemato, los isómeros R y S, respectivamente, de N-(benzo[b]tiofén-5-ilmetil)-2-(3,5-dicloropiridin-2-iloxi)butanamida.

Esquema 1



La síntesis se inicia con el desplazamiento estimulado por base del sustituyente 2-fluoro de la 3,5-dicloro-2-fluoropiridina con 2-hidroxibutanoato de etilo. A continuación, tras la saponificación del éster resultante se lleva a cabo acoplamiento de péptidos utilizando benzo[b]tiofén-5-ilmetanamina, produciendo una mezcla racémica del compuesto diana MBX-2359. Seguidamente se utiliza HPLC quiral para separar los dos enantiómeros: MBX-2401 y MBX-2402 en sus formas enantioméricamente puras (por ejemplo >99%).

Los compuestos inhibidores de T3SS descritos en la presente memoria son compuestos orgánicos que también pueden ser sintetizados por encargo por proveedores comerciales tales como ChemBridge Corporation (San Diego, CA, USA), Life Chemicals Inc. (Burlington, ON, Canadá) y Timtec LLC (Newark, DE, USA).

A menos que se indique lo contrario, se entiende que la descripción de la utilización de un compuesto inhibidor de T3SS en una composición o método comprende además la realización en la que una combinación de dos o más compuestos inhibidores de T3SS se utiliza como fuente de actividad inhibidora de T3SS en una composición o método de la invención.

Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden un compuesto inhibidor de T3SS tal como se indica en la presente memoria o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como "ingrediente activo" y un portador (o "vehículo") farmacéuticamente aceptable que puede ser un compuesto líquido, sólido o semisólido. Un compuesto o composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a que el compuesto o composición no es incompatible biológicamente, químicamente, o de cualquier otro modo, con la química y el metabolismo corporales y además no afecta adversamente a la actividad del inhibidor de T3SS o cualquier otro componente que pueda encontrarse presente en una composición de manera que comprometa el beneficio terapéutico y/o preventivo deseado para un paciente. Entre los portadores farmacéuticamente aceptables útiles en la invención se incluyen los conocidos de la técnica de preparación de composiciones farmacéuticas y se incluyen, aunque sin limitación, agua, tampones del pH fisiológico, soluciones salinas fisiológicamente compatibles (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) y soluciones isotónicas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más excipientes, es decir, compuestos o composiciones que contribuyen o potencian una propiedad deseable en una composición aparte del ingrediente activo.

El experto en la materia de las composiciones farmacéuticas conocerá diversos aspectos de formulación de las mismas, incluyendo ejemplos de diversos excipientes, dosis, formas de administración, modos de administración y similares, y también se encuentran disponibles en textos farmacéuticos estándares, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, Alfonso R. Gennaro, ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, volúmenes 1 y 2, 19a edición, Alfonso R. Gennaro, ed. (Mack Publishing Co., Easton, PA 1995) u otros textos estándares sobre la preparación de composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en cualquiera de entre una diversidad de formas de administración particularmente adecuadas para un modo deseado de administración. Entre dichas formas de administración se incluyen, aunque sin limitación, soluciones acuosas, suspensiones, jarabes, elixires, tabletas, pastillas, píldoras, cápsulas, polvos, películas, supositorios y polvos, incluyendo formulaciones inhalables.

5 Preferentemente, la composición farmacéutica se encuentra en una forma de administración unitaria adecuada para la administración única de una dosis precisa, que puede ser una fracción o un múltiplo de una dosis que se calcula que produce una inhibición eficaz de T3SS.

10 Una composición que comprende un compuesto inhibidor de T3SS (o combinación de inhibidores de T3SS) descrita en la presente memoria puede presentar opcionalmente un segundo ingrediente activo (también denominado "segundo agente", "segundo agente activo") que proporciona una o más actividades terapéuticas o profilácticas deseables diferentes de la actividad inhibidora de T3SS. Dicho segundo agente útil en composiciones de la invención incluye, aunque sin limitación, un antibiótico, un anticuerpo, un agente antiviral, un agente anticáncer, un analgésico (por ejemplo un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), acetaminofeno, un opioide, un inhibidor de COX-2), un agente inmunoestimulante (por ejemplo, una citoquina o una molécula orgánica inmunoestimuladora sintética), una hormona (natural, sintética o semisintética), un estimulante del sistema nervioso central (SNC), un agente antiemético, un antihistamínico, una eritropoyetina, un agente estimulante del complemento, un sedante, un agente relajante muscular, un agente anestésico, un agente anticonvulsivo, un antidepresivo, un agente antipsicótico y combinaciones de los mismos.

25 Las composiciones farmacéuticas tal como se describen en la presente memoria pueden administrarse en el ser humano y otros animales de una manera similar a la utilización para otros agentes terapéuticos o profilácticos conocidos, y en particular tal como se utilizan para antibióticos terapéuticos aromáticos o multianillo. La dosis que debe administrarse en un individuo y el modo de administración dependerán de una diversidad de factores, entre ellos la edad, el peso, el sexo, la condición del paciente y factores genéticos, y en última instancia será decidida por el profesional sanitario cualificado responsable.

30 Entre las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos inhibidores de T3SS descritos en la presente memoria se incluyen los derivados de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables. Entre los ejemplos de ácidos adecuados se incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, pamoico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftalén-2-sulfónico, tánico, carboximetilcelulosa, poliláctico, poliglicólico y bencenosulfónico.

35 La invención puede contemplar además la "cuaternización" de cualesquiera grupos nitrogenados básicos de un compuesto descrito en la presente memoria, con la condición de que dicha cuaternización no destruya la capacidad del compuesto de inhibir T3SS. Dicha cuaternización puede resultar especialmente deseable para potenciar la solubilidad. Puede cuaternizarse cualquier nitrógeno básico con cualquiera de entre una diversidad de compuestos, incluyendo, aunque sin limitación, haluros de alquilo inferior (por ejemplo, C₁-C₄) (por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de metilo, de etilo, de propilo y de butilo), sulfatos de dialquilo (por ejemplo sulfatos de dimetilo, de dietilo, de dibutilo y de diamilo), haluros de cadena larga (por ejemplo, cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo) y haluros de aralquilo (por ejemplo bromuros de bencilo y de fenetilo).

45 Para las composiciones sólidas, pueden utilizarse portadores sólidos no tóxicos convencionales, incluyendo, aunque sin limitación, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración en un paciente mediante cualquiera de entre una diversidad de vías o modos parenterales y no parenterales. Entre dichas vías se incluyen, aunque sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraperitoneal, intracraneal, paravertebral, periarticular, periostal, subcutánea, intracutánea, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intratraqueal, sublingual, pulmonar, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implementado. Los reservorios implantados pueden funcionar por medios mecánicos, osmóticos u otros medios. En general y en particular, en el caso de que la administración se realice por vía intravenosa, intraarterial o intramuscular, puede proporcionarse una composición farmacéutica en forma de un bolo, como dos o más dosis separadas en el tiempo o como una infusión de flujo constante o no lineal.

60 Una composición farmacéutica puede encontrarse en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo como solución acuosa inyectable estéril o como suspensión oleaginoso. Dichas preparaciones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas de la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuadas (por ejemplo, polioxietileno 20, monooleato de sorbitán (también denominado "polisorbato 80"), TWEEN80, ICI Americas, Inc., Bridgewater, New Jersey) y agentes de suspensión. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden utilizarse para formulaciones inyectables se encuentran el manitol, el agua, la solución de Ringer, la solución isotónica de cloruro sódico y una solución de 1,3-butanodiol. Además, pueden utilizarse convencionalmente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Con este fin puede utilizarse cualquier aceite fijo suave,

incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados glicéridos, resultan útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en las versiones polioxietiladas de los mismos.

5 Puede formularse un inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria en cualquiera de entre una diversidad de formas de administración administrables por vía oral, incluyendo, aunque sin limitación, cápsulas, tabletas, comprimidos, píldoras, películas, soluciones acuosas, suspensiones oleaginosas, jarabes o elixires. En el caso de las tabletas para la utilización oral, entre los portadores utilizados comúnmente se incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en una forma de cápsula, entre los diluyentes útiles se incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Las cápsulas, tabletas, píldoras, películas, pastillas y comprimidos pueden formularse para la liberación retardada o sostenida.

15 Pueden prepararse tabletas u otras formulaciones sólidas o semisólidas que se desintegran o disuelven rápidamente en la boca del individuo. Dichas formulaciones de desintegración rápida o de disolución rápida pueden eliminar o reducir en gran medida la utilización de agua exógeno como ayuda para la deglución. Además, las formulaciones de desintegración rápida o de disolución rápida también resultan particularmente útiles en el tratamiento de individuos con dificultades para deglutir. Para dichas formulaciones, habitualmente resulta suficiente un volumen reducido de saliva, resultando en la desintegración de la tableta en la cavidad oral. El ingrediente activo (un inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria) seguidamente puede absorberse parcial o enteramente en la circulación de los vasos sanguíneos subyacentes a la mucosa oral (por ejemplo la mucosa sublingual y/o bucal) o puede deglutirse en forma de una solución que debe ser absorbida por el tracto gastrointestinal.

25 En el caso de que las suspensiones acuosas deban administrarse por vía oral, sea para la absorción por la mucosa oral o la absorción a través del sistema digestivo (estómago e intestinos), puede combinarse ventajosamente una composición que comprende un inhibidor de T3SS con agentes emulsionantes y/o de suspensión. Dichas composiciones pueden encontrarse en forma de una película soluble líquida, sólido soluble (por ejemplo una pastilla) o semisólida (masticable y digerible). Si se desea, dichas composiciones administrables por vía oral pueden contener además otro u otros excipientes, tales como un edulcorante, un agente saborizante, un agente enmascarador del sabor, un agente colorante y combinaciones de los mismos.

35 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de T3SS tal como se describen en la presente memoria también pueden formularse como supositorios para la administración vaginal o rectal. Dichas composiciones pueden prepararse mediante la mezcla de un compuesto inhibidor de T3SS tal como se indica en la presente memoria con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirán en el espacio corporal apropiado, liberando el inhibidor de T3SS y cualquier otro componente deseado de la composición. Entre los excipientes que resultan particularmente útiles en dichas composiciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la manteca de cacao, la cera de abeja y los polietilenglicoles.

40 La administración tópica de un inhibidor de T3SS puede resultar útil en el caso de que el tratamiento deseado implique áreas u órganos accesibles a la aplicación tópica, tal como la epidermis, las heridas superficiales o áreas que se han hecho accesibles durante la cirugía. Entre los portadores para la administración tópica de un inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, compuestos de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, una composición tópica que comprende un inhibidor de T3SS puede formularse con una loción o crema adecuada que contiene el inhibidor suspendido o disuelto en un portador adecuado para estimular la absorción del inhibidor por las capas dérmicas superiores sin penetración significativa en las capas dérmicas inferiores y vasculatura subyacente. Entre los portadores que resultan particularmente adecuados para la administración tópica se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. También puede formularse un inhibidor de T3SS para la administración tópica, tal como una gelatina, gel o emoliente. La administración tópica también puede llevarse a cabo mediante un parche dérmico.

55 El experto en el campo de las formulaciones tópicas y transdérmicas conoce que la selección y formulación de diversos ingredientes, tales como los intensificadores de la absorción, los emolientes y otros agentes, pueden proporcionar una composición que resultan particularmente adecuados para la administración tópica (es decir, que permanecen predominantemente sobre la superficie o capas dérmicas superiores con una absorción mínima o nula por las capas dérmicas inferiores y vasculatura subyacente) o la administración transdérmica (absorción a través de las capas dérmicas superiores y que penetra hasta las capas dérmicas inferiores y la vasculatura subyacente).

65 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de T3SS tal como se describe en la presente memoria pueden formularse para la administración nasal, en cuyo caso la absorción puede producirse a través de las membranas mucosas de los conductos nasales o de los pulmones. Dichos modos de administración típicamente requieren que la composición se proporcione en forma de unos polvos, solución o suspensión líquida, que seguidamente se mezcla con un gas (por ejemplo, aire, oxígeno, nitrógeno o una combinación de los mismos) de

manera que se genera un aerosol o suspensión de gotas o partículas. Las composiciones de polvos inhalables preferentemente utilizan un portador de polvos de baja irritación o no irritantes, tal como la melezitosa (melicitosa).

Dichas composiciones se preparan según técnicas bien conocidas de la técnica de la formulación farmacéutica y pueden prepararse en forma de soluciones en solución salina, utilizando alcohol bencílico u otros conservantes o promotores de la absorción adecuados para incrementar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/o otros agentes solubilizadores o dispersantes conocidos de la técnica. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de T3SS descrito en la presente memoria para la administración por los conductos nasales o pulmones puede resultar particularmente eficaz en el tratamiento de las infecciones pulmonares, tal como la neumonía adquirida intrahospitalaria (NAI).

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden envasarse de una diversidad de maneras apropiadas a la forma y modo de administración. Entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, viales, botellas, latas, paquetes, ampollas, cajas, envases flexibles, inhaladores y nebulizadores. Dichas composiciones pueden envasarse para una única administración o en múltiples administraciones a partir del mismo envase. Pueden proporcionarse kits que comprenden una composición preferentemente en forma de unos polvos secos o en forma liofilizada, que comprende un inhibidor de T3SS y preferentemente un diluyente apropiado, que se combina con la composición seca o liofilizada poco antes de la administración, tal como se explica en las instrucciones de utilización adjuntas. La composición farmacéutica también puede envasarse en jeringas prerellenas de un solo uso o en cartucho para autoinyectores e inyectores de presión sin aguja. El envasado multiuso puede requerir la adición de agentes antimicrobianos, tal como fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio, a concentración que impiden el crecimiento de bacterias, hongos y similares, pero que no resultan tóxicas al administrarlas en el paciente.

De acuerdo con las prácticas correctas de fabricación, utilizadas actualmente en la industria farmacéutica y que son bien conocidas por el experto en la materia, todos los componentes en contacto o que comprenden una composición farmacéutica deben ser estériles y someterse a ensayo periódicamente para esterilidad de acuerdo con las normas de la industria. Entre los métodos de esterilización se incluyen la ultrafiltración, el autoclavado, el calentamiento seco y húmedo, la exposición a gases, tales como el óxido de etileno, la exposición a líquidos, tales como agentes oxidantes, incluyendo el hipoclorito sódico (lejía), la exposición a radiación electromagnética de alta energía (por ejemplo la luz ultravioleta, los rayos x, los rayos gamma y la radiación ionizante). La elección de método de esterilización será realizada por el experto en la materia con el objetivo de realizar la esterilización más eficiente que no altere significativamente la función biológica deseada del inhibidor de T3SS u otro componente de la composición.

Resultarán evidentes realizaciones y características adicionales de la invención a partir de los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplo 1. Materiales y métodos para la caracterización de inhibidores de T3SS

Cepas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados para los ensayos se describen en la Tabla 1, posteriormente. Todas las cepas de *P. aeruginosa* eran derivados de PAO1 (Holloway et al., Microbiol. Rev., 43:73-102, 1979), PAK (Bradley D. E., Virology, 58:149-63, 1974), o PA14 (Rahme, et al., Science 268:1899-902, 1995). *E. coli* TOP10 (Invitrogen), *E. coli* DB3.1 (huésped GATEWAY®, Invitrogen), *E. coli* SM10 (de Lorenzo y Timmis, Methods Enzymol., 235:386-405, 1994) y *E. coli* S17-1 (ATCC 47055) fueron utilizadas como huéspedes para la clonación molecular. Se obtuvo medio de Luria-Bertani (LB) (líquido y agar) de Difco. Se complementó el LB con 30 µg/ml de gentamicina (LBG) con o sin isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y EGTA 5 mM (LBGI y LBGIE, respectivamente).

Tabla 1: cepas y plásmidos

Cepa	Genotipo/características	Referencia o fuente
<i>P. aeruginosa</i> :		
MDM852	PAO1::pGSV3-'exoT'-luxCDABE	(1)
MDM1355	PAO1 ΔpscC::pGSV3-'exoT'-luxCDABE	(1)
MDM973	PAK/pUCP24GW-lacI ^q -lacPO-exoS::blaM	(1)
MDM974	PAK ΔpscC/pUCP24GW-lacI ^q -lacPO-exoS::blaM	(1)
MDM1156	PAO-LAC/pUCP24GW-lacPO-luxCDABE	(1)
PAKΔC	PAK ΔpscC; defectivo en T3SS	(2)
PAKΔS	PAK ΔexoS; secreta ExoT como su único efector de T3SS citotóxico	(2)
PAKΔSTY ^{exoU}	PAK ΔexoS::miniCTX-exoU-spcU; secreta ExoU como su único efector de T3SS citotóxico	(2)
PAKΔTY	PAK ΔexoT ΔexoY; secreta ExoS como su único efector de T3SS	(2)

MDM1387	PA14 <i>xcpQ</i> ::MrT7; (aka, PAMr_nr_mas_02_2:H7] defectivo en secreción de tpo II	(3)
<i>Y. pestis</i> :		
JG153/pMM85	KIM Δ <i>pgm</i> pPCP1 ⁻ pCD1 ⁺ /pHSG576 <i>yopE</i> :: <i>blaM</i>	(4,5)
<p>(1) Aiello, et al., Antimicrob. Agents Chemother., 54:1988-99, 2010. (2) Lee et al., Infect. Immun. 73:1695-705, 2005. (3) Liberati et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 103:2833-8, 2008). (4) Marketon et al., Science 309:1739-41, 2005. (5) Pan et al., Antimicrob. Agents Chemother. 53:385-92, 2009. La cepa informadora de <i>Y. pestis</i> fue amablemente proporcionada por el Dr. Jon Goguen (U. Massachusetts Medical School). El plásmido pGSV3-Lux fue amablemente proporcionado por el Dr. Donalds Woods (U. Calgary).</p>		

PCR y cebadores.

5 Se diseñaron cebadores oligonucleótidos sintéticos (de Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, USA) utilizando la secuencia genómica publicada de *P. aeruginosa* (Stover et al., Nature 406:959-64, 2000) y la aplicación web PRIMER3 (Whitehead Institute). Los cebadores se utilizaron a una concentración de 10 μ M en amplificaciones de PCR con polimerasa FAILSAFE® (Epicentre), tampón G (Epicentre) y DMSO al 4% para moldes de ADN cromosómico de *P. aeruginosa*.

Tabla 2. Cebadores utilizados

nº	Nombre de cebador	Secuencia de cebador
1	exoT-F+EcoRI	TACTACGAATTCCTGACTCGCCGTTGGTAT (SEC ID nº 1)
2	exoT-R+EcoRI	CATTACGAATTCCTGACTCGCCGTTGGTAT (SEC ID nº 2)
3	exoT-out-F	TAGGGAAAGTCCGCTGTTTT (SEC ID nº 3)
4	luxC-R	CCTGAGGTAGCCATTCATCC (SEC ID nº 4)
5	exoS-F+GWL	TACAAAAAAGCAGGCTAGGAAACAGACATGCATATTCAAT CGCTTCAG (SEC ID nº 5)
6	exoS(234)-R	ATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGACCGTCGGCCG ATACTCTGCT (SEC ID nº 6)
7	BLA-F	CACCCAGAAACGCTGGTCAA (SEC ID nº 7)
8	BLA-R+GWR	TACAAGAAAGCTGGGTTTGGTCTGACAGTTACCAATGC (SEC ID nº 8)
9	GW-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT (SEC ID nº 9)
10	GW-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT (SEC ID nº 10)
11	lux-F+GWL	TACAAAAAAGCAGGCTAGGAAACAGCTATGACGAAGAAG ATCAGTTTTATAATTAACGGCCAGGTTGAAATC (SEC ID nº 11)
12	lux-R+GWR	TACAAGAAAGCTGGGTGTTTCCAGTCACGACGTT (SEC ID nº 12)

10

Cribado de informador transcripcional luciferasa.

15 Se construyó una fusión transcripcional de operón de *Photorhabdus luminiscens lux* (*luxCDABE*) con el gen *exoT* (PA0044) mediante la inserción de un fragmento interno del gen *exoT* (712 pb generados mediante PCR con los cebadores *exoT-F+EcoRI* / *exoT-R+EcoRI* Tabla 2, anteriormente) en el plásmido informador pGSV3-lux-Gm cortado con *EcoRI* (Moore et al., Infect. Immun. 72:4172-87, 2004 tal como se indica en Moir et al., Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg. 102, Supl. 1:S152-62, 2008). El plásmido resultante se introdujo en células de *E. coli* SM10 y se transfirió a células de *P. aeruginosa* PAO1 y PA01 Δ *pscC* mediante conjugación, generando las cepas informadoras recombinantes MDM852 y MDM1355, respectivamente. La inserción en el locus cromosómico *exoT* se confirmó mediante PCR con un cebador exterior al locus clonado (*exoT-out-F*) y un cebador dentro del gen *luxC* (*luxC-R*) (Tabla 2, anteriormente).

20

25 Para los ensayos de inhibidor, se descongelaron placas maestras de compuesto a temperatura ambiente el día del ensayo y se añadió 1 μ l de compuesto (45 μ M conc. final de compuesto y DMSO al 1,8%) a placas de cribado negras opacas de 384 pocillos utilizando un robot de manipulación de líquidos Sciclone ALH 3000 (Caliper, Inc.) y un manipulador de microplacas Twisted II (Caliper, Inc.). Se cultivó la cepa informadora MDM852 a 37 °C en LBGI hasta DD₆₀₀ ~0,025 - 0,05, se transfirió a microplacas (50 μ l/pocillo) que contenían compuestos de ensayo y EGTA (5 μ l de solución madre 0,1 M), que se cubrió con una alfombra de sellado translúcida y permeable a los gases (Abgene, Inc., nº de cat. AB-0718). Los pocillos de control contenían células con T3SS totalmente inducido (EGTA y

25

DMSO, columnas 1 y 2) y T3SS no inducido (DMSO solo, columnas 23 y 24). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 300 min. Después, se midió la luminiscencia en un lector de microplacas Envision Multilabel (Perkin Elmer). El coeficiente de ventana de cribado, factor Z (ver Zhang et al., J. Biomol. Screen. 4:67-73, 1999), definido como la proporción entre la banda de separación de los controles positivo y negativo y el rango dinámico de la señal del ensayo, promedio de 0,7 para el cribado. Todos los datos del cribado, incluyendo la puntuación de Z y los datos de confirmación y validación, se almacenaron en una base de datos central (ChemOffice 11,0 de Cambridge Soft). Se confirmó que los compuestos eran puros >95% y que eran de la masa esperada según el análisis de CL-EM.

10 Ensayos de secreción de efecto β -lactamasa (β LA).

(a) *P. aeruginosa*. Se construyó un gen codificante de un apteína de fusión ExoS¹- β -lactamasa (β LA) que comprendía 234 codones de efector ExoS de *P. aeruginosa* fusionado con el gen β -lactamasa TEM-1 sin codones de señal de secreción) mediante corte y empalme mediante PCR de extensión por solapamiento (SOE-PCR, por sus siglas en inglés) (Choi y Schweizer, BMC Microbiol. 5:30, 2005) utilizando los cebadores 5 a 10 (Tabla 2, anteriormente), secuencia confirmada, clonado en el vector GATEWAY® pUCP24GW que contenía *lac*^R (ver Moir et al., J. Biomol. Screen. 12:855-64, 2007) después del promotor *lac* e introducido en *P. aeruginosa* mediante electroporación (ver Choi et al., J. Microbial Methods 64:391-7, 2006). Se detectó la secreción de las proteínas de fusión mediante la medición de la hidrólisis del sustrato de β -lactamasa cromogénico nitrocefina en microplacas de 96 pocillos transparentes en una modificación de un ensayo anteriormente descrito (Lee et al., Infect. Immun. 75:1089-98, 2007). Se subcultivaron células de la cepa MDM973 (PAK/pUCP24GW-*exoS::blaM*) en la mañana después del cultivo de durante la noche en LBG en 0,1 ml de LBGIE con o sin compuestos de ensayo y se cultivaron durante 15 min. Se añadió nitrocefina (100 μ g/ml, conc. Final) y se realizaron mediciones de A₄₉₀ cada minuto durante 15 min en un contador Victor³V 1420 Multilabel HTS (Perkin Elmer). Se calcularon las pendientes como medida relativa de la cantidad de proteína de fusión β LA efectora y eran absolutamente dependientes de la inducción con IPTG y EGTA y de la presencia de un gen *pscC* funcional en las células de *P. aeruginosa*. Las proporciones típicas de señal:fondo eran de 6 a 10.

(b) *Yersinia pestis*. Se cultivó la cepa atenuada de *Y. pestis* JG 153 (obsequio de Jon Goguen, U. of Massachusetts Medical School, Worcester, MA) portadora del plásmido pMM85 (*yopE::blaM*) en LB +20 μ g/ml de cloranfenicol a 30°C para evitar la inducción de T3SS y la pérdida del plásmido pCD1 codificante de T3SS. Para inducir T3SS, las células se trasladaron de 30°C a 37°C y se añadió EGTA a una concentración final de 1 mM. Se añadió cultivo celular (0,1 ml) a microplacas de 96 pocillos transparentes que contenían el compuesto de ensayo y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Se añadió nitrocefina (100 μ g/ml, conc. Final) y se realizaron mediciones de A₄₉₀ cada minuto durante 10 minutos en un lector de microplacas Envision Multilabel (Perkin Elmer). Se representaron gráficamente las pendientes vs. la concentración de inhibidor a fin de determinar los valores de IC₅₀.

Ensayo de inhibición de la bioluminiscencia de *luxCDABE* con promotor *lac*

40 Se amplificó el locus *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens* completo a partir de pGSV3-*lux* (Moore et al., Infect. Immun. 72:4172-87, 2004) mediante PCR con polimerasa Phusion (NEB, Beverly, MA) y los cebadores *lux-F+GWL* y *lux-R+GWR*, seguido de una segunda PCR con los cebadores *GW-attB1* y *GW-attB2*, proporcionando una secuencia de reconocimiento Gateway completa (Tabla 2). El producto de ~5,8 kb se purificó en gel y se insertó en pDONR221 con enzima BPCLonase® (Invitrogen, Inc.) y después se introdujo en pUCP24GW (Moir et al., J. Biomol. Screen. 12:855-64, 2007) con el enzima LRCLonase® (Invitrogen, Inc.). El plásmido pUCP24GW-*lacPO-luxCDABE* resultante se introdujo en la cepa *P. aeruginosa* PAO-LAC portadora de una copia cromosómica del represor de *lac*, *lacI*^Q, en el locus ϕ CTX (Hoang et al., Plasmid, 43:59-72, 2000) mediante electroporación, seleccionando para resistencia a la gentamicina (Choi et al., J. Microbiol. Methods 64:391-7, 2006). Para medir los efectos de los inhibidores de T3SS sobre la producción de luciferasa con promotor *lac*, se subcultivó la cepa MDM1156 resultante a partir de cultivos en LBG de durante la noche a una A₆₀₀ ~0,05 y se cultivaron durante 3 h en presencia o en ausencia de inhibidores a una concentración de 50 μ M. Se calculó el porcentaje de inhibición por compuestos de RLU producida por luciferasa con promotor *lac* vs. con promotor *exoT* y se utilizó como indicación de la selectividad de T3SS.

55 Detección de la inhibición de la secreción de ExoS mediada por T3SS en caldos de cultivo

La cepa *P. aeruginosa* PAK Δ TY, que produce ExoS pero no los efectores ExoT o ExoY de T3SS se cultivó durante la noche en LB y se trató esencialmente tal como se ha indicado anteriormente (Lee et al., Infect. Immun. 73:1695-705, 2005). Se subcultivaron las bacterias 1:100 en LB complementado con EGTA 5 mM y se cultivaron durante 3 h a 37°C con aireación en presencia o en ausencia de inhibidores a las concentraciones indicadas. Las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación a 3.220xg durante 15 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante de cultivo y se concentraron las proteínas mediante precipitación con ácido tricloroacético al 12,5% seguido de lavado con acetona o mediante ultrafiltración. Se resuspendieron las proteínas según la densidad de cultivo original (A₆₀₀), se separaron mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE al 12,5%) y se tiñeron con azul de Coomassie. Los archivos de imagen de geles teñidos se procesaron con el software ImageJ (versión 1.42q, NIH) restando el fondo, invirtiendo la imagen e integrando la densidad de cada banda.

Inhibición de la eliminación de las células CHO por *P. aeruginosa* dependiente de ExoU

El rescate de las células CHO de la citotoxicidad mediada por T3SS de la proteína efectora translocada ExoU se midió utilizando un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) tal como se ha informado anteriormente (Lee et al., Infect. Immun. 73:1695-705, 2005) excepto en que la infección por *P. aeruginosa* se llevó a cabo durante 2 h en ausencia de gentamicina. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad (% de liberación de LDH) respecto a la del control no infectado, que se fijó en 0% de liberación de LDH, y la de células infectadas por *P. aeruginosa* no protegida por el compuesto de ensayo (liberación de 100% de LDH). La LDH liberada a partir de las células infectadas no protegidas alcanzó por lo menos 80% del valor obtenido de la lisis completa con Triton X-100 al 1% en el marco temporal de 2 h del presente experimento. Se utilizó pseudolipasa, que actúa mediante inhibición directa de la fosfolipasa ExoU, como inhibidor de control (Lee et al., Infect. Immun. 75:1089-98, 2007).

Ensayos de proyección de gentamicina de la internalización bacteriana.

El presente ensayo es una modificación de un método previamente publicado de Ha y Jin, Infect. Immun. 69:4398-406, 2001). Se sembró un total de 2×10^5 células HeLa en cada pocillo de una placa de 12 pocillos que contenía 2 ml en cada pocillo de MEM complementado con FCS al 10% y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 24 h. Tras dos lavados con PBS, se añadió 1 ml de MEM que contenía FCS al 1% a las células HeLa. Se añadió el compuesto de ensayo a la mitad de las células a una concentración final de 50 µM (DMSO al 0,2%, final). Las cepas de *P. aeruginosa* PAKΔC (control negativo) y PAKΔS (control positivo) se cultivaron durante la noche en medio LB a 37°C bajo agitación, se diluyeron 1:1.000 por la mañana y se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de 0,3 (~10⁸ células/ml). Se lavaron las bacterias en PBS, se resuspendieron en 1 ml de MEM y se añadieron a las células HeLa a una multiplicidad de infección (MDI) de 10 en presencia o en ausencia del compuesto de ensayo. Las células HeLa infectadas se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 2 h. Tras dos lavados con PBS, se añadió 1 ml de MEM que contenía 50 µg/ml de gentamicina y las células se incubaron durante 2 h adicionales. Tras tres lavados con PBS, las células se lisaron en PBS que contenía Triton X-100 al 0,2% y se sembraron las diluciones en placas de LB-agar para contar el número de bacterias internalizadas dentro de las células HeLa.

Ensayo de secreción de elastasa.

Se determinó el efecto de los compuestos de ensayo sobre la secreción de elastasa mediada por tipo II a partir de *P. aeruginosa* mediante una modificación de un método descrito anteriormente (Ohman et al., J. Bacteriol. 142:836-42, 1980). Se cultivaron células de *P. aeruginosa* PA 14 a partir de una densidad inicial de $A_{600} \sim 0,05$ durante 16 h hasta la saturación en LB en presencia o en ausencia de compuesto de ensayo a una concentración de 50 µM. Se separaron las células mediante centrifugación en una microcentrífuga y se añadieron 0,2 ml de sobrenadante clarificado a 0,4 ml de una suspensión de elastina-rojo Congo (5 mg/ml, Sigma) en tampón que consistía en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, y CaCl₂ 1 mM, en tubos de microcentrifugador con tapón. Se incubaron los tubos a 37°C bajo agitación durante 6 h. A continuación, se añadieron 0,4 ml de tampón que consistía en fosfato sódico 0,7 M (pH 6,0), los tubos se centrifugaron en una microcentrífuga para eliminar la elastina-rojo Congo no digerido y se midió la A_{495} de los sobrenadantes clarificados. Las lecturas se normalizaron respecto a la densidad celular original (DO₆₀₀) y el % de inhibición de la secreción de elastasa respecto a PA14 no tratado (control de no inhibición) y a PA14 *xcpQ::MrT7* defectivo en secreción de tipo II no tratado. (Liberati et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:2833-8, cepa MDM1387, Tabla 1) (control de inhibición completo).

Ensayo de inhibición del crecimiento de *Chlamydia trachomatis*.

La inhibición del crecimiento de la cepa *Chlamydia trachomatis* L2 por los compuestos se midió en placas de 24 pocillos esencialmente según el método de Wolf et al., Mol. Microbiol. 61:1543-55, 2006. Se infectaron células Hep-2 en monocapa confluyente con L2 a una MDI de 0,5 y se trataron con los compuestos a las concentraciones indicadas durante 48 h. A continuación, se recolectaron los cultivos y se sonicaron. Se utilizaron lisados completos para el recuento de las unidades formadoras de inclusión (UFI) como medición de la producción de cuerpo elementales (CE) de progenie de *Chlamydia* mediante la resiembra en monocapas de HeLa frescas. Se incluyó un control no inhibido (sólo DMSO) y un control de inhibición completa (cloranfenicol, 200 µg/ml). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se llevó a cabo la determinación de la CMI mediante el método de microdilución de caldo descrito en las directrices del CLSI (anteriormente NCCLS) y se expresó en µM para facilitar las comparaciones con los valores de IC₅₀ y CC₅₀. Ver NCCLS, estándar aprobado M7-A4: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4a ed., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1997.

Determinación de la citotoxicidad en mamíferos.

Se determinó la concentración citotóxica (CC₅₀) del compuesto frente a células de mamífero en cultivo (HeLa, ATCC n° CCL-2, American Type Culture Collection, Manassas, VA) como concentración de compuesto que inhibía al 50%

la conversión de MTS en formazán. Ver Marshall et al., A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function, Growth Regul., 5:69-84, 1995. Brevemente, se sembraron placas de 96 pocillos con células HeLa a una densidad de 4×10^3 en cada pocillo en medio VP-SFM sin suero (Frazzati-Gallina et al., J. Biotechnol. 92:67-72, 2001), en presencia o en ausencia de diluciones en serie de un compuesto disuelto en DMSO. Tras la incubación durante 3 días a 37°C en VP-SFM, se midió la viabilidad celular con la tinción vital con la sal de tetrazolio bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, Wisconsin). Se determinaron los valores por duplicado utilizando diluciones de compuesto inhibidor entre 100 μM y 0,2 μM .

10 Ejemplo 2. Optimización del sustituyente alquilo en el centro asimétrico

Se sintetizaron varios análogos del compuesto MBX-1641 y se determinó su nivel de inhibición de la secreción, traslocación y citotoxicidad mediada por T3SS. Se presentan los resultados en la Tabla 3.

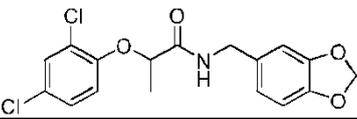
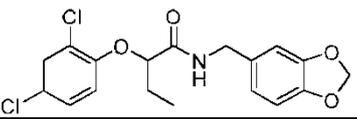
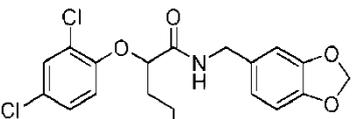
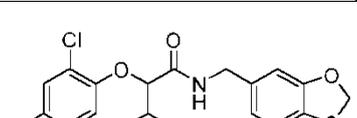
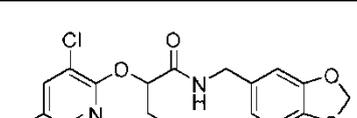
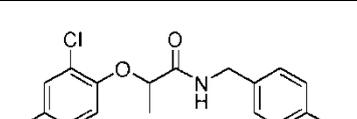
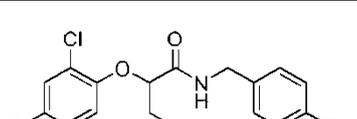
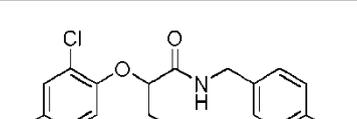
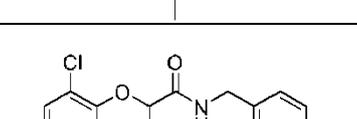
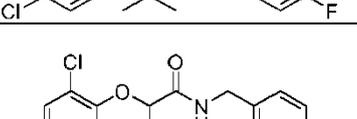
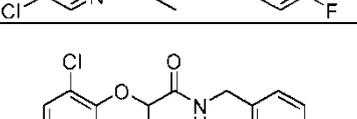
15 TABLA 3

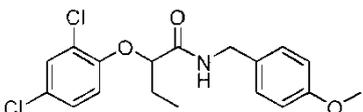
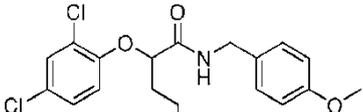
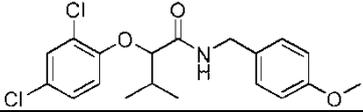
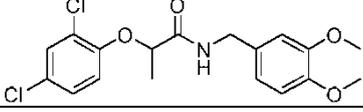
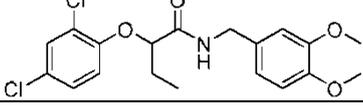
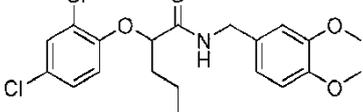
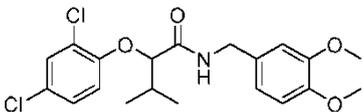
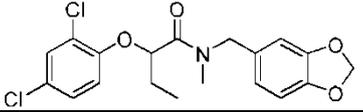
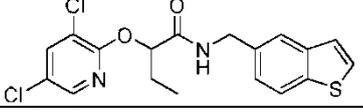
Comp. MBX	Estructura	Secreción IC ₅₀ (μM) ¹	Traslocación IC ₅₀ (μM) ²	CC ₅₀ (μM) ³	SI ⁴
*1641		12,5	15	100	8
2081		3,9	4,2	>200	>50
*2085		14% a 50 μM	n.d.	n.d.	--
*2146		100	n.d.	n.d.	--
n.d. =no determinado ¹ Concentración de inhibición semimáxima de la secreción mediada por T3SS (ensayo de proteína de fusión ExoS'- β LA) ² Concentración de inhibición semimáxima de traslocación mediada por T3SS (intoxicación por ExoU de células CHO) ³ Concentración de inhibición semimáxima de citotoxicidad de HeLa en medio libre de suero ⁴ Índice de selectividad (CC ₅₀ /IC ₅₀ de secreción) *Indica compuesto fuera del alcance según las reivindicaciones					

20 Los presentes estudios preliminares confirmaron que la alteración de la estructura de la acetamida de metilo en cualquier punto de la estructura presentaba la capacidad de modificar drásticamente el rendimiento de inhibición de T3SS de los compuestos, en particular la sustitución en el carbono α , en donde la alteración de metilo a etilo condujo a un incremento de más de 3 veces en la potencia de la inhibición de tanto la secreción mediada por T3SS como la traslocación mediada por T3SS. Ver la fig. 1.

25 Se sintetizaron y sometieron a ensayo análogos adicionales. Se presentan los resultados en la Tabla 4. Los valores reflejan 1 a 20 determinaciones separadas; se presentan valores promedio en donde se realizó más de una determinación.

TABLA 4

Comp. MBX	Estructura	Promedio IC ₅₀ de secreción (μM)	Promedio IC ₅₀ de traslocación (μM) ¹	Promedio CC ₅₀ (μM)	Punto de fusión (°C)
*1641		7,0	11,2	>100	120
2081		3,9	4,2	>200	112
*2085		14% a 50 μM	n.d.	n.d.	92
*2146		100	n.d.	n.d.	74
2263		2	17	>100	160
*1642		9,8	15	41	110
2084		4,3	7,4	45	108
*2088		9% a 50 μM	n.d.	n.d.	1120
*2149		1582,5	n.d.	n.d.	106
2264		2	30	85	120
*1940		12,4	22,5	n.d.	77

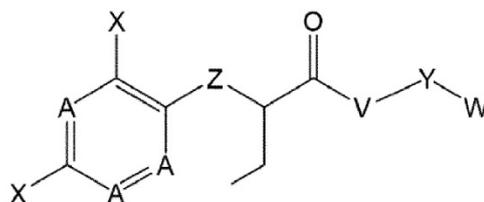
2083		8,1	29,3	n.d.	86
*2087		16% a 50 μ M	n.d.	n.d.	103
*2148		210	n.d.	n.d.	77
*1942		22,2	>100	n.d.	127
2082		16,3	>100	n.d.	117
*2086		18% a 50 μ M	n.d.	n.d.	82
*2147		94,9	>100	n.d.	109
2159		19,1	>100	n.d.	n.a.
2359		1,5	5,2	>100	126
n.d. = no determinado					
¹ Los compuestos que presentan actividad detectable en el ensayo de secreción de T3SS también se espera que presenten actividad en el ensayo de traslocación de T3SS aunque no pudo determinarse ningún valor de IC ₅₀ a partir del intervalo de concentraciones examinado en experimentos con valores indicados como >100 para el promedio. IC ₅₀ de traslocación.					
*Indica compuesto fuera del alcance según las reivindicaciones					

Los resultados de estos estudios subrayan el efecto inesperado de las alteraciones sobre el andamiaje de acetamida de metilo. Por ejemplo, mientras que la preparación de un análogo α -etilo de MBX-1641 (ver MBX-2081) condujo a un incremento de 3 a 4 veces de potencia como inhibidor de T3SS, la eliminación del α -metilo en un análogo desmetilo y la preparación de los análogos α -dimetilo, α -propilo y α -isopropilo condujo a un rendimiento significativamente inferior de secreción mediada por T3SS (ver MBX-2085, MBX-2146). La alteración de las fracciones de unión condujo a resultados divergentes de manera similar: la sustitución de la amida presentó un efecto negativo sobre la inhibición de la secreción mediada por T3SS (datos no mostrados), mientras que la sustitución de metilo o la sustitución de dimetilo en el conector de puente del grupo amida con el sustituyente arilo terminal condujo a valores de IC₅₀ que eran 34% y 29% inferiores, respectivamente (datos no mostrados). De manera similar, la alteración de la fracción de unión al carbono α condujo a resultados divergentes: la preparación de un análogo que presentaba un puente tio (-S-) en lugar de un puente oxo (-O-) condujo a valores de ICD₅₀ que eran

29% inferiores, mientras que la preparación de análogos que presentaban puentes amino (-NH-) o sulfonilo divalentes presentó un efecto adverso sobre los valores de IC₅₀ (datos no mostrados).

5 Aunque el efecto de las alteraciones sobre la estructura de andamiaje era difícil de predecir, el examen de los datos obtenidos en compuestos sintetizados individualmente indicó que los efectos de las alteraciones estructurales podrían ser aditivos. Por ejemplo, la consideración de la serie de compuestos MBX-1641, MBX-2155, MBX-2081, MBX-2263 y MBX-2264 mostró una reducción progresiva del valor de IC₅₀. Ver la fig. 2.

10 La consideración de los datos anteriormente proporcionados define un nuevo grupo de compuestos de estructura relacionada que resultan útiles como compuestos inhibidores de T3SS y presentan perfiles de potencia y/o toxicidad que los convierten en candidatos para la utilización como agentes terapéuticos. La nueva familia de compuestos inhibidores puede describirse mediante la fórmula I:

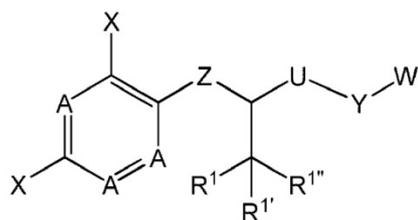


fórmula 1

15 en la que:

A es independientemente CH o N,
 X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,
 20 Z es O, S, NH; o NR³, en la que R³ es alquilo,
 R¹, R^{1'} y R^{1''} se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, halógeno, alquilo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio o ciano, en los que no más de dos de los radicales anteriormente indicados son hidrógenos,
 V es NR², O, o CR³R⁴,
 25 R², R³ y R⁴ son, independientemente, hidrógeno o alquilo,
 Y se selecciona de entre:

un radical alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, 30 alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, oxígeno, o NR⁵, en la que R⁵ es hidrógeno o alquilo,
 W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en los que el radical W puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, 35 ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y en los que dos sustituyentes cualesquiera pueden formar juntos una estructura de anillos aromáticos o no aromáticos fusionada con dicho radical arilo o heteroarilo W, en la que los sustituyentes presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente con Y o R², o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, en los que los sistemas de anillos pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos (es decir, uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados)).



fórmula II

45 en la que:

A es independientemente CH o N,
 X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,
 50 Z es O, S, NH; o NR³, en la que R³ es alquilo,
 R¹, R^{1'} y R^{1''} se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, halógeno, alquilo, hidroxilo, alcoxi, alquiltio o ciano, en los que no más de dos de los radicales anteriormente indicados son hidrógenos,

R^2 , R^3 y R^4 son, independientemente, hidrógeno o alquilo,

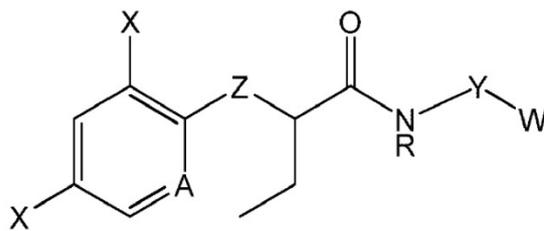
U es un anillo heterocíclico de 5 o 6 elementos divalentes seleccionado de entre oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, 1,2,3 triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,4-oxadiazol, 1,3,4-oxadiazol, 1,2-oxazina, 1,3-oxazina, pirimidina, piridazina y pirazina,

Y se selecciona de entre:

un radical alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, oxígeno, o NR^5 , en la que R^5 es hidrógeno o alquilo,

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, el radical W de los cuales puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y

en el que dos sustituyentes cualesquiera juntos pueden formar una estructura de anillo aromático o no aromático fusionado con dicho radical arilo o heteroarilo W, los sustituyentes del cual presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente con Y o R^2 , o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, los cuales pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos (es decir, uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados)).



fórmula III

en la que:

A es CH o N,

X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,

R es hidrógeno o metilo,

Y es un radical alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi,

Z es O, S, o NH o NR^3 , y

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en los que el radical W puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, hidroxilo, amino, carboxamido, carboxilo, ciano, sulfonamido, sulfonilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y en los que dos sustituyentes cualesquiera pueden formar juntos una estructura de anillos aromáticos o no aromáticos fusionada con dicho radical arilo o heteroarilo W, en la que los sustituyentes presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente con Y o R^2 , o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, en los que los sistemas de anillos pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos (es decir, uno o más anillos son aromáticos y uno o más anillos son no aromáticos (saturados)).

Se llevaron a cabo síntesis adicionales para preparar análogos conformacionalmente restringidos en los que se unió el nitrógeno de la acetamida directamente con una estructura de anillos fusionados o se incluyó en una estructura multianillo. Se muestran ejemplos de compuestos conformacionalmente restringidos en la Tabla 5.

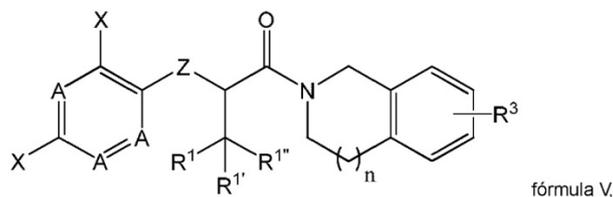
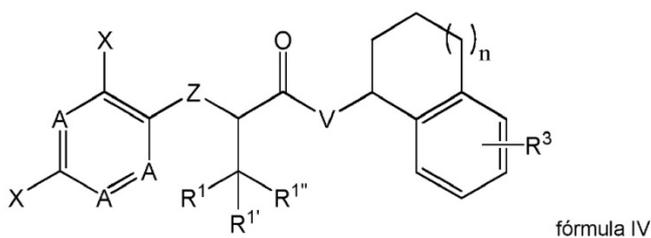
Tabla 5

Comp. MBX	Estructura
*2188	
*2189	
*2190	

*Indica compuesto fuera del alcance según las reivindicaciones

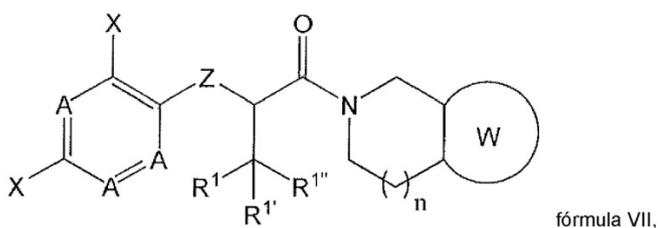
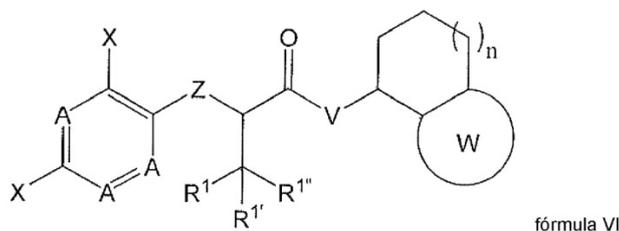
Estos resultados condujeron a la inclusión de estructuras adicionales en la familia de compuestos de fórmula I, por ejemplo compuestos de fórmulas IV y V:

5



10 en las que los valores A, X, Z, R¹, R^{1'}, R^{1''} y V son tal como se ha definido anteriormente y en las que n es 0 (que indica un anillo de cinco elementos), 1, 2 o 3, y R³ se selecciona de entre el grupo de hidrógeno, halo, hidroxilo, amino, carboxamido, carboxilo, ciano, sulfonamido, sulfonilo, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi.

15 En donde se incluyen valores alternativos de la fracción arilo "B", los compuestos de fórmulas IV y V pueden ilustrarse de la manera siguiente:



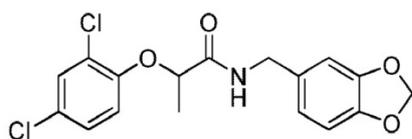
20

en donde los valores de A, X, Z, R^t, R^{1'}, R^{1''} y V son tal como se ha definido anteriormente para la fórmula I y en donde n es 0 (referido a un anillo de cinco elementos), 1, 2 o 3, y en donde W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos fusionado con el anillo carbocíclico unido con la fracción -NV- en la fórmula VI o fusionado con la fracción anillo heterocíclico que contiene nitrógeno en la fórmula VII y que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en los que el radical W puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, hidroxilo, amino, carboxamido, carboxilo, ciano, sulfonamido, sulfonilo, alquilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquilitio, ariloxi y heteroariloxi.

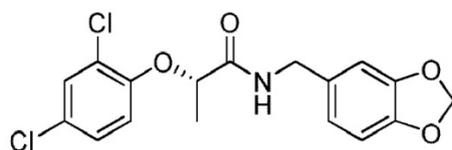
De esta manera, para incluir análogos conformacionalmente restringidos en la familia de inhibidores encontrada, en la fórmula I los valores de Y incluyen estructuras en las que Y es un anillo hidrocarburo cíclico que presenta 5 a 10 átomos de carbono que se fusiona con el radical W, o, alternativamente, Y y NV juntos forman un anillo heterocíclico que presenta 4 a 10 átomos de carbono fusionados con el radical W.

Ejemplo 3. Determinación de los isómeros activos e inactivos.

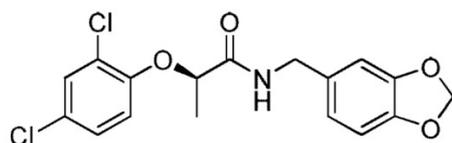
Los compuestos de fórmula I presentan un centro asimétrico (carbono α) y, por lo tanto, la síntesis de estos compuestos puede rendir una mezcla de isómeros ópticos (mezcla racémica) o isómeros R o S, dependiendo del método utilizado para la síntesis. La síntesis inicial de MBX-1641 proporcionó una mezcla racémica. Para determinar si ambos isómeros contribuían a las propiedades de inhibición de dichos compuestos, se sintetizaron los isómeros separados del compuesto MBX-1641 mediante el tratamiento de diclorofenol con (S)-etil-lactato disponible comercialmente (rindiendo el isómero R ópticamente puro de MBX-1641) o con (R)-etil-lactato disponible comercialmente (rindiendo el isómero S ópticamente puro de MBX-1641). La reacción del grupo hidroxilo del (S)-etil-lactato con diclorofenol bajo condiciones de Mitsunobu continúa con la inversión de la configuración del centro quiral, proporcionando el (R)-éster. La saponificación del éster, seguido del acoplamiento de péptidos, proporciona el compuesto MBX-1684 en forma de un enantiómero único, que es el isómero R de MBX-1641. De manera similar, el otro enantiómero (compuesto denominado MBX-1686, que es el isómero S de MBX-1641) se produjo de la misma manera, partiendo de (R)-etil-lactato.



MBX-1641 (compuesto fuera del alcance de las reivindicaciones)



MBX-1686 (compuesto fuera del alcance de las reivindicaciones)

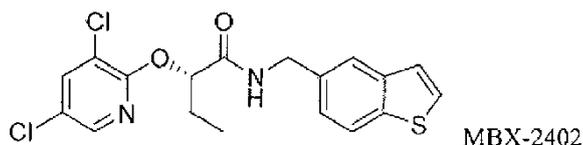
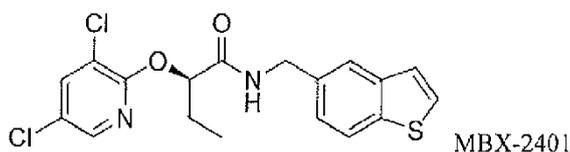
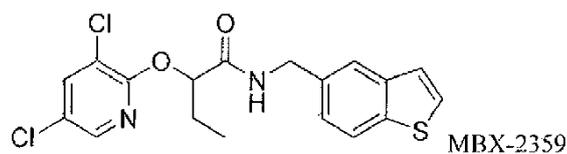


MBX-1684 (compuesto fuera del alcance de las reivindicaciones)

El racemato y cada uno de los enantiómeros se sometió a ensayo para la inhibición de la secreción mediada por T3SS de una proteína de fusión de toxina efectora- β -lactamasa (ExoS'- β LA) utilizando la cepa *P. aeruginosa* MDM973 (PAK/pUCP24GW-*lacI*^R-*lacPO*-*exoS*::*blaM*, Tabla 1).

Se muestran los resultados en la fig. 3.

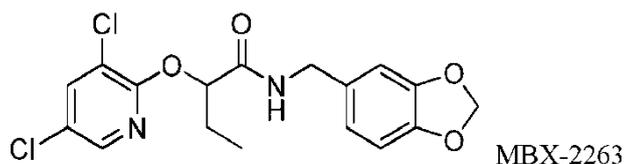
Se llevó a cabo una comparación similar utilizando los análogos α -etilo según la presente invención, a fin de investigar los efectos de isómero en dicha clase de compuestos. En referencia a la figura 4, se muestran los efectos del compuesto α -etilo MBX-2359 y sus enantiómeros R y S sobre la secreción de ExoS'- β LA de *P. aeruginosa*.



5

La dependencia de la concentración de MBX-2359 y sus dos estereoisómeros, MBX-2401 (enantiómero R) y MBX-2402 (enantiómero S) más un compuesto adicional, MBX-2263, se determinó a partir de la tasa de corte de la nitrocefina por el ExoS β LA secretado y se calculó como fracción de corte en ausencia de inhibidor. Tal como se muestra en la fig. 4, se muestra claramente la potente inhibición de la secreción por la mezcla racémica MBX-2359 (■), el enantiómero R MBX-2401 (□) y el otro análogo α -etilo, el compuesto MBX-2263 (racemato, ○), mientras que el enantiómero S, MBX-2402 (Δ), mostraba un efecto inhibidor pequeño.

10



15

Resulta evidente que las propiedades de inhibición de T3SS de los compuestos de fórmula I residen principalmente en el isómero R, aunque la mezcla racémica también es activa. Lo anterior nuevamente es consistente con el concepto de que los presentes compuestos presentan como diana un sitio de unión particular.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Microbiotix, Inc.

<120> INHIBIDORES DEL SISTEMA DE SECRECIÓN DE TIPO III BACTERIANO

25

<130> 22651 EP

<140> PCT/US 2012/046676

<141> 2012-07-13

30

<150> 61/507,259

<151> 2011-07-13

35

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 29

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

45

<400> 1

tactaegaat tcccaggaag caccgaagg 29

ES 2 672 719 T3

5
<210> 2
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

10
<400> 2
cattaegaat tcctgtact cgccgttggt at 32

15
<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

20
<400> 3
tagggaaagt cgcgtgttt 20

25
<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

30
<400> 4
cctgaggtag ccattcatcc 20

35
<210> 5
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

40
<400> 5
tacaaaaag caggctagga aacagacatg catattcaat cgcttcag 48

45
<210> 6
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

55
<400> 6
atctttact tcaccagcg ttctgggtg accgctggcc gatactctgc t 51

60
<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

65
<400> 7
caccagaaa cgctggtgaa 20

ES 2 672 719 T3

<210> 8
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5

<220>
 <223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

<400> 8
 10 tacaagaaag ctgggttgg tctgacagtt accaatgc 38

<210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

<400> 9
 20 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct 29

<210> 10
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

<400> 10
 30 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt 29

<210> 11
 <211> 72
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

<400> 11
 40 tacaaaaaag caggctagga aacagctatg acgaagaaga tcagttttat aattaacggc 60
 caggttgaaa tc 72

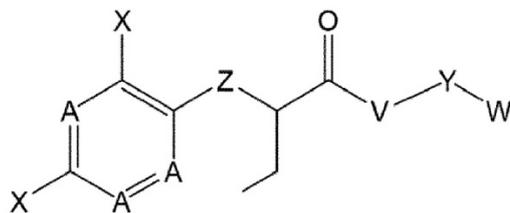
<210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleótido para la amplificación génica de *P. aeruginosa*

<400> 12
 50 tacaagaaag ctgggtggtt tccagtcac gacgtt 36
 55

REIVINDICACIONES

1. Compuesto inhibidor del sistema de secreción de tipo III bacteriano (T3SS) de fórmula I:



fórmula 1

en la que:

A es independientemente CH o N,
 X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,
 Z es O, S, NH; o NR^3 , en la que R^3 es alquilo,
 V es NR^2 , O, o CR^3R^4 ,
 R^2 , R^3 y R^4 son, independientemente, hidrógeno o alquilo,
 Y se selecciona de entre:

un radical alquilo, alquenilo o alquinilo de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi,

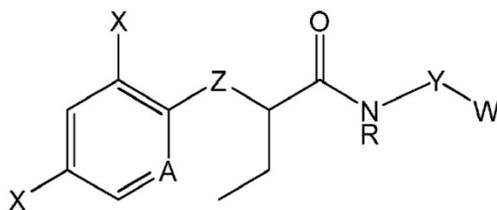
oxígeno,

o NR^5 , en la que R^5 es hidrógeno o alquilo,

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, el radical W de los cuales puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y

en el que dos sustituyentes cualesquiera pueden formar juntos una estructura de anillos aromáticos o no aromáticos fusionados con dicho radical arilo o heteroarilo W, en el que los sustituyentes observados en W además pueden unirse opcionalmente de manera covalente a Y o R^2 , o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, en los que los sistemas de anillos pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos.

2. Compuesto inhibidor de sistema de secreción de tipo III bacteriano (T3SS) según la reivindicación 1, en el que el compuesto presenta la fórmula III:



fórmula III

en la que:

A es CH o N,
 X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,
 R es hidrógeno o metilo,

Y es un radical alquilo, alquenilo o alquinilo de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi,

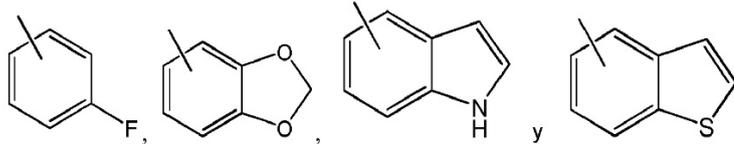
Z es O, S, o NH o NR^3 , y

W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, en los que el radical

5

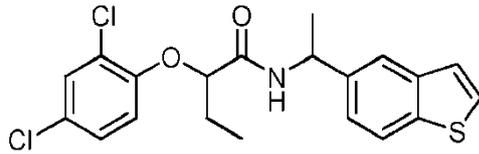
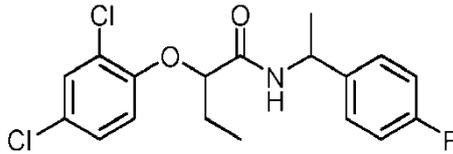
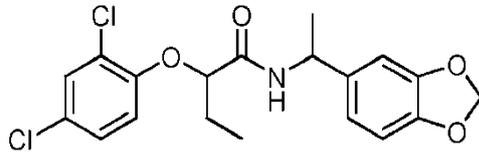
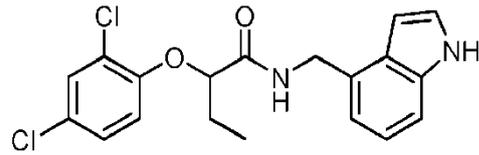
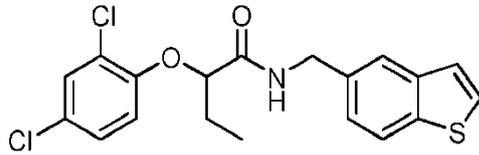
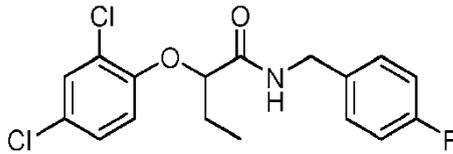
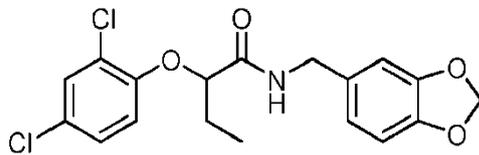
W puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, hidroxilo, amino, carboxamido, carboxilo, ciano, sulfonamido, sulfonilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y en los que dos sustituyentes cualesquiera pueden formar juntos una estructura de anillos aromáticos o no aromáticos fusionada con dicho radical arilo o heteroarilo W, en la que los sustituyentes presentes en W también pueden unirse opcionalmente de manera covalente con Y o R², o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, en los que los sistemas de anillos pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos.

10 3. Compuesto inhibidor de T3SS según la reivindicación 2, en la que W se selecciona de entre:



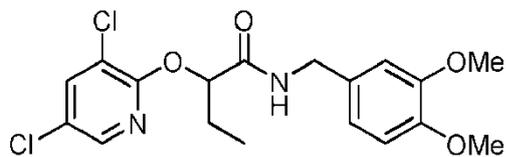
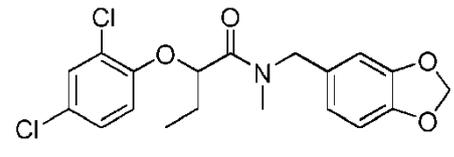
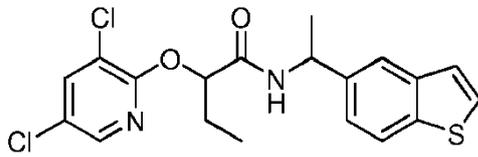
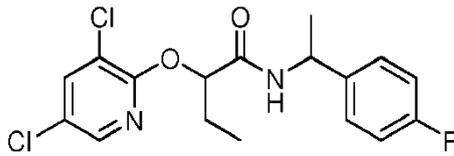
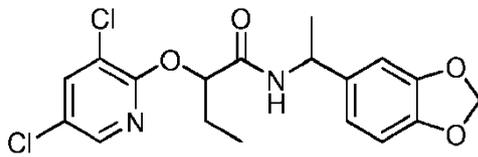
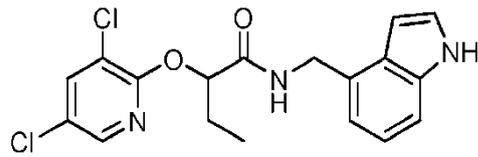
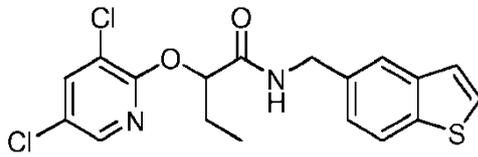
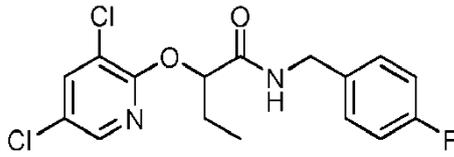
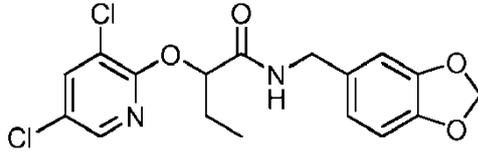
15

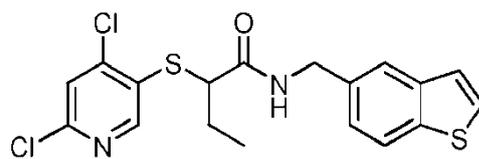
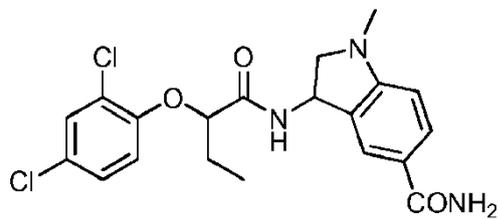
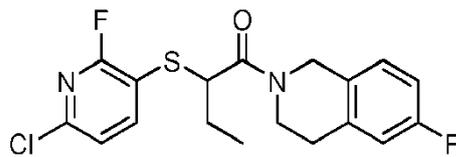
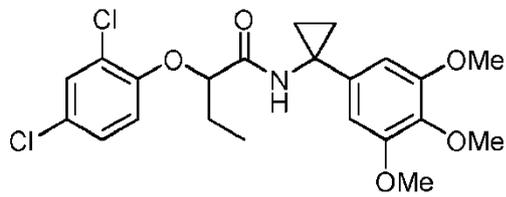
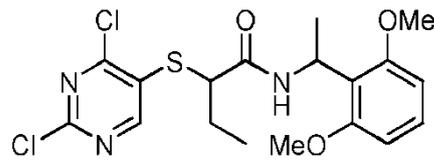
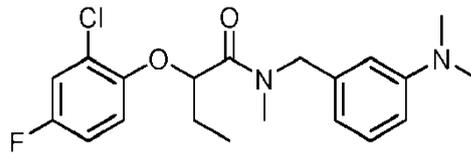
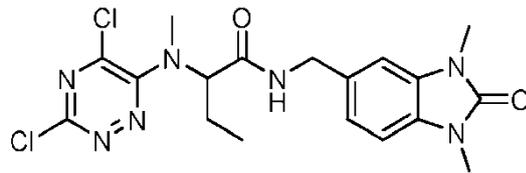
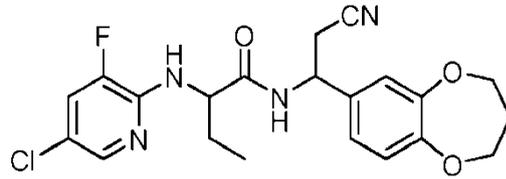
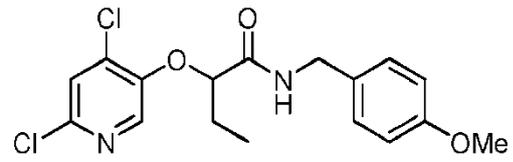
4. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de entre el grupo que consiste en:

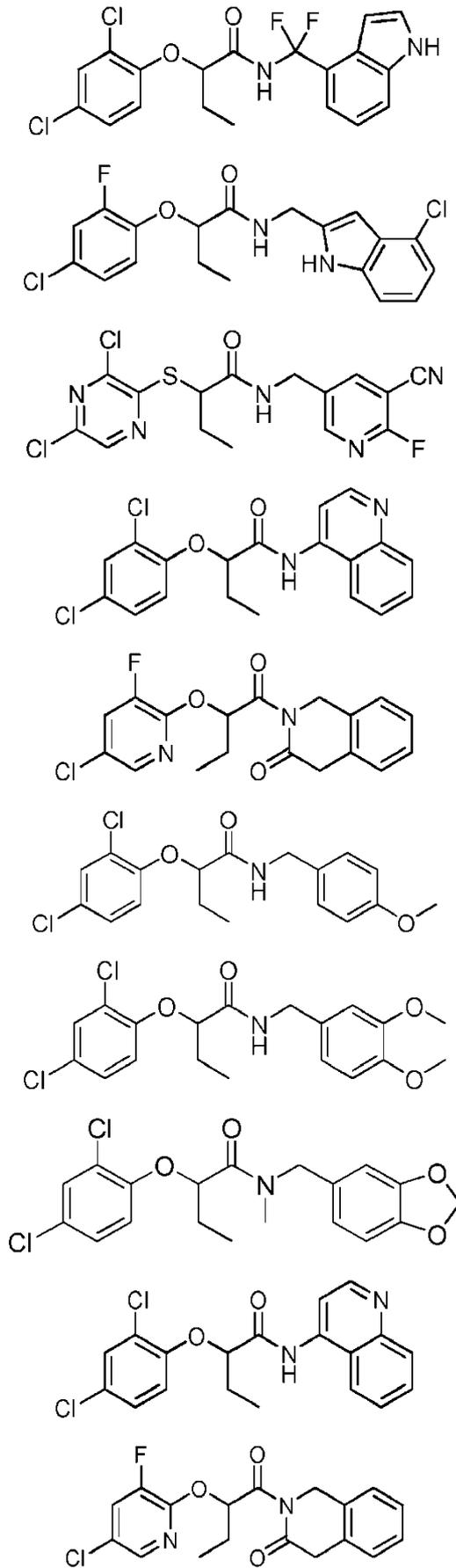


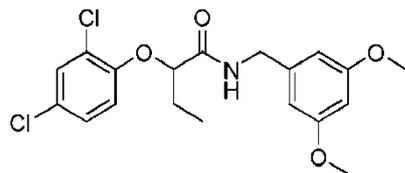
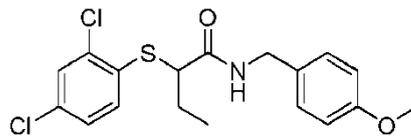
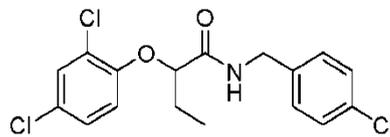
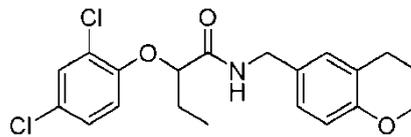
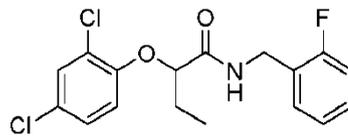
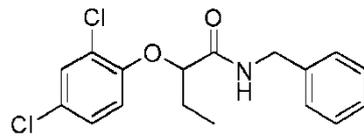
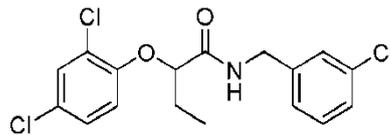
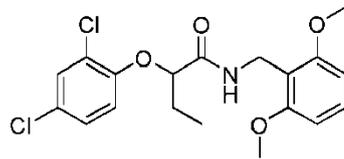
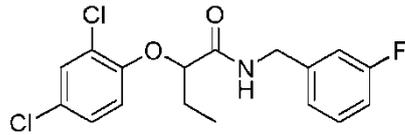
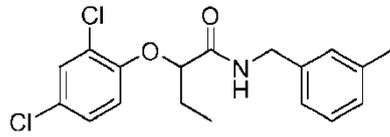
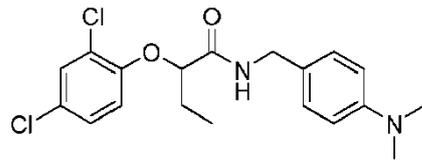
20

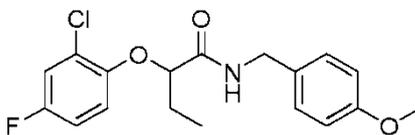
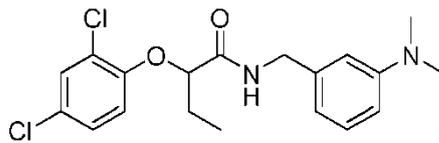
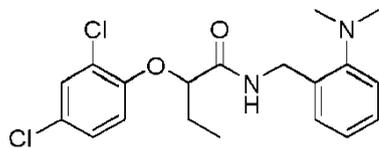
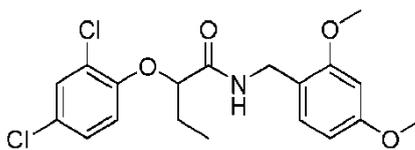
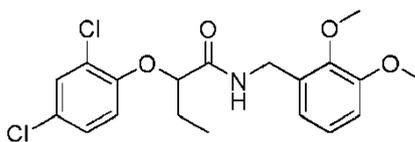
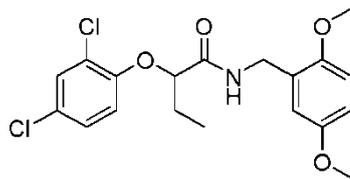
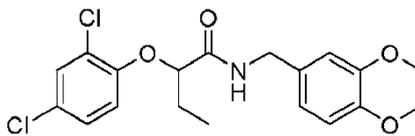
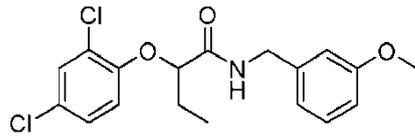
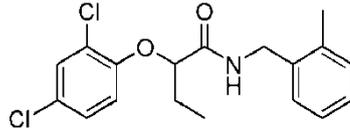
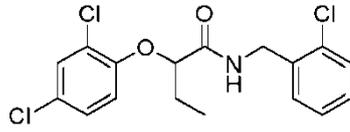
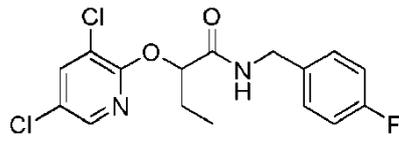
25

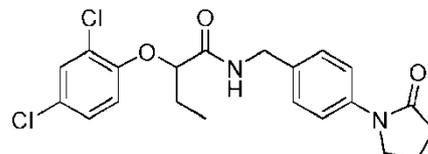
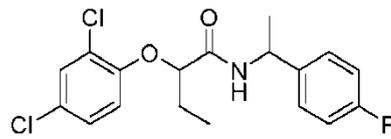
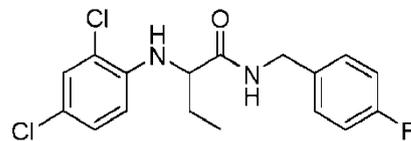
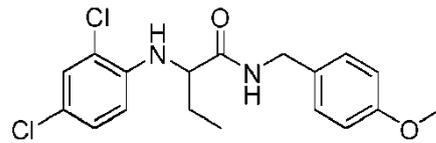
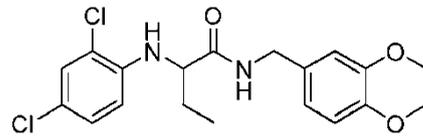
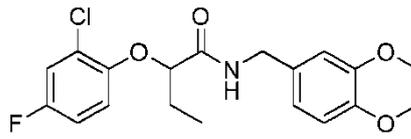
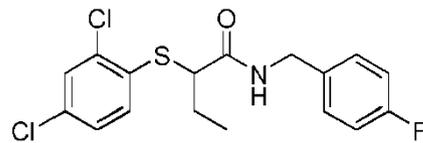
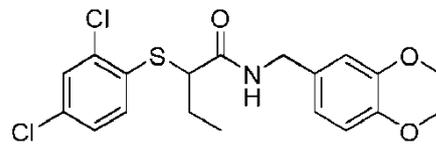
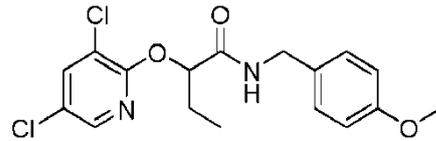
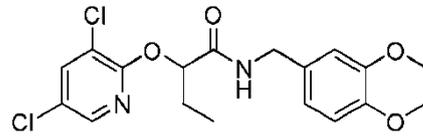
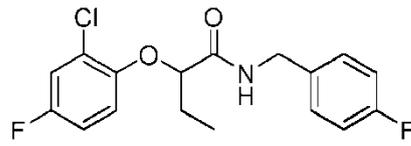


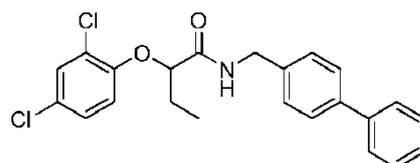
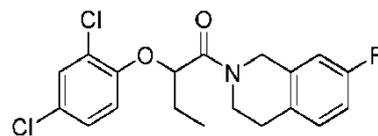
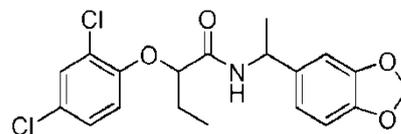
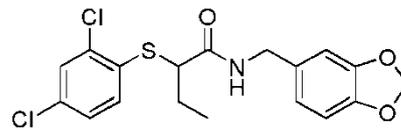
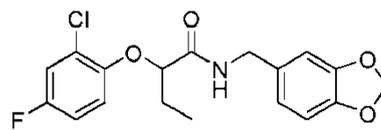
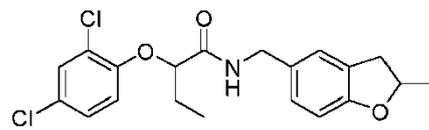
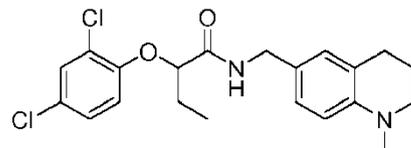
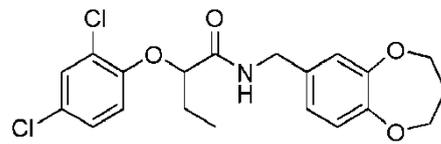
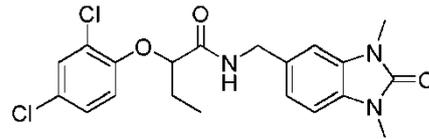
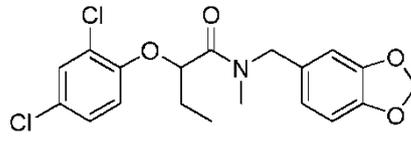
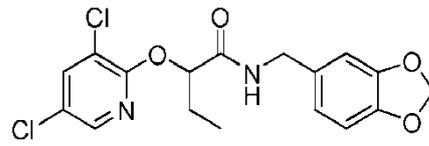


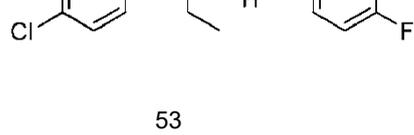
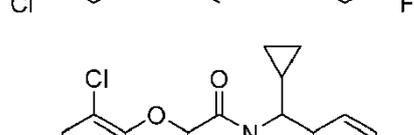
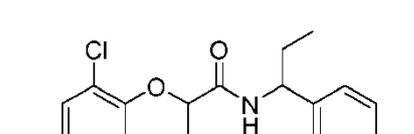
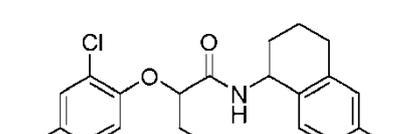
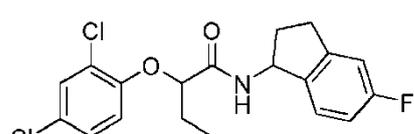
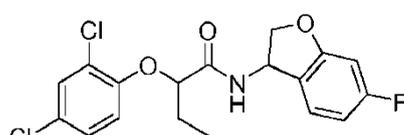
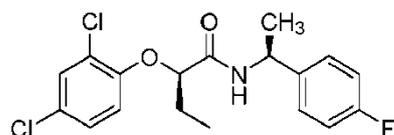
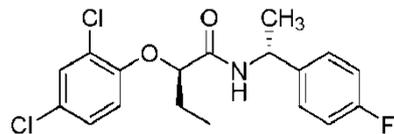
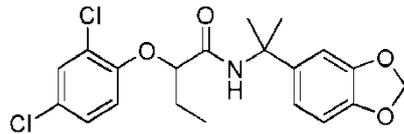
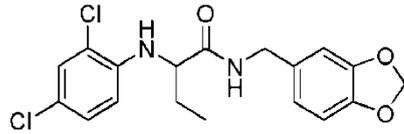
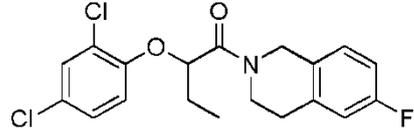
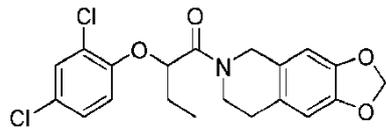




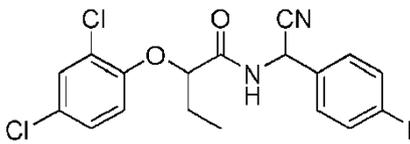
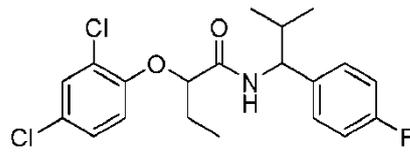
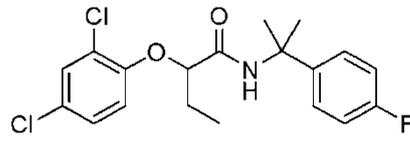
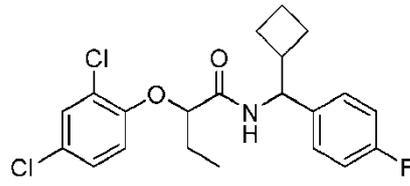




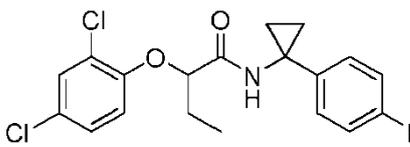
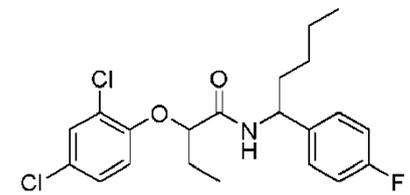
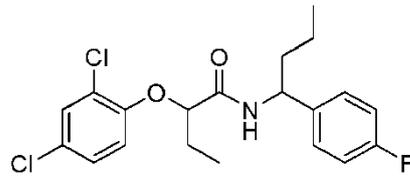




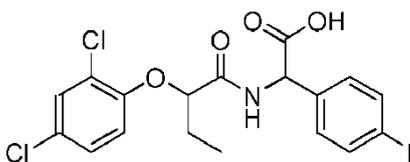
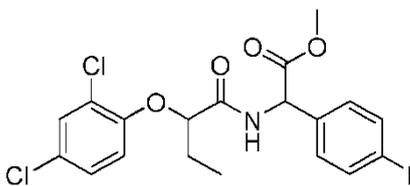
5



10



15

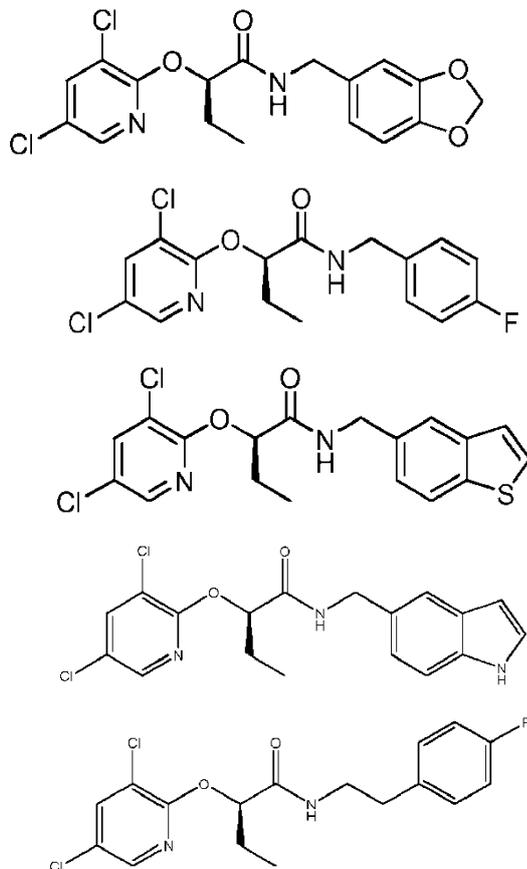


20

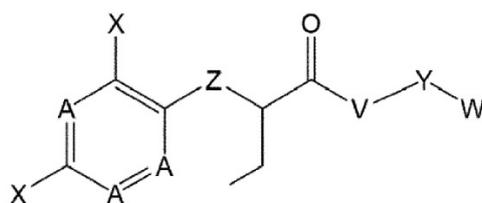
e isómeros particulares de cualquiera de los compuestos anteriormente indicados.

5. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, que comprende el isómero R en forma pura.

6. Compuesto según la reivindicación 4, que se selecciona de entre:



7. Compuesto inhibidor del sistema de secreción de tipo III bacteriano (T3SS) de fórmula I para la utilización como medicamento.



fórmula 1

en la que:

- A es independientemente CH o N,
- X se selecciona, independientemente, de entre hidrógeno o halógeno,
- Z es O, S, NH; o NR³, en la que R³ es alquilo,
- V es NR², O, o CR³R⁴,
- R², R³ y R⁴ son, independientemente, hidrógeno o alquilo,
- Y se selecciona de entre:

- un radical alquilo, alqueno o alquino de cadena lineal, ramificada o cíclica divalente de 1 a 6 átomos de carbono, que puede contener uno o más heteroátomos y que puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, oxígeno,
- o NR⁵, en la que R⁵ es hidrógeno o alquilo,
- W es un radical arilo o heteroarilo que forma un anillo de cinco o seis elementos que puede fusionarse adicionalmente con 1 a 3 anillos arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterocicloalquilo, el radical W de los cuales puede encontrarse no sustituido o sustituido con hasta cuatro sustituyentes

seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, amino, alquilamino, carboxilo, alcóxicarbonilo, carboxamido, acilamino, amidino, sulfonamido, aminosulfonilo, alquilsulfonilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, alquiltio, ariloxi y heteroariloxi, y

en el que dos sustituyentes cualesquiera pueden formar juntos una estructura de anillos aromáticos o no aromáticos fusionados con dicho radical arilo o heteroarilo W, en el que los sustituyentes observados en W además pueden unirse opcionalmente de manera covalente a Y o R², o ambos, formando sistemas de anillos heterocíclicos o carbocíclicos, en los que los sistemas de anillos pueden ser aromáticos, heteroaromáticos o parcialmente aromáticos.

- 5
- 10 8. Composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos inhibidores de T3SS según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, en la que dicho compuesto o compuestos inhibidores de T3SS son isómeros R en forma pura.
- 15 10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 para la utilización en el tratamiento de la infección por bacterias Gram-negativas.
11. Compuesto para la utilización según la reivindicación 10, en el que dicha infección bacteriana es una infección por *Salmonella* spp., *Shigella flexneri*, *Pseudomonas* spp., *Yersinia* spp., *Escherichia coli* enteropatógena y enteroinvasiva y *Chlamydia* spp.
- 20 12. Compuesto para la utilización según la reivindicación 10, en el que dicha infección bacteriana es una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis* o *Chlamydia trachomatis*.
- 25 13. Compuesto para la utilización según la reivindicación 10, que comprende administrar en un individuo infectado o expuesto a una bacteria Gram-negativa, una cantidad eficaz para inhibir la secreción de efecto mediada por T3SS.
- 30 14. Compuesto para la utilización según la reivindicación 13, en la que dicho individuo es un ser humano.
15. Compuesto para la utilización según la reivindicación 10 o 13, que comprende además la administración de un ingrediente activo adicional seleccionado de entre el grupo que consiste en un antibiótico, un anticuerpo, un agente antivírico, un agente anticáncer, un analgésico, un agente inmunoestimulante, una hormona natural, sintética o semisintética, un estimulante del sistema nervioso central, un agente antiemético, un antihistamínico, una eritropoyetina, un agente estimulante del complemento, un sedante, un agente relajante muscular, un agente anestésico, un agente anticonvulsivo, un antidepresivo, un agente antipsicótico y combinaciones de los mismos.
- 35
- 40

Fig. 1

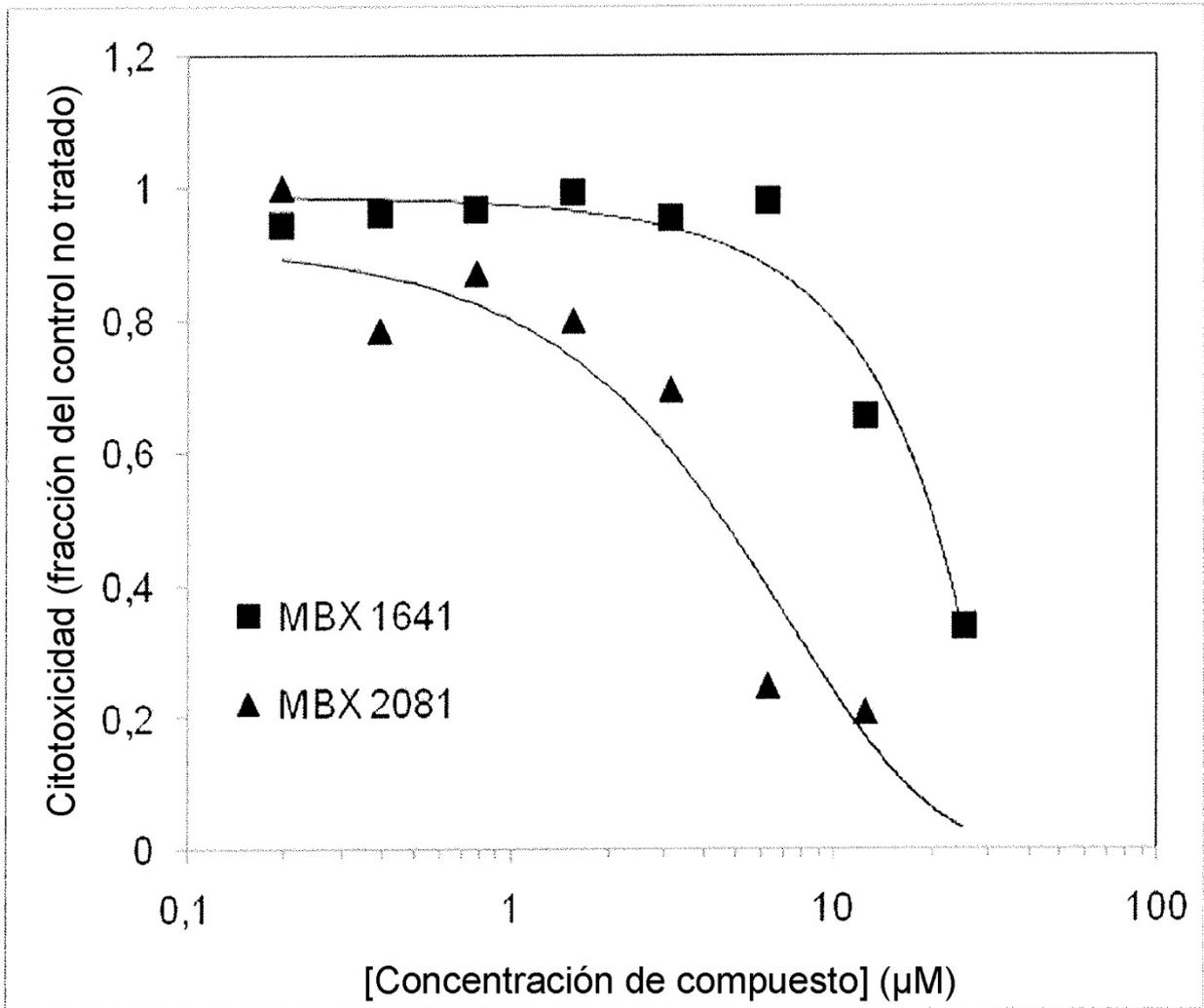


Fig. 2

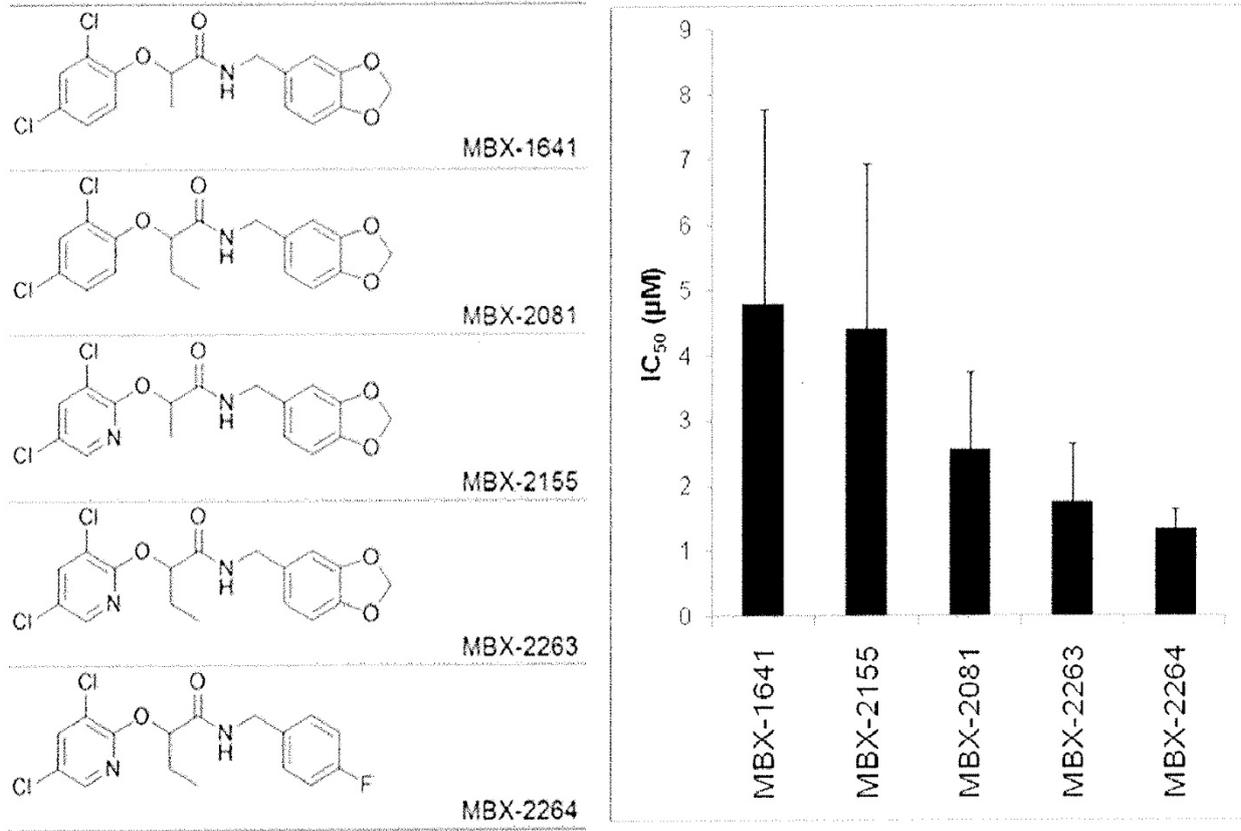
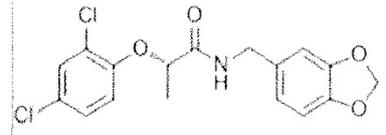
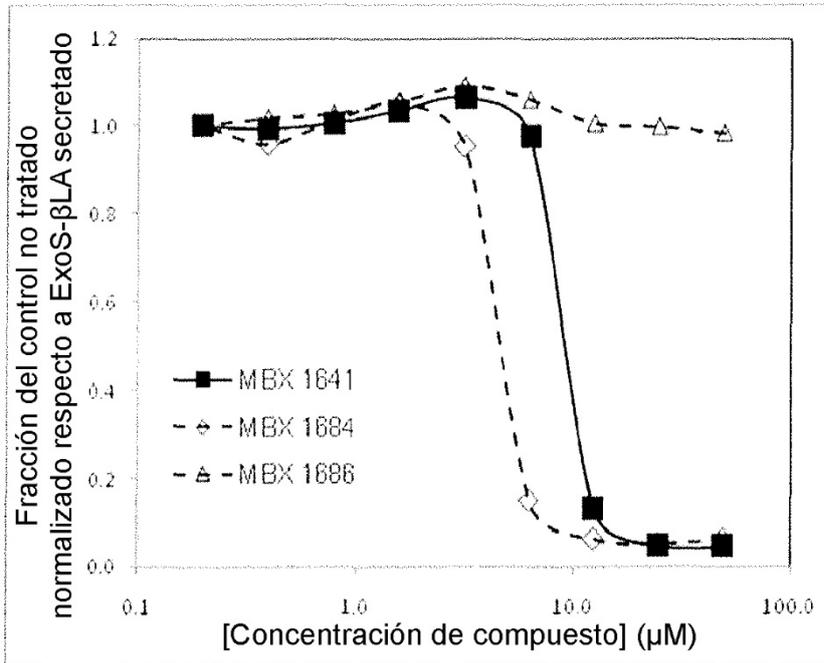
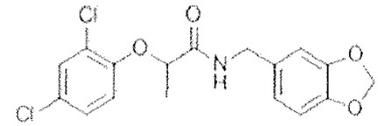


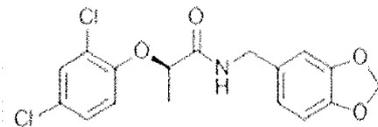
Fig. 3



MBX 1686: isómero S

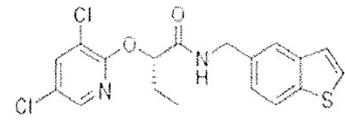
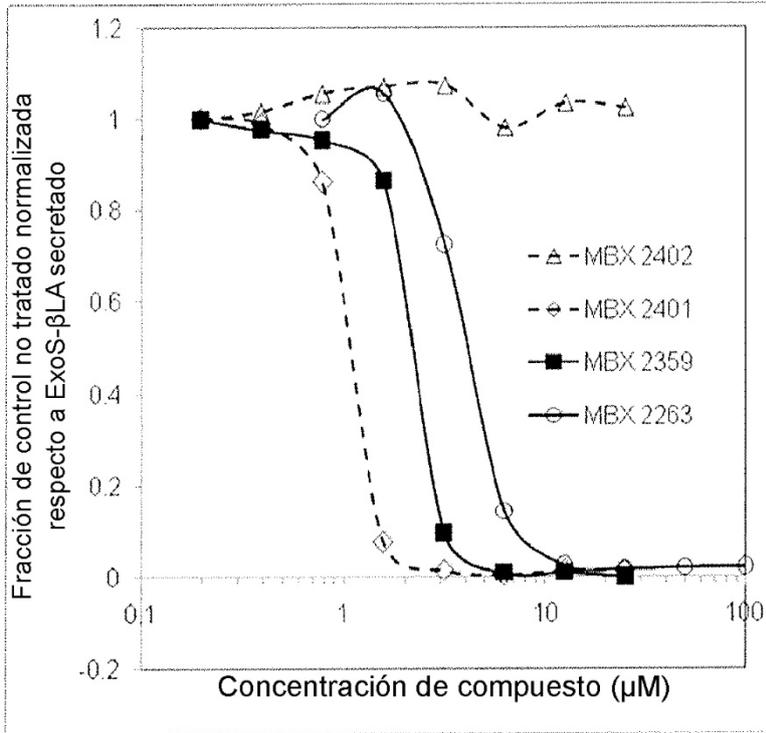


MBX 1641: mezcla racémica

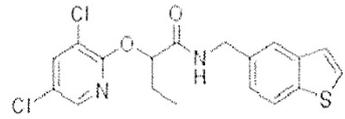


MBX 1684: isómero R

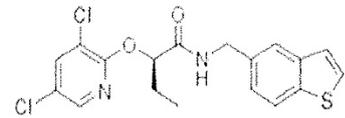
Fig. 4



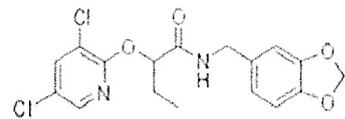
MBX 2402: isómero S



MBX 2359: mezcla racémica



MBX 2401: isómero R



MBX 2263: análogo metilendioxi