



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 355 950**

(51) Int. Cl.:
C07D 499/887 (2006.01)
A61K 31/431 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07734929 .8**
(96) Fecha de presentación : **18.06.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2044085**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2009**

(54) Título: **Profármacos de penem.**

(30) Prioridad: **28.06.2006 US 806000 P**
13.04.2007 US 911587 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

(73) Titular/es: **Pfizer Products Inc.**
Eastern Point Road
Groton, Connecticut 06340, US

(72) Inventor/es: **Brighty, Katherine, Elizabeth;**
Marfat, Anthony;
McLeod, Dale, Gordon y
O'Donnell, John, Paul

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 355 950 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

CAMPO Y ANTECEDENTES

La presente invención se refiere a antiinfecciosos, antibióticos, antibióticos orales y profármacos, en particular a profármacos de sulopenem, su preparación y uso.

5 El documento US 5013729 describe el sulopenem, que es un antibiótico de amplio espectro que puede denominarse ácido (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietil]-7-oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahidro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxílico. Véase también *J. Org. Chem.*, 57, 4352-61 (1992).

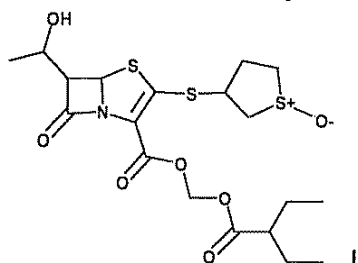
10 Otros penems y profármacos se describen por ejemplo en los documentos US 4952577; US 5506225; WO 1992/003444; y WO 2004/067532.

Se han realizado diversos estudios preclínicos y clínicos con sulopenem y ciertos profármacos del mismo. El sulopenem en sí no tiene una biodisponibilidad oral apreciable. El documento US 5013729 describe también profármacos de sulopenem, que incluyen el profármaco de pivaloiloximetilo de sulopenem (éster POM de sulopenem). Cuando se administró por vía oral en forma de una mezcla de dos estereoisómeros, se demostró que el
15 éster POM presentaba biodisponibilidad oral en seres humanos. Véase Foulds y cols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, páginas 665-671 (abril de 1991). Sin embargo, los profármacos de éster POM están asociados a la disminución de carnitina en los tejidos tras la hidrólisis y liberación de ácido piválico o ácido trimetilacético. Véase Brass, *Pharmacological*
20 *Reviews*, 54, 589-598 (2002).

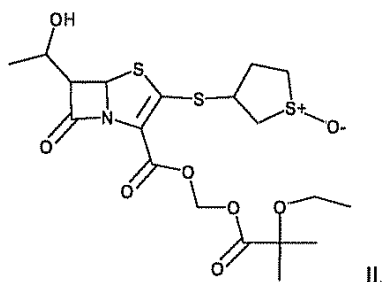
SUMARIO

La presente invención se refiere al deseo de nuevos profármacos de sulopenem que combinen uno o más de: exposición o biodisponibilidad oral elevadas, carencia de propensión a disminuir la carnitina en los tejidos, propiedades fisicoquímicas tales como cristalinidad, punto
25 de fusión, solubilidad en agua y permeabilidad, que sean favorablemente adecuadas para la formulación y uso farmacéuticos prácticos.

En algunos aspectos, la presente invención incluye los compuestos de la Fórmula I:



En otros aspectos, la presente invención incluye los compuestos de la fórmula II:



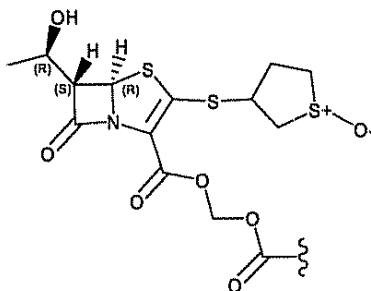
La invención incluye además las formulaciones y el uso de los compuestos para tratar o prevenir una infección bacteriana.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

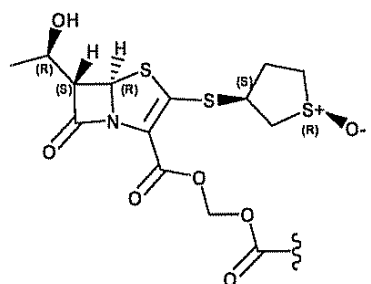
COMPUESTOS

La presente invención incluye los compuestos profármaco de las Fórmulas I y II, tal como se muestran y se describen anteriormente. Todos sus estereoisómeros y sus mezclas están contempladas e incluidas, tal como indican los dibujos anteriores que permiten y engloban tanto la configuración R como la S en los estereocentros.

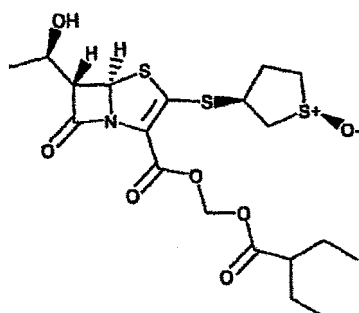
Una configuración preferida de los compuestos de las Fórmulas I y II es:



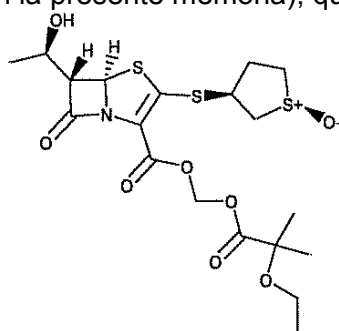
En particular, el resto oxotiolanilo preferiblemente presenta una configuración 1R,3S, tal como se muestra a continuación.



Por ejemplo, se proporciona: (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietil]-7oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahydro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxilato de (2-etil-1-oxobutoxi)metilo (Compuesto 1 en la presente memoria), que se representa a continuación:



Otro ejemplo proporciona: (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietil]-7-oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahydro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxilato de (2-etoxi-2-metil-1-oxopropoxi)metilo (Compuesto 2 en la presente memoria), que se representa a continuación:



5

Los profármacos de la presente invención pueden ser amorfos o pueden existir en diferentes formas cristalinas o polimorfos, que incluyen solvatos e hidratos. Los polimorfos de los profármacos forman parte de esta invención y pueden prepararse mediante cristalización de un profármaco de la presente invención en diversas condiciones. Los polimorfos pueden obtenerse también calentando o fundiendo un profármaco seguido de enfriamiento gradual o rápido. La presencia de polimorfos puede determinarse mediante espectroscopia de RMN con muestra sólida, espectroscopia IR, calorimetría de barrido diferencial, difracción de rayos X en polvo u otras técnicas similares. Así, el nombrar un compuesto *per se*, está abierto a sus polimorfos que incluyen moléculas de agua o disolventes asociadas a el.

15 PREPARACIÓN

Los profármacos de la presente invención pueden prepararse, por ejemplo, a partir del ácido libre de sulopenem de acuerdo con procedimientos conocidos tales como los que se describen en la presente memoria o en los documentos US 3951954; US 4234579; US 4287181; US 4452796; US 4342693; US 4348264; US 4416891; US 4457924; y US 5013729, .

20 USO

Los profármacos de esta invención pueden usarse para tratar una variedad de infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias tales como infecciones de las vías respiratorias, quirúrgicas, del sistema nervioso central, gastrointestinales, genitourinarias, ginecológicas, de la piel y los tejidos blandos y oculares, y la neumonía extrahospitalaria en

seres humanos. La actividad antibacteriana de los profármacos puede explotarse también ventajosamente para uso preventivo. Se prefiere la administración oral. Los datos de la actividad biológica se proporcionan a continuación.

La cantidad mínima de profármaco que se administra es una cantidad terapéuticamente eficaz mínima. La cantidad máxima de profármaco que se administra es aquella cantidad que es toxicológicamente aceptable. En algunas realizaciones, la cantidad de profármaco de sulopenem que se administra es aquella que mantendrá la concentración antibiótica en plasma de sulopenem por encima de la CIM₉₀ (concentración inhibidora mínima al 90%) (por ejemplo, aproximadamente 0,5 µg/ml o aproximadamente 1 µg/ml) de los patógenos infecciosos durante al menos aproximadamente el 30% (por ejemplo, al menos aproximadamente 3,6 horas para una administración dos veces al día o 2,4 horas para una administración de tres veces al día) del intervalo entre dosis. En algunas realizaciones, el nivel en sangre se mantiene en el nivel diana o superior al nivel diana durante al menos aproximadamente el 40% (por ejemplo, al menos aproximadamente 4,8 horas para la administración dos veces al día o 3,2 horas para la administración tres veces al día) del intervalo entre dosis.

En general, una dosis diaria del profármaco de sulopenem para adultos puede ser aproximadamente de 500 mgA (miligramos equivalentes de sulopenem) a aproximadamente 6 gA, o de aproximadamente 1 gA a aproximadamente 5 gA. Una posología del profármaco de sulopenem para adultos puede ser de aproximadamente 500 mgA a aproximadamente 1500 mgA administrados dos veces al día con intervalos de aproximadamente 12 horas. Una posología puede administrarse durante un período de aproximadamente una semana a aproximadamente dos semanas. Para ciertas infecciones, puede ser necesario o deseable usar dosis fuera de estos parámetros.

Una dosis diaria del profármaco de la presente invención puede administrarse habitualmente de 1 a 4 veces al día, normalmente en dosis iguales. En algunas realizaciones, la dosis del profármaco puede ser de aproximadamente 500 a aproximadamente 2500 mg dos veces al día o tres veces al día; de aproximadamente 800 mg a aproximadamente 1 g dos veces al día; o de aproximadamente 2 g dos veces al día o tres veces al día para infecciones más graves. En algunas realizaciones, la dosis puede ser de aproximadamente 7 a aproximadamente 25 mg/kg dos veces al día; de aproximadamente 17 a aproximadamente 45 mg/kg dos veces al día; o de aproximadamente 17 a aproximadamente 45 mg/kg tres veces al día.

En algunas realizaciones, el tratamiento se inicia por vía intravenosa con sulopenem mismo o con otro antibiótico y después se continúa el tratamiento con un profármaco oral de la presente invención.

Como se describe más adelante, se encontró que en seres humanos el profármaco del Compuesto 1 proporcionaba niveles en sangre superiores a 0,5 µg/ml durante entre 3,18 y 4,84 horas tras la administración oral de 1000 mg (aproximadamente 730 mg equivalentes de sulopenem) del profármaco. En un experimento diferente, se encontró que en seres humanos el profármaco del Compuesto 1 proporcionaba niveles en sangre superiores a 1 µg/ml durante entre 4,28 y 5,94 horas tras la administración oral de 2000 mg (aproximadamente 1460 mg equivalentes de sulopenem) del profármaco.

El uso del profármaco puede ser concomitante con otros agentes activos. El uso de sulopenem o profármaco de sulopenem puede ser concomitante con probenecid o un agente de actividad similar que tiene un efecto inhibidor sobre la secreción de los túbulos renales.

FORMULACIÓN

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden el/los compuesto(s) profármaco de la invención formuladas para la administración oral con o sin uno o más excipientes y/u otro u otros ingredientes activos. El profármaco puede estar en forma de solvato o hidrato.

Las formas farmacéuticas para la administración oral de la presente invención pueden ser comprimidos, que incluyen comprimidos masticables, cápsulas, píldoras, tabletas, trociscos, polvos, jarabes, elixires, soluciones y suspensiones, y similares, de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar. La composición farmacéutica de la presente invención también puede administrarse directamente al tubo gastrointestinal del paciente a través de un tubo nasogástrico.

Una forma farmacéutica oral en algunas realizaciones puede contener de aproximadamente 800 a aproximadamente 2500 mg del profármaco.

Los excipientes pueden elegirse basándose en la forma farmacéutica pretendida. Ejemplos no limitantes incluyen polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, sacarosa, gelatina, goma arábiga, goma tragacanto o almidón de maíz; cargas tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico, glicina y almidón; disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, almidón glicolato sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos; lubricantes tales como estearato magnésico, laurilsulfato sódico y talco; y edulcorantes tales como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando una forma farmacéutica monodosis es una cápsula puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. Los excipientes también pueden incluir adyuvantes de suspensión tales como goma xantana o hidroxipropilmetilcelulosa, deslizantes tales como sílice coloidal, diluyentes y agentes de carga tales como dióxido de silicio, aromas, en particular

en el caso de las suspensiones y sobrecitos orales pediátricos. También pueden emplearse estabilizantes tales como ácido succínico. Pueden estar presentes otros materiales diversos como recubrimientos o para modificar la forma física de la forma farmacéutica monodosis. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar recubiertos con laca, azúcar o ambas. También se

El/los profármaco(s) estará(n) presente(s) en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para proporcionar la cantidad de dosis terapéutica que se desee en el intervalo que se describe en la presente memoria. La relación proporcional entre un profármaco y los excipientes dependerá naturalmente de factores tales como la naturaleza química, la solubilidad y la estabilidad de los ingredientes activos, así como de la forma farmacéutica que se contemple. Habitualmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 95% de profármaco en peso.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL SULOPENEM

El sulopenem es activo contra un amplio abanico de patógenos, que incluyen patógenos hospitalarios. Esto incluye una actividad potente contra miembros de la familia *Enterobacteriaceae* que expresan β -lactamasas de amplio espectro que confieren resistencia a las cefalosporinas (*K. pneumoniae*, ESBL+). Además, muchas de estas cepas aisladas son también resistentes a las fluoroquinolonas. El sulopenem es muy activo contra muchas especies de anaerobios clínicamente relevantes.

La actividad *in vitro* del sulopenem (el ácido progenitor ácido (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietil]-7-oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahydro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxílico) se evaluó contra patógenos implicados en infecciones extrahospitalarias e intrahospitalarias, tal como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de CIM₉₀ (µg/ml) para Sulopenem

<i>Staphylococcus aureus</i> S-oxacilina	0,125
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0,5
<i>Alloiococcus otitidis</i>	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grupo A)	0,03
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grupo B)	0,125
<i>Streptococcus bovis</i> (Grupo D)	0,06
Grupo de <i>Streptococcus viridans</i>	0,25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> susceptible a penicilina	0,03
<i>Streptococcus pneumoniae</i> intermedio a penicilina	0,25
<i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a penicilina	1

<i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a levofloxacino	0,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,125
<i>Corynebacterium</i> spp (no <i>C. jeikeium</i>)	2
<i>Citrobacter diversus</i>	0,06
<i>Citrobacter freundii</i>	0,25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	0,06
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL+	0,25
<i>Morganella morganii</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	0,5
<i>Salmonella/Shigella</i>	0,125
<i>Haemophilus influenzae</i> β -lactamasa -	0,25
<i>Haemophilus influenzae</i> β -lactamasa +	0,5
<i>Moraxella catarrhalis</i> β -lactamasa -	0,03
<i>Moraxella catarrhalis</i> β -lactamasa +	0,125
<i>Legionella pneumophila</i>	0,06
<i>Neisseria meningitides</i>	0,06
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,5
<i>Clostridium perfringens</i>	0,06
<i>Prevotella</i> spp.	0,125

Así, el sulopenem es activo contra un amplio abanico de patógenos, que incluyen patógenos hospitalarios que son resistentes a cefalosporinas y fluoroquinolonas. El espectro apoya su amplio uso hospitalario, cuando se identifique el patógeno infeccioso y se confirme la susceptibilidad a sulopenem. Esto incluiría una amplia lista de indicaciones respiratorias y de indicaciones quirúrgicas en las que probablemente estaría implicada una flora mixta, en particular como parte de una pauta con varios fármacos cuando se sospecha de infecciones mixtas.

EFICACIA ORAL DE LOS PROFÁRMACOS

Los compuestos se analizaron para determinar la eficacia oral en tres modelos de infección diferentes *in vivo*. Los patógenos bacterianos que se utilizaron para establecer cada infección se eligieron basándose en sus perfiles de resistencia y capacidades de provocar la

infección en modelos adecuados para las enfermedades en seres humanos. Las cepas aisladas de *Klebsiella pneumoniae* 1109 y 6485 provienen de una colección de cepas clínicas aisladas recientemente positivas para β -lactamasas de amplio espectro (ESBL⁺) y tienen CIM elevadas de ciprofloxacina y ceftazidima así como de otros antibióticos de β -lactamas. Ambas cepas aisladas han demostrado la capacidad de provocar infecciones sistémicas letales en ratones. *Streptococcus pneumoniae* 1095 es una cepa tolerante a penicilinas, resistente a macrólidas que es patógena en modelos murinos de infección sistémica y de las vías respiratorias. La cepa de *Haemophilus influenzae* Rd/AH5-3 se derivó de la cepa de laboratorio Rd; una mutación puntual dirigida en PBP3 hace que esta cepa negativa para β -lactamasa sea resistente a ampicilina (BLNAR). Esta cepa es capaz de provocar otitis media en un modelo de la enfermedad en gerbos mongoles. Los resultados se resumen en la Tabla 2 más adelante.

Modelo murino de infección sistémica aguda: para este modelo, se infectaron ratones CF-1 mediante inyección intraperitoneal de un inóculo letal de *K pneumoniae* 1109, 6485, o de *S. pneumoniae* 1095. Se infectaron cuatro grupos de dosis formados por de ocho a diez ratones por grupo y se trataron cubriendo un amplio abanico de niveles de dosis. A los ratones se les administró un tratamiento dos veces al día o bien a los 30 minutos/4 horas después de la infección o una/cinco horas después de la infección; la DP₅₀ (la dosis a la que sobreviven el 50% de los ratones infectados y tratados) se calculó basándose en los números de animales que sobrevivieron el día cuatro después de la infección.

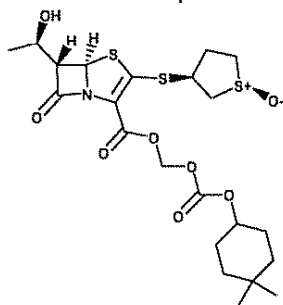
Modelo murino de infección de las vías respiratorias: Este modelo de infección se inició con una inoculación intranasal de una exposición letal de *S. pneumoniae* 1095 que provocó neumonía. Se infectaron y trataron cuatro grupos de dosis formados por de ocho a diez ratones por grupo, para cubrir un amplio intervalo de niveles de dosis. Se inició un tratamiento dos veces al día 18 horas después de la infección y se continuó durante dos días. Se usó el número de ratones que sobrevivieron en cada grupo de dosis el día diez después de la infección para determinar la DP₅₀.

Modelo en gerbos de otitis media: Para establecer la otitis media, se infectaron gerbos mongoles mediante inoculación intrabulvar con una cepa BLNAR de *H. influenzae*. Se infectaron cuatro grupos de dosis constituidos por cinco gerbos por grupo y se trataron cubriendo un amplio espectro de niveles de dosis. Se inició un tratamiento de tres veces al día 18 horas después de la infección y se continuó durante dos días. El día cuatro después de la infección, se sacrificó a los animales, se recogieron los lavados de fluido del oído medio y se determinó el número de bacterias que contenían. Se calcularon las DE₅₀ basándose en los niveles de bacterias; las muestras de lavado de fluido del oído medio con recuentos inferiores a 100 unidades formadoras de colonias/ml se consideraron limpias.

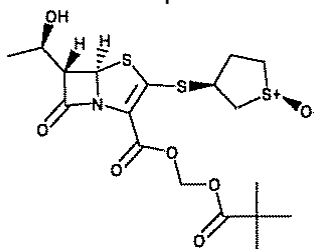
Se recogieron los datos para los compuestos de los Compuestos 1 y 2; para el Compuesto A (que se representa a continuación); y para el Compuesto B1, que es el éster pivaloiloximetílico (éster POM) de sulopenem (estereoquímica del oxotiolano (1R,3S)) que se representan a continuación. El compuesto B2 es la mezcla diastereomérica (mostrada a

5

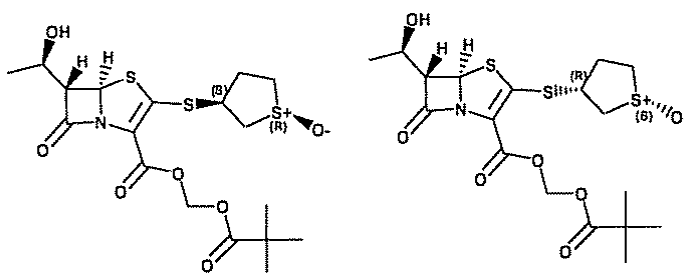
Compuesto A:



Compuesto B1:



Compuesto B2:



10

Tabla 2. Eficacia *in vivo* (DP₅₀ o DE₅₀ en mg/kg)

Modelo	Comp. 1	Comp. 2	Comp. A	Comp. B1
Infección sistémica aguda murina con <i>K. pneumoniae</i> 1109 (DP ₅₀)	25,1 (13,6 - 36,6)	12,5 (12,4 - 12,6)	10,1 (3,8 - 16,4)	38,2 (27,7 - 48,7)
"	9,0 (8,7 - 9,3)	16,2 (15,9 - 16,6)	15,3 (9,0 - 21,6)	11,4 (11,3 - 11,5)

-	-	-	-	-
Infección sistémica aguda murina con <i>K. pneumoniae</i> 6485 (DP ₅₀)	88,6 (87,8 - 89,4)	88,3 (68,5 - 108,2)	40,7 (29,1 - 52,3)	> 100
"	63,4 (2,1 - 124,6)	32,7 (23,7 - 41,7)	-	> 100
"	-	63,4 (58,5 - 68,3)	-	-
-	-	-	-	-
Infección sistémica aguda murina con <i>S. pneumoniae</i> 1095 (DP ₅₀)	12,5 (12,4 - 12,6)	7,9 (7,3 - 8,5)	9,0 (8,7 - 9,3)	7,9 (7,3 - 8,5)
"	6,3 (1,5 - 11,1)	6,3 (3,4 - 9,1)	15,3 (9,0 - 21,6)	4,3 (4,2 - 4,5)
"	-	11,0 (8,6 - 13,5)	-	9,0 (8,7 - 9,3)
-	-	-	-	-
Infección de las vías respiratorias murina con <i>S. pneumoniae</i> 1095 (DP ₅₀)	16,4 (9,8 - 23,0)	19,7 (18,2 - 21,2)	17,8 (0 - 38,6)	49,9 (34,7 - 65,2)
"	12,5 (5,6 - 19,4)	38,5 (37,7 - 39,3)	20,8 (8,7 - 50,1)	18,1 (1,4 - 34,9)
"	9,5 (4,0 - 15,0)	-	-	16,2 (11,5 - 20,9)
-	-	-	-	-
Otitis media en gerbos con <i>H. influenzae</i> BLNAR (DE ₅₀)	8,7 (8,4 - 9,0)	5,7 (3,6 - 7,7)	6,9 (4,4 - 9,4)	12,6 (6,8 - 18,3)
"	4,5 (4,4 - 4,6)	12,6 (6,8 - 18,3)	8,7 (8,4 - 9,0)	5,7 (5,6 - 5,7)

FARMACOCINÉTICA CLÍNICA DE LOS PROFÁRMACOS

Los datos de la farmacocinética (PK) clínica de voluntarios humanos sanos para los compuestos profármaco de sulopenem Compuesto 1, Compuesto B2 (datos de Foulds y cols.), y Compuesto A se resumen en la Tabla 3, más adelante. El Compuesto B2 es una mezcla diastereoisomérica de la que el diastereoisómero de configuración (1R,3S) en el resto oxotiolanilo es el Compuesto B1 (véanse los dibujos anteriores). No hay disponibles datos clínicos para el profármaco Compuesto 2.

Para el Compuesto 1 y el Compuesto A, seis personas recibieron dosis crecientes. Se obtuvieron muestras de sangre entera antes de administrar las dosis y a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 12 horas después de las dosis y se procesaron para obtener el plasma. Después se cuantificó la concentración de sulopenem en las muestras de suero y plasma usando procedimientos de HPLC validados. Los datos de Tmax para el Compuesto A se expresan en términos de mediana e intervalo.

Se administró una dosis única de Compuesto B2 a un total de diez personas. Véase Foulds y cols., referencia anterior. Se obtuvieron muestras de sangre antes de administrar las dosis y a las 0,08, 0,17, 0,33, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 y 8 horas y se procesaron para obtener el suero tras la administración oral del Compuesto B2 a 500 mg equivalentes de compuesto progenitor sulopenem (cinco personas) y 1000 mg equivalentes de compuesto progenitor sulopenem (cinco personas). Foulds y cols. también estiman las contribuciones a la PK de los diastereoisómeros 1R,3S (Compuesto B1) y 1S,3R presentes en el Compuesto B2.

Tabla 3. Farmacocinética clínica de Compuesto 1, Compuesto B2 y Compuesto A

Profármaco oral	Dosis (mg)	Dosis de Sulo. Equiv. (mg)	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)	ABC _{última} (h-ng/ml)	t _{1/2} (h)
Comp.1	400	292	1464 ± 442	1,17 ± 0,93	3455 ± 670	0,85 ± 0,16
"	600	438	1508 ± 340	1,33 ± 0,82	3914 ± 514	0,76 ± 0,096
"	1000	730	2860 ± 570	0,83 ± 0,41	6421 ± 1208	1,00 ± 0,17
"	2000	1460	4667 ± 1181	1,33 ± 0,82	13131 ± 2101	1,10 ± 0,62

Comp.B2 (Foulds y cols.)	273	205	1180 ± 280	NC	2260 ± 440	NC
"	544	409	1790 ± 490	NC	4190 ± 730	NC
Comp.A	300	196	715 ± 303	1,0 (0,5 - 1,5)	818 ± 480	NC
"	1000	654	1380 ± 372	0,5 (0,5 - 1,0)	2350 ± 642	1,11 ± 0,21
"	1000 fed	654 fed	1130 ± 300	1,0 (0,5 - 3,0)	3900 ± 535	NC
"	3000	1960	2260 ± 335	1,0 (0,5- 1,5)	5180 ± 1500	1,59 ± 0,80

La exposición a sulopenem tras la administración oral del Compuesto B2 se expresó en términos de la fracción absorbida comparada con las ABC intravenosas en el mismo estudio (Tabla 4, Foulds y cols.) La fracción absorbida variaba de 38,5 a 33,5% para el Compuesto B2 a dosis equivalentes de sulopenem de 205 a 409 mg. Usando los mismos datos intravenosos de la Tabla 4 de Foulds y cols., puede estimarse una fracción absorbida de 37,1 y 28,0% para el Compuesto 1 a dosis equivalentes de sulopenem de 292 y 438 mg, respectivamente.

Aunque se administraron diferentes equivalentes de dosis, la tendencia para los profármacos es de aumentos en la exposición sistémica inferiores a lo proporcional a las dosis. Los datos para el Compuesto A demuestran al menos que la lipofilicidad aumentada del profármaco no se traduce necesariamente en una mejor exposición oral. La lipofilicidad (ClogP) se calculó usando el programa ACD Labs 9.0 (LogP/DB; www.acdlabs.com) con los siguientes resultados: Compuesto 1: -0,29; Compuesto A: 0,83; Compuesto B1: -1,0; Compuesto B2: -1,0. La evaluación ulterior del Compuesto A reveló su inestabilidad inherente en el tracto gastrointestinal. Una estabilidad gastrointestinal mejorada tal como la que demostró el Compuesto 1 *in vitro* usando jugos intestinales humanos se ha correlacionado con un aumento de la exposición oral relativa a la dosis.

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS PROFÁRMACOS

Los profármacos se evaluaron con el objetivo final de identificar los compuestos que mostraban o que se predijo que mostrarían una o más de las siguientes: farmacocinética favorable tal como exposición o biodisponibilidad oral elevada en seres humanos tras la

administración oral; carencia de propensión a disminuir la carnitina en los tejidos; y propiedades fisicoquímicas adaptadas favorablemente a la formulación y uso farmacéuticos prácticos.

La evaluación del Compuesto A, entre otras cosas, llevó a la conclusión de que la estabilidad gastrointestinal del profármaco se predice que desempeña un papel significativo en la biodisponibilidad oral. Se evaluaron compuestos profármacos nuevos y se clasificaron, tal como se explica en detalle más adelante, en base a su estabilidad en presencia de pancrelipasa porcina (PPE) y a su estabilidad en jugos intestinales humanos (HIJ). La eficiencia de la conversión en sulopenem en homogenado de hígado humano se consideró también que era un parámetro significativo relativo a la biodisponibilidad oral de los profármacos. Los criterios de valoración *in vitro* para el Hígado S9, PPE y HIJ se resumen en la Tabla 4. Los profármacos se analizaron de acuerdo con los siguientes procedimientos generales.

Eficiencia de conversión hepática S9

Se evaluaron los profármacos para determinar la estabilidad y la eficiencia de conversión en homogeneizado de hígado humano (fracción S9). El hígado S9 se preparó reciente a partir de trozos de hígado almacenados a -70 °C para cada análisis que se completó. Se homogenizaron aproximadamente 5 g de tejido de hígado congelado hasta su uniformidad en 15 ml de tampón de fosfato potásico 100 mM enfriado en hielo (a pH 7,4). El homogeneizado se centrifugó después a 9000 g durante 20 minutos a 5 °C para aislar la fracción de sobrenadante de S9. Cada incubación se realizó a una dilución 1:10 del sobrenadante de S9 en tampón de fosfato potásico 100 mM (a pH 7,4). Las reacciones (1 ml) se iniciaron mediante la adición del sustrato (50 µM final) a 37 °C. Se obtuvieron alícuotas (75 µl) a los 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, y 20 minutos y se inactivó en 150 µl de acetonitrilo/acetato de amonio 100 mM 80/20 a pH 4,5 que contenía un patrón interno (ampicilina, 5 µg/ml). Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a viales para inyección. La degradación de primer orden del profármaco se controló por CL/EM/EM tal como se describe más adelante. La conversión en sulopenem se expresó como un porcentaje del equivalente molar (50 µM) en una muestra enriquecida. Los compuestos que lograban una eficiencia de conversión de aproximadamente el 75% o superior, se seleccionaron para realizar una evaluación más detallada.

Estabilidad

En estos experimentos, se agitó el contenido de una cápsula de ku-zyme® HP (preparación de pancrelipasa según la USP formada por: lipasa 8000 unidades USP, proteasa 30.000 unidades USP y amilasa 30.000 unidades USP; Schwarz Pharma Inc., Milwaukee, WI, EE. UU.) en 50 ml de fosfato potásico 100 mM a pH 7,4 y se mezclaron hasta uniformidad. Cada incubación (1 ml) se realizó a 37 °C y se inició mediante la adición de sustrato (50 µM

final). Se tomaron alícuotas (100 µl) a los 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, y 20 minutos después de la adición del sustrato y se inactivaron con 200 µl de acetonitrilo/acetato de amonio 100 mM 80/20 a pH 4,5 que contenía un patrón interno (ampicilina, 5 µg/ml). Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a viales para inyección. La degradación de primer orden del profármaco se controló por CL/EM/EM tal como se describe más adelante. Los compuestos que lograron una semivida de estabilidad de aproximadamente 10 minutos o superior se seleccionaron para realizar una evaluación más detallada.

En la Tabla 4, los valores únicos representan una media de dos determinaciones por duplicado. Cuando se realizaron determinaciones adicionales para un compuesto dado, los datos se expresan en términos de media y desviación típica. Todos los compuestos se analizaron usando un primer lote (Lote 1) de ku-zyme.

Los Compuestos 1, A, B1, y B2 se evaluaron también usando un segundo lote de ku-zyme (Lote 2), para el que se muestran los datos entre paréntesis.

En los experimentos de jugos intestinales humanos (HIJ), se agruparon los jugos intestinales humanos de 4 personas individuales (1 ml cada uno) con 1 ml de tampón de fosfato potásico 600 mM a pH 7,4. Alícuotas de 300 µl x 6 del jugo intestinal humano tamponado se incubaron a 37 °C tras la suplementación del sustrato a concentraciones de 300, 100, 30, 10, 3 y 1 µM. Dos compuestos de profármacos podrían analizarse al mismo tiempo. Se tomaron muestras de 35 µl a los 0, 0,5, 1, 2, 10, y 20 minutos y se inactivaron con 70 µl de acetonitrilo/acetato de amonio 100 mM a pH 4,5 80/20 que contenía un patrón interno (ampicilina, 5 µg/ml). Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a viales para inyección. La degradación de primer orden del profármaco se controló por CL/EM/EM tal como se describe más adelante. El porcentaje de profármaco que quedaba en función del tiempo a cada concentración se ajustó en una función decreciente de primer orden para determinar la constante de velocidad de la disminución del sustrato o K_{dep} . Una representación gráfica logarítmica lineal de k_{dep} en función de la concentración podría ajustarse con la siguiente ecuación en la que:

$$k_{dep} = k_{dep[S]=0} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S] + K_m} \right)$$

El valor de K_{dep} a una concentración de sustrato infinitesimalmente baja (en la que $k_{dep} \sim K_{dep[S]=0}$) representa la velocidad máxima de consumo o eliminación intrínseca del sistema y la K_m es la concentración a la que se logra la mitad de la velocidad máxima (V_{max}) del sistema. En términos de Michaelis-Menten, el aclaramiento intrínseco CL_{int} representa la relación de V_{max}/K_m cuando $[S]$ está muy por debajo de la K_m . Las unidades del sustrato para estos estudios de K_m se expresan en µM y el aclaramiento intrínseco (CL_{int}) en ml/minuto. Generalmente, los

compuestos con un aclaramiento intrínseco de $< 0,1$ ml/minuto o una K_m que es tres veces menor que su solubilidad en agua (para saturar la actividad enzimática) se seleccionaron para realizar una evaluación más detallada.

Solubilidad

- 5 Se determinó la solubilidad en equilibrio en tampón fosfato 25 mM (pH 5) a temperatura ambiente. Los viales que contenían un exceso de profármaco en tampón fosfato se rotaron durante hasta 48 horas. Después del periodo de equilibrado, se juntaron las muestras, se filtraron con un filtro de jeringa de $0,45\ \mu\text{m}$ Gelman Acrodisc Nylon y se analizaron para determinar la concentración del fármaco usando HPLC. Las condiciones de HPLC eran:
- 10 Columna: C18, SymmetryShield RP, Waters, $4,6 \times 150$ mm, $3,5\ \mu\text{m}$; Fase móvil A: Acetonitrilo; Fase móvil B: TFA al 0,1% en agua; Caudal: 1ml/minuto; Tiempo de análisis: 30 minutos; Vol. Inyectado: $20\ \mu\text{l}$; Detección: 210 nm; Disolvente de disolución: acetonitrilo/agua (50:50 v:v). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Gradiente utilizado:

15	<u>Tiempo</u>	<u>% de A</u>	<u>% de B</u>
	0 min	5	95
	25 min	95	5
	27 min	5	95
	30 min	5	95

20 Punto de fusión

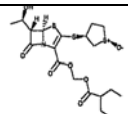
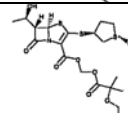
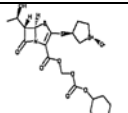
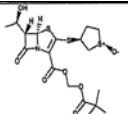
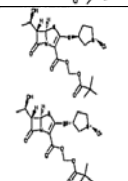
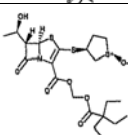
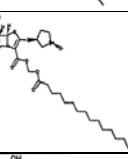
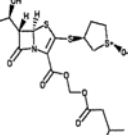
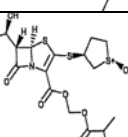
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato para determinar el punto de fusión en capilar MEL-TEMP 3.0 y están sin corregir.

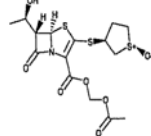
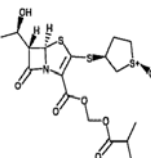
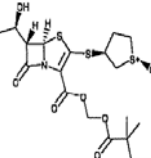
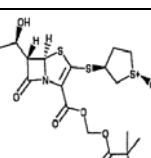
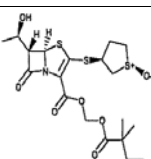
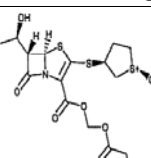
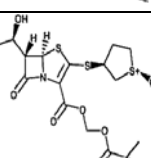
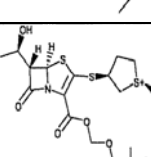
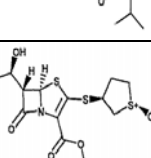
Cuantificación del Profármaco

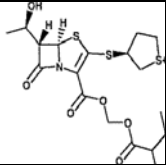
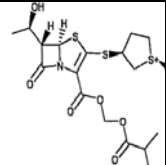
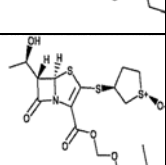
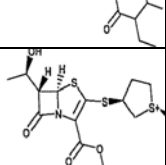
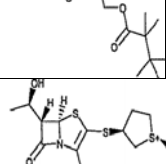
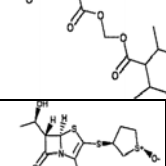
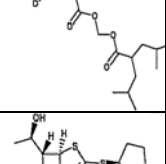
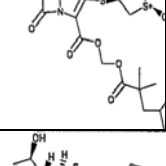
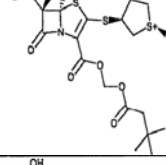
- Las muestras inactivadas de estos experimentos *in vitro* se cuantificaron usando
- 25 CL/EM/EM. La separación se logró en una columna Phenomenex Primesphere C18-HC ($5\ \mu\text{m}$, $30 \times 2,0$ mm) usando un gradiente binario del Disolvente A (95% de agua / 5% de acetonitrilo / 0.1% de ácido acético) y Disolvente B (5% de agua / 95% de acetonitrilo / 0.1% de ácido acético). El volumen de inyección fue de $20\ \mu\text{l}$. La columna se equilibró y el gradiente se inició con A al 100% con un caudal de $1000\ \mu\text{l}/\text{minuto}$. Se modificó la composición de la fase móvil
- 30 hasta llegar a B al 100% en 0,4 minutos y después se volvió a llevar a A al 100% en 0,9 minutos. Se usó ampicilina como patrón interno ($5\ \mu\text{g}/\text{ml}$). El efluente se analizó mediante un detector espectrómetro de masas (Sciex API 3000) provisto de una interfaz de electropulverización iónica turbo y funcionando en modo iónico positivo con un potencial de desagrupamiento de 10V, una temperatura de $400\ ^\circ\text{C}$ y una energía de colisión de 25V. Todos
- 35 los profármacos, el sulopenem y la ampicilina se controlaron mediante las transiciones de MRM

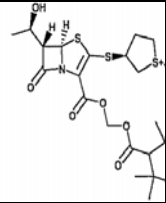
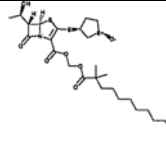
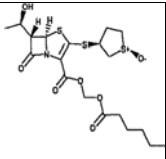
de la masa progenitora protonada a un ión de fragmentación principal en los espectros de disociación inducidos por la colisión. El intervalo dinámico típico del ensayo variaba en el intervalo de 10,0 a 10.000 ng/ml.

Tabla 4

Comp.	Estructura	% de conv. por S9 (media)	Semivida con PPE (minutos)	Km de HIJ (μ M) (media)	Cl _{int} de HIJ (ml/min) (media)	Solubilidad (μ g/ml)
1		100	11,7 $\pm$ 3,8 (17,9 lote 2)	91	0,07	1209
2		76	19,1	105	0,13	2900
A		100	3,9 $\pm$ 1,1 (6,3 lote 2)	300	0,38	136
B1		100	(22,5 $\pm$ 0,6, lote 2)	29	0,11	389
B2		94	11,6 (19,6 lote 2)	40	0,09	-
C		2,4	21,1	-	-	-
D		-	-	-	-	-
E		-	6,4	-	-	-
F		-	4,7	-	-	-

G		100	21,2	390	0,18	-
H		-	6,8	-	-	-
I		95	14,4	-	-	-
J		86,8	11	-	-	-
K		47,2	14,5	-	-	-
L		-	-	-	-	-
M		20,4	39,4	-	-	-
N		14,1	11,1	-	-	-
O		-	8,3	-	-	-

P		-	4,2	-	-	-
Q		-	4,8	-	-	-
R		0	5,3	-	-	-
S		-	6,3	-	-	-
T		-	7,7	-	-	-
U		-	6,4	-	-	-
V		-	10,5	-	-	-
W		-	7,6	-	-	-
X		-	4,7	-	-	-

Y		-	8	-	-	-
Z		-	-	-	-	-
AA		-	-	-	-	-

Disminución de carnitina

Los ácidos alquílicos pequeños tales como el ácido pivalico que están completamente sustituidos en el carbono α del carboxilato no se catabolizan suficientemente a través de la β -oxidación. Como resultado, la carnitina se acila y la acilcarnitina se acumula en los tejidos y en el torrente sanguíneo, disminuyendo las concentraciones libres de carnitina. De ese modo, los ácidos que están completamente sustituidos en el carbono α proporcionan el potencial para disminuir las reservas de carnitina en el organismo. Véase Brass, referencia anterior. Esto se ha demostrado en tratamientos de corta duración con profármacos que contienen ácido pivalico en los que la disminución de carnitina provocó una oxidación deficiente de los ácidos grasos y una cetogénesis alterada. Véase Abrahamsson y cols. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 52, 18-21 (1994). Sería deseable una cadena lateral del profármaco que se eliminara de forma rápida y segura y que no disminuyera las reservas de carnitina en el organismo. La conversión metabólica de ciertos ácidos alquílicos pequeños en sus conjugados glucurónidos proporciona una ruta eficaz de eliminación del organismo. Por ejemplo, se ha demostrado que el ácido valproico se elimina extensamente mediante glucuronidación (véase Zaccara y cols. *Clin. Pharmacol.*, 15 367-389 (1988)), mientras que el ácido pivalico se excreta casi completamente en forma de su conjugado de acilcarnitina en los seres humanos. Véase Totsuka y cols. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 36, 757-761 (1992). Puede apreciarse que cambios sutiles de la estructura pueden traducirse en diferencias sustanciales en la disposición metabólica de estos ácidos alquílicos.

La conversión metabólica de ciertos ácidos alquílicos pequeños en sus conjugados glucurónidos proporciona una ruta eficaz de eliminación del organismo. Se ha demostrado, por ejemplo, que el ácido valproico se elimina extensamente mediante glucuronidación (véase

Zaccara y cols. *Clin. Pharmacol.*, 15 367-389 (1988)), mientras que el ácido píválico se excreta casi completamente en forma de su conjugado acilcarnitina en los seres humanos.

Fue interesante comparar el Compuesto 1 y el Compuesto B1 en términos de la tendencia, o su ausencia, de las cadenas laterales de los profármacos de disminuir la carnitina en plasma tras el metabolismo del profármaco intacto. Esto se evaluó *in vivo* usando un modelo agudo de disminución de carnitina en ratas Sprague-Dawley. Para entender el impacto potencial *in vivo*, se administraron el ácido píválico radiomarcado (cadena lateral del Compuesto B1) y ácido 2-etilbutírico (cadena lateral del Compuesto 1) por vía oral a una dosis de 200 mg/kg dos veces al día durante 4 días a dos grupos de animales diferentes. El ácido píválico se marcó con ^{14}C en el carbono del carbonilo (posición 1) y presentaba una actividad específica de 0,482 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. El ácido 2-etilbutírico se marcó con ^{14}C en el carbono adyacente al carbono del carbonilo (posición 2) y presentaba una actividad específica de 0,503 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. Las dosis se administraron en fosfato sódico 100 mM a pH 6,6 a un volumen de dosis de 10 ml/kg. Las muestras de sangre se obtuvieron a intervalos de 24 horas tras el inicio del estudio, se procesaron para obtener el plasma y se ensayaron para determinar los niveles de carnitina por CL/EM/EM. Se completó un control del vehículo que consistía en la administración oral de un volumen igual de tampón sin compuesto como comparación de los niveles basales. Tal como se muestra en la Figura 1, los animales que recibieron 200 mg/kg dos veces al día de ácido píválico mostraron niveles menores de carnitina en plasma comparados con el control del vehículo. Por el contrario, los animales que recibieron la misma dosis de ácido 2-etilbutírico en el transcurso de 4 días demostraron cambios estadísticamente insignificantes de la carnitina en plasma, lo que sugiere que este compuesto no provoca disminución de carnitina.

Se completó un estudio diferente con una única dosis de 200 mg/kg de cada compuesto radiomarcado (ácido píválico y ácido 2-etilbutírico) en ratas para determinar la exposición sistémica de la dosis tras la administración oral. Se eligió la vía de administración oral porque es de esperar que la mayoría de la hidrólisis de los profármacos se produzca en el intestino antes de entrar en la circulación sistémica. Se obtuvieron muestras de plasma antes de la administración y a las 0,25, 0,5, 1, 4, 8, y 24 horas de la administración. Las muestras se cuantificaron para determinar la radiactividad mediante escintilometría de líquidos y los recuentos se convirtieron en μg equivalentes/ml. Tal como se muestra en la Tabla 5 y en la Figura 2, una vez absorbido, la radiactividad asociada al ácido 2-etilbutírico se elimina 4,5 veces más rápido que la del ácido píválico, lo que refleja un procesamiento metabólico eficaz y la excreción del compuesto.

Por consiguiente, no es de esperar que la administración oral del profármaco Compuesto 1 provoque disminución de carnitina, mientras que si lo es la administración del

Compuesto B1.

Tabla 5. Farmacocinética de la radiactividad total en ratas Sprague-Dawley tras la administración oral de ^{14}C -ácido pivalico o de ^{14}C - ácido 2-etilbutírico a una dosis de 200

mg/kg (100 $\mu\text{Ci/kg}$)				
Compuesto administrado	Cmax ($\mu\text{g eq./ml}$)	Semivida (h)	ABC (h * $\mu\text{g eq/ml}$)	CL/F (ml/h/kg)
Ácido pivalico	247 $\pm$ 36	13,8 $\pm$ 6,7	6824 $\pm$ 2948	35,6 $\pm$ 14,3
Ácido 2-etilbutírico	158 $\pm$ 47	5,7 $\pm$ 0,8	1332 $\pm$ 402	163,3 $\pm$ 53,5

5 Otras propiedades

Para una formulación conveniente e idoneidad como producto farmacéutico, en algunas realizaciones, el compuesto es preferiblemente sólido a temperatura ambiente, preferiblemente forma fácilmente un sólido cristalino y es razonablemente estable a la degradación.

Discusión

10 Se determinó que el Compuesto 1 mostraba una combinación favorable de propiedades. Además de ser cristalino y adecuadamente soluble en agua., el Compuesto 1 se convertía completamente en sulopenem en los experimentos con hígado S9, mostraba una semivida relativamente larga en presencia de PPE y una eliminación intrínseca y saturación de las enzimas intestinales del jugo intestinal humano relativamente bajos. Basándose en estos
15 datos, se predijo que el Compuesto 1 mostraría una farmacocinética clínica favorable, lo que se confirmó mediante los datos clínicos que se describen anteriormente. Además, según indica su estructura y las pruebas de carnitina que se describen en la presente memoria, el Compuesto 1 no disminuye la carnitina. Así, el Compuesto 1 combina al menos todas las propiedades siguientes: buena biodisponibilidad oral, no disminución de carnitina y propiedades físicas
20 favorables. Por el contrario, no se predijo que otros profármacos, en particular otros que portan cadenas laterales alquílicas consiguieran estos atributos. Por ejemplo, varios de los Compuestos de C a AA tienen un carbono terciario en posición α al grupo carbonilo del éster del resto del profármaco (por ejemplo, el Compuesto C). Se predice que estos presentan una potencial capacidad de disminución de la carnitina. Otros de los compuestos de análisis presentaban una estabilidad en presencia de PPE y/o conversión por S9, relativamente bajas, que predicen una estabilidad en el tubo gastrointestinal y biodisponibilidad oral menores. Además, otros no se analizaron debido a dificultades para obtener muestras que pudieran analizarse fácilmente. Véase la Tabla 4.

25 También se demostró que el profármaco Compuesto 2 presentaba atributos favorables,
30 que incluyen su estabilidad prevista en el tubo gastrointestinal y biodisponibilidad y propiedades

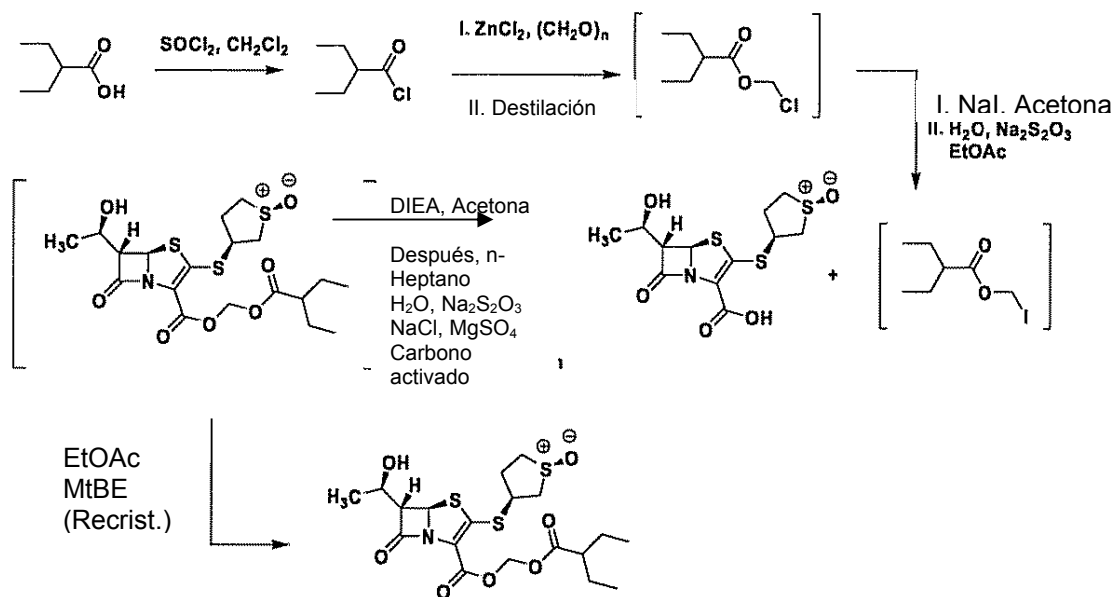
físicas. Véase la Tabla 4.

EJEMPLOS DE COMPUESTOS

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. El sulopenem cristalino, que se usó en la presente ejemplificación, se preparó de acuerdo con el Ejemplo 11 del documento US 5013729.

Ejemplo 1: (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietil]-7-oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahydro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxilato de (2-etil-1-oxobutoxi)metilo (Compuesto 1).

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el esquema y la descripción siguientes.



Etapa 1: se añadió ácido 2-etilbutírico (1500 g) a una solución de cloruro de tionilo (1800 g) en diclorometano (0,75 l) durante 1 hora. La mezcla se calentó a reflujo y se controló por CG (cromatografía de gases). Después de aproximadamente 2 horas, la mezcla de reacción se concentró por destilación a presión atmosférica. Después se enfrió a 22 °C, se añadió diclorometano (0,75 l) y la mezcla se concentró de nuevo a presión atmosférica. Debido a la extrema capacidad corrosiva de los reactivos que se usaron, todos los gases de salida se pasaron por un lavador de gases húmedo alimentado a base de una solución cáustica.

Etapa 2: Mientras tanto, se preparó una mezcla de cloruro de cinc (18 g) y paraformaldehído (480 g). El cloruro de ácido puro, medio en bruto se añadió a esta mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente agitando mecánicamente. Después de un corto periodo de inducción, se observó un proceso exotérmico significativo. La temperatura de la mezcla de reacción aumentó desde temperatura ambiente (25 °C) a 50 °C en 5 minutos. Se ralentizó la velocidad de la adición para controlar la reacción exotérmica y mantener la reacción a 50 °C.

Cuando se hubo completado la adición, la mezcla de reacción se dejó enfriar y se agitó a temperatura ambiente durante otras 18 horas más.

Después se cargaron n-heptano (4 l) y solución acuosa de bicarbonato sódico al 10% (9 l) y las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con n-heptano (3,4 l). Las fases orgánicas combinadas se filtraron y se destilaron a vacío proporcionando el producto en bruto. El producto se purificó mediante destilación a vacío (10-20 mm de Hg) proporcionando 587 g de éster clorometílico del ácido 2-etilbutírico.

Etapas 3: Se disolvió éster clorometílico del ácido 2-etilbutírico (700 g) en acetona (3 l). A esta solución se añadió yoduro sódico (1,0 kg). La mezcla de reacción resultante se calentó a reflujo hasta que se completó la reacción (2 horas, controlado por CG). La solución después se enfrió hasta alcanzar temperatura ambiente, cuando se añadieron terc-butilmetiléter (7 l) y tiosulfato sódico acuoso al 5% (4 l). Se separaron las fases y la fase orgánica se lavó con tiosulfato sódico acuoso (4 l), agua apirógena (4 l) y solución de cloruro sódico al 10% (4 l). La fase orgánica se secó sobre sulfato magnésico (350 g), se filtró y la torta de filtrado se lavó con terc-butilmetiléter (2 x 0,7 l). El filtrado se evaporó a volumen reducido (aproximadamente 2 l) proporcionando el éster yodometílico del ácido 2-etilbutírico, en forma de una solución en terc-butilmetiléter.

Etapas 4: La solución medio en bruto en terc-butilmetiléter del éster yodometílico del ácido 2-etilbutírico de la Etapa 3 se añadió a una suspensión de sulopenem (750 g) en acetona (5,9 l). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (319 g) en acetona (0,5 l) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó la reacción. Se añadieron agua apirógena (6,5 l) y heptano (3,75 l) y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo primero con heptano (5 l) y después con acetato de etilo (2 x 6 l). Los extractos en acetato de etilo se combinaron y se lavaron con tiosulfato sódico acuoso al 5% (6 l), agua apirógena (6 l) y cloruro sódico acuoso al 10% (6 l). Los extractos orgánicos se trataron con carbono activado (75 g) y sulfato magnésico (150 g), después se filtraron. La torta de filtrado se lavó con acetato de etilo (2 x 1 l) y el filtrado se evaporó a sequedad proporcionando el producto en bruto (0,8 kg). Se añadió acetato de etilo (2,4 l) y la solución se calentó (45 °C) logrando la disolución. Esta solución después se filtró en caliente y después se añadió terc-butilmetiléter (4,7 l). La suspensión resultante se granuló durante 10 minutos de 40 °C a 50°C y después se enfrió lentamente a menos de 10 °C. El sólido resultante se recolectó, se lavó con una mezcla 1:2 de acetato de etilo y terc-butilmetiléter (4 x 0,5 l) y se secó a peso constante a vacío hasta a 50 °C proporcionando 0,57 kg del producto deseado (rendimiento del 60%).

Etapas 5: El producto en semi-bruto (0,55 kg) se suspendió en acetato de etilo (1,65 l) a temperatura ambiente. Después la temperatura se ajustó a aproximadamente 50 °C para lograr

la disolución. Esta solución se filtró en caliente para eliminar las impurezas insolubles y después se añadió terc-butilmetiléter (3,6 l). La solución resultante se enfrió lentamente a menos de 5 °C para iniciar la cristalización. El producto sólido se recogió, se lavó con una mezcla de acetato de etilo y terc-butilmetiléter 1:2 (4 x 150 ml) y se secó a peso constante a vacío hasta a 50 °C, proporcionando 0,48 kg del producto deseado (rendimiento del 86%). Se determinó que el material cristalino no estaba solvatado.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): 5,71 (m, 3H), 5,19 (d, 1H, $J = 4,56$ Hz), 3,92 (m, 2H), 3,81 (m, 1H), 3,70 (m, 1H), 2,96 (m, 1H), 2,80 (m, 1H), 2,65 (m, 2H), 2,36 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,45 (m, 4H), 1,10 (d, 3H, $J = 6,22$ Hz), 0,78 (t, 6H).

PF: 105 °C; Esp. de masas: $(\text{M}+\text{H})^+$ 478.

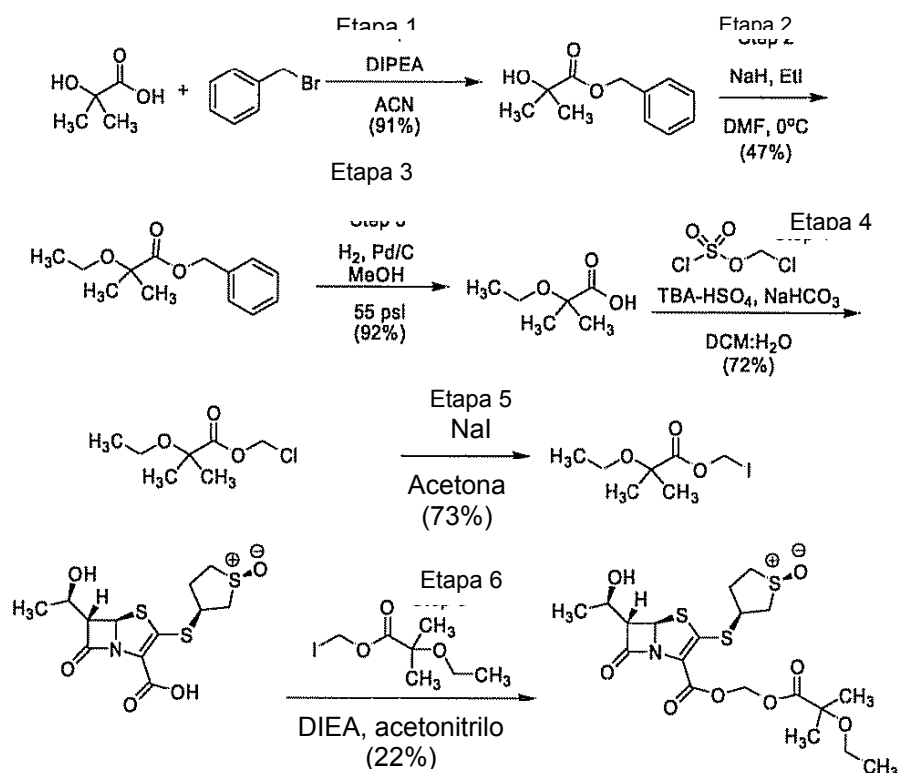
PM: 477,92 g/mol; Form. Molec.: $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_7\text{S}_3$.

Solubilidad en agua (tampón fosfato a pH 5, 25 °C): 1209 $\mu\text{g/ml}$.

Los cristales del Compuesto 1 preparados de la manera de la Etapa 5 anterior se sometieron a difracción de rayos X en polvo. Las muestras se analizaron en un difractómetro automatizado de polvo Siemens D500 provisto de un monocromador de grafito y una fuente de rayos X de Cu ($\lambda = 1,54$ Å) que se operó a 50 kV, 40 mA. Se realizó un calibrado de 2θ usando un patrón de mica NBS. La preparación de las muestras se realizó usando una placa de muestra de ruido de fondo cero. El patrón de difracción de estos cristales del Compuesto 1 se muestra en la Figura 3 y se tabula en la Figura 5.

Ejemplo 2: (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietil]-7-oxo-3-[[1R,3S)-tetrahydro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxilato de (2-etoxi-2-metil-1-oxopropoxi)metilo (Compuesto 2).

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el esquema y la descripción siguientes.



En las etapas 1-4, el ácido 2-hidroxi-isobutírico se protegió con bromuro bencílico, se alquiló con yoduro etílico, se desprotegió y se esterificó proporcionando éster clorometílico del ácido 2-etoxi-isobutírico.

- 5 En la etapa 5, en un matraz de reacción adecuado, se disolvió yoduro sódico (23,9 g, 159,45 mmol, 1,6 eq.) en acetona (96 ml). Después se añadió éster clorometílico del ácido 2-etoxi-isobutírico (18 g, 99,65 mmol, 1 eq.) en forma de una solución en más acetona (18 ml), y la mezcla de reacción resultante se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante aproximadamente 2 horas. La reacción se controló por CG. Cuando la conversión se completó,
- 10 la reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente agitando. Después la reacción se fraccionó entre heptanos (120 ml) y solución acuosa al 10% de tiosulfato sódico (105 ml). El contenido del recipiente de reacción se agitó durante al menos 5 minutos, y después se dejó que se separaran las fases. La fase orgánica ligera se reservó, y la fase acuosa pesada se desechó. Después los compuestos orgánicos se lavaron con una segunda porción de solución
- 15 acuosa al 10% de tiosulfato sódico (105 ml), y tras la separación se volvió a desechar la fase pesada. La fase orgánica después se lavó con solución acuosa al 10% de cloruro sódico (105 ml). La fase acuosa pesada se desechó y los compuestos orgánicos se concentraron a presión reducida (< 35 °C). Esto proporcionó 16,26 g de éster yodometílico del ácido 2-etoxi-isobutírico que se usó en las reacciones químicas posteriores sin purificación adicional (ensayo: ~60%).

- 20 En la Etapa 6, a un recipiente de reacción adecuado en atmósfera de nitrógeno se

añadió sulopenem (13,92 g, 39,83 mmol, 1 eq.) y acetona (110 ml). Después se añadió éster yodometílico del ácido 2-etoxi-isobutírico (16,26 g, 59,9 mmol, 1,5 eq. a una potencia del 100%) en acetona (14 ml) y la suspensión se agitó durante un mínimo de 10 minutos. Después se añadió N,N-diisopropiletilamina (5,11 g, 39,54 mmol, 1 eq.) en acetona (14 ml), manteniendo una temperatura interna de < 35 °C (reacción exotérmica). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche (después de aproximadamente 2 horas, el sulopenem se disolvió). La mezcla de reacción después se fraccionó entre heptanos (80 ml) y agua (129 ml), y el contenido del recipiente de reacción se agitó durante al menos 5 minutos. Se separaron las fases y la fase orgánica ligera se desechó. La fase pesada se lavó con más heptanos (80 ml). De nuevo se separaron las fases y se desechó la fase orgánica ligera. El contenido del recipiente de reacción después se concentró aproximadamente un 50% a presión reducida, manteniendo una temperatura interna inferior a 35 °C. Se añadió acetato de etilo (120 ml) y el contenido del recipiente de reacción se agitó durante al menos 5 minutos. Se dejó que se separaran las fases y la fase orgánica ligera se reservó. La fase acuosa pesada se volvió a extraer con más acetato de etilo (2x 120 ml). Los compuestos orgánicos combinados se lavaron con tiosulfato sódico acuoso al 10% (120 ml), agua (120 ml) y cloruro sódico acuoso al 10% (120 ml). Después los compuestos orgánicos se trataron con carbono activado (2,9 g), celita (2,9 g) y sulfato de magnesio (MgSO_4) (8,2 g) a temperatura ambiente y se agitó durante al menos 1 hora. Después de retirar estos sólidos por filtración, la solución se concentró a presión reducida, mientras se mantenía una temperatura interna inferior a 45 °C (acetato de etilo, p.e. 76,5-77,5 °C).

Etapa 7: El Compuesto 2 resultante en bruto (23 g) en acetato de etilo (100 ml) se calentó casi a reflujo para disolver completamente los sólidos, y después se añadió terc-butilmetiléter (100 ml) gradualmente, manteniendo una temperatura interna de entre 60 °C y reflujo. La mezcla resultante se agitó lentamente a una temperatura de entre 60 °C y reflujo durante 5 minutos, y después se granuló durante un mínimo de 1 hora a 5-15 °C. El producto blanquecino se filtró, se lavó con metil-terc-butiléter (MTBE) (28 ml) y se secó a vacío a temperatura ambiente durante al menos 16 horas. Esto proporcionó el producto (Compuesto 2) en forma de un sólido blanco, (12,57 g, rendimiento del 63,9%).

Los cristales de este producto se sometieron a difracción de rayos X en polvo. Las muestras se analizaron en un difractómetro de polvo automatizado Siemens D500 provisto de un monocromador de grafito y una fuente de rayos X de Cu ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) que se operó a 50 kV, 40 mA. Se realizó un calibrado de 2θ usando un patrón de mica NBS. La preparación de las muestras se realizó usando una placa de muestra de ruido de fondo cero. El patrón de difracción se muestra en la Figura 4 y está tabulado en la Figura 6.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz): 5,83 (d, 1H, $J = 5,81$ Hz) 5,73 (m, 2H), 5,20 (m, 1 H), 3,92 (m, 2H), 3,81 (m, 1 H), 3,70 (m, 1 H), 3,28 (q, 2H, $J = 7,05$ Hz), 2,96 (m, 1 H), 2,80 (m, 1 H), 2,65 (m, 2H), 2,36 (m, 1 H), 1,29 (s, 6H), 1,10 (d, 3H, $J = 6,63$ Hz), 1,00 (t, 3H, $J = 6,63$ Hz).

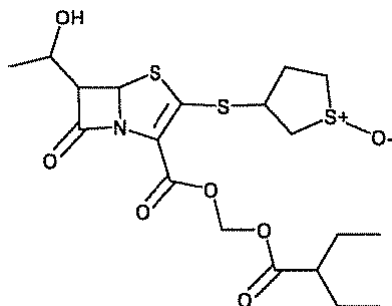
PF: 111-113 °C;

5 PM: 493,62 g/mol; Form. Molec.: $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_8\text{S}_3$.

Solubilidad en agua (tampón fosfato a pH 5, 25 °C): 2900 $\mu\text{g/ml}$.

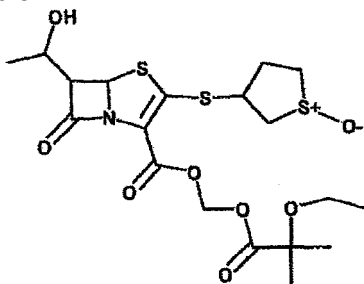
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1, que es (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietyl]-7-oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahidro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxilato de (2-etyl-1-oxobutoxi)metilo.
3. El compuesto de la reivindicación 1, que es (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietyl]-7-oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahidro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxilato de (2-etyl-1-oxobutoxi)metilo en la forma cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual que el que se representa en las Figuras 3 y 5.

4. Un compuesto de la Fórmula:



- 15 5. El compuesto de la reivindicación 4, que es (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietyl]-7-oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahidro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxilato de (2-etoxi-2-metil-1-oxopropoxi)metilo.
6. El compuesto de la reivindicación 4, que es (5R,6S)-6-[(1R)-1-hidroxietyl]-7-oxo-3-[[[(1R,3S)-tetrahidro-1-oxido-3-tienil]tio]-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxilato de (2-etoxi-2-metil-1-oxopropoxi)metilo en la forma cristalina que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual que el que se representa en las Figuras 4 y 6.
- 20 7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 formulada para la administración oral con o sin uno o más excipientes y/u otro u otros ingredientes activos.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 6 y probenecid formulada para la administración oral con o sin uno o más excipientes y/u otro u otros ingredientes activos.

9. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso terapéutico.

10. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el tratamiento de
5 infección bacteriana en un ser humano en necesidad del mismo.

11. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y probenecid para el tratamiento de una infección bacteriana en un ser humano en necesidad del mismo.

12. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una infección bacteriana en un ser humano en
10 necesidad del mismo mediante administración por vía oral.

13. El uso de la reivindicación 12, en la que el compuesto se administra por vía oral en una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 2500 mg dos veces al día o tres veces al día.

14. El uso de la reivindicación 12, en el que el compuesto se administra por vía oral en una
15 dosis de aproximadamente 7 a aproximadamente 25 mg/kg dos veces al día.

15. El uso de la reivindicación 12, en el que el compuesto se administra por vía oral en una dosis de aproximadamente 17 a aproximadamente 45 mg/kg dos veces al día o tres veces al día

FIG. 1

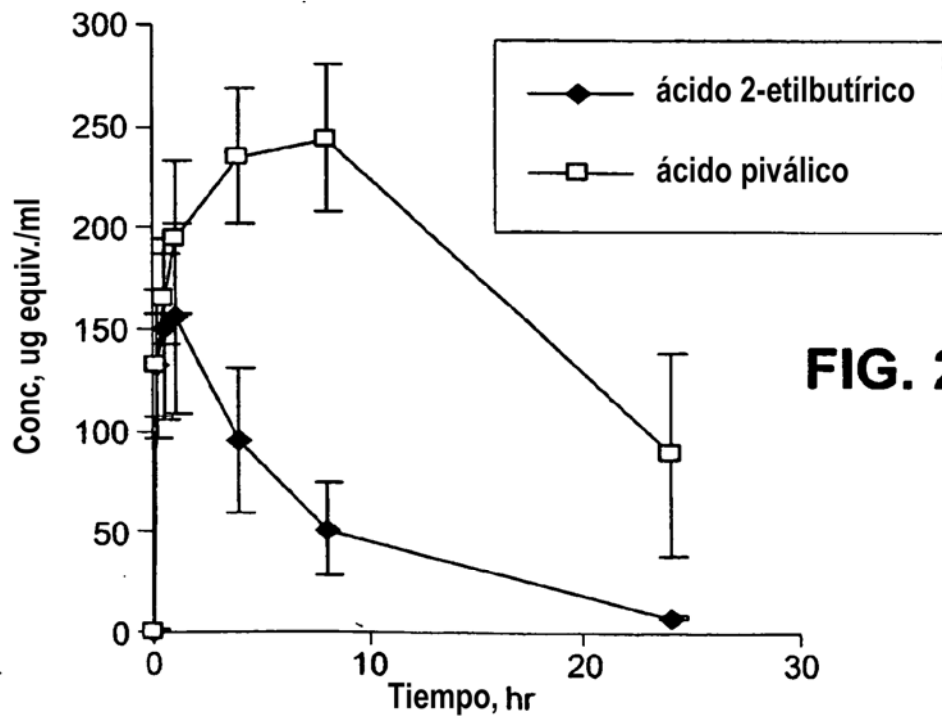
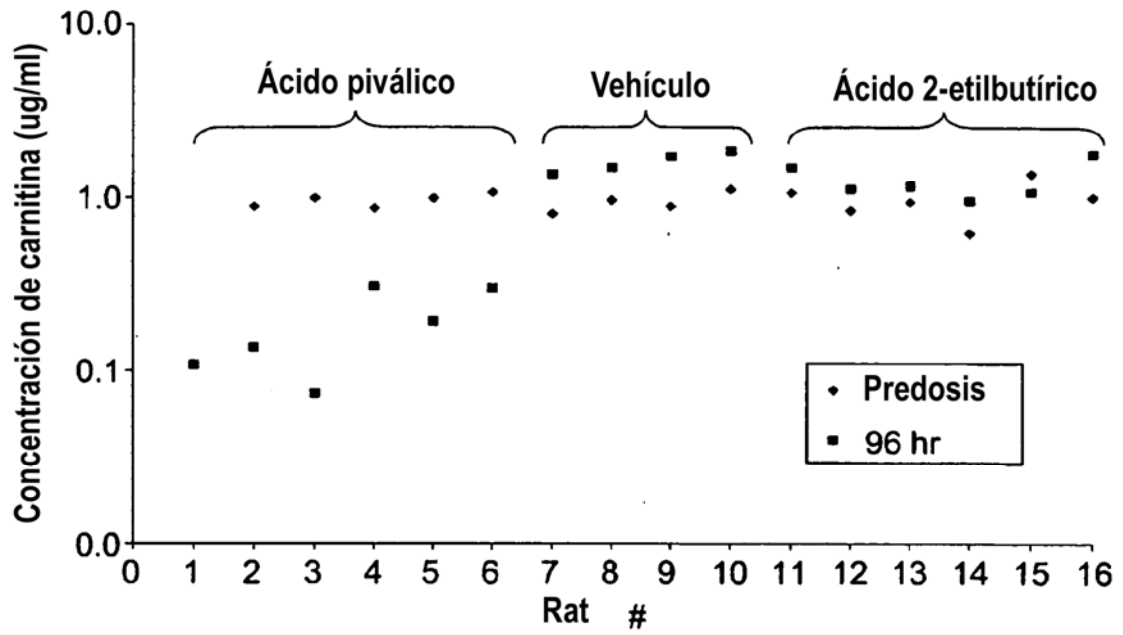


FIG. 2

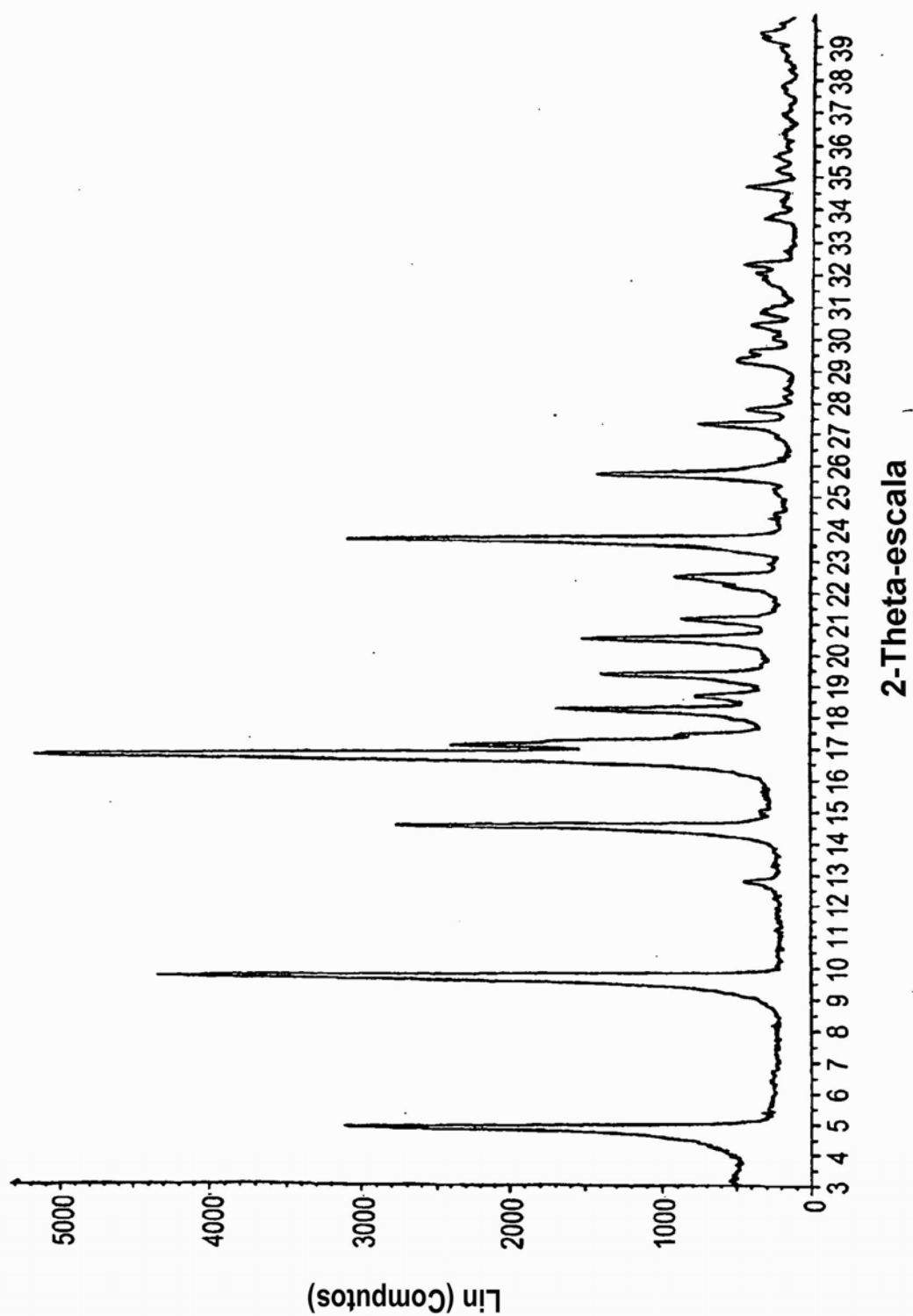
FIG. 3

FIG. 4

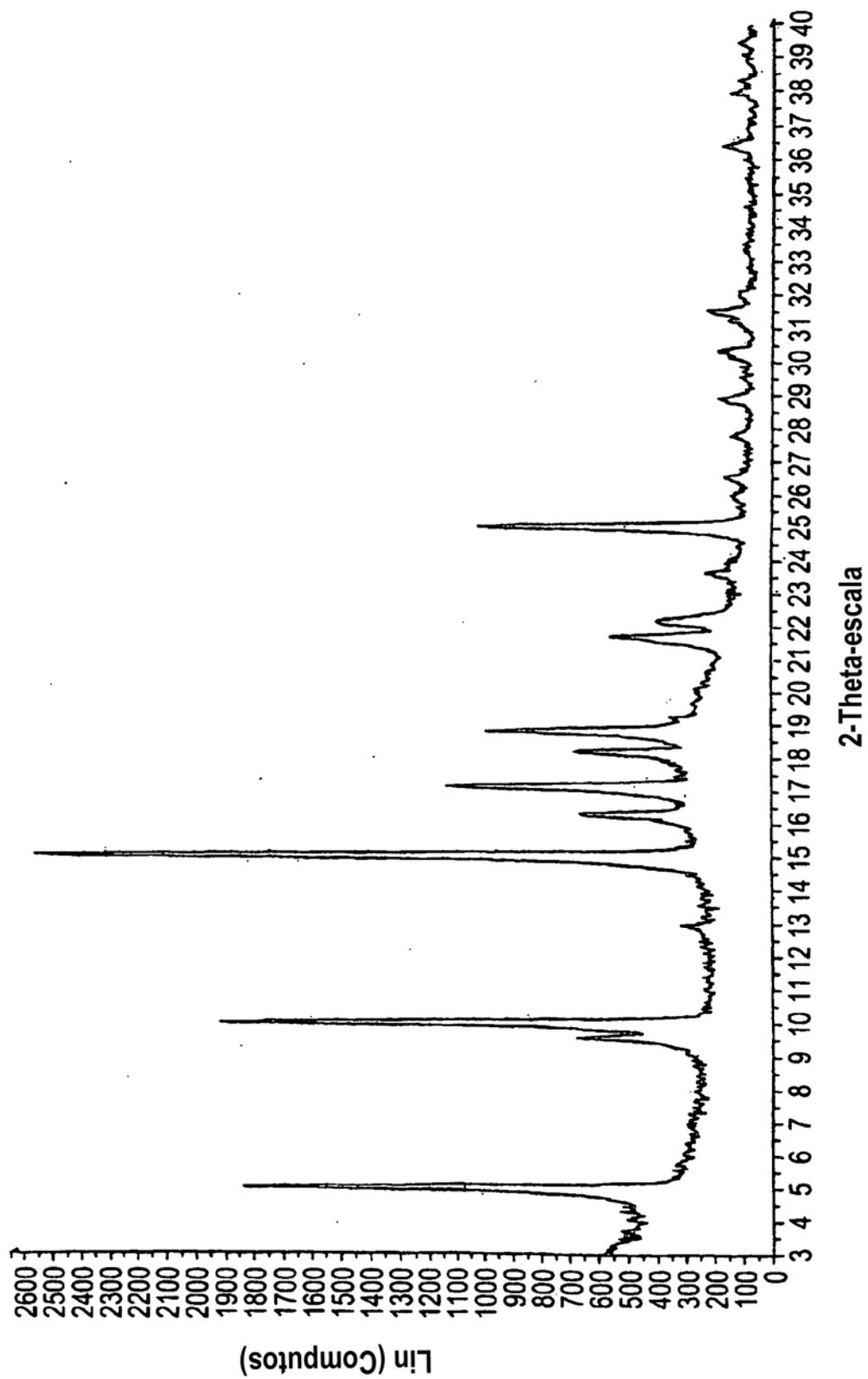


FIG. 5

valor d	2-Theta °	intensidad	intensidad%
18.26027	4.835	3108	60.1
9.18278	9.624	4330	83.7
6.92727	12.768	430	8.3
6.11078	14.483	2759	53.3
5.30050	16.712	5174	100.0
5.18708	17.080	2396	46.3
4.86236	18.230	1683	32.5
4.75400	18.649	767	14.8
4.59001	19.322	1387	26.8
4.32314	20.527	1514	29.3
4.19978	21.137	860	16.6
3.99389	22.240	577	11.2
3.94639	22.511	907	17.5
3.75759	23.658	3098	59.9
3.45923	25.732	1421	27.5
3.25936	27.340	758	14.7
3.20146	27.844	426	8.2
3.03698	29.385	503	9.7
3.01040	29.651	412	8.0
2.92866	30.498	401	7.8
2.88994	30.917	348	6.7
2.76299	32.375	449	8.7
2.64868	33.814	316	6.1
2.57969	34.746	442	8.5
2.53966	35.312	244	4.7
2.51050	35.736	255	4.9
2.28153	39.463	350	6.8

FIG. 6

valor d	2-Theta °	intensidad	intensidad%
17.82492	4.953	1838	71.5
9.26907	9.534	667	26.0
8.85757	9.978	1917	74.6
6.84872	12.916	314	12.2
5.88550	15.041	2569	100.0
5.44080	16.278	655	25.5
5.18066	17.101	1135	44.2
4.87518	18.182	673	26.2
4.71380	18.810	988	38.5
4.09211	21.700	552	21.5
4.00937	22.153	399	15.5
3.76619	23.603	226	8.8
3.55534	25.025	1025	39.9
3.35547	26.542	162	6.3
3.20310	27.830	135	5.3
3.08747	28.894	184	7.2
2.94178	30.359	184	7.2
2.83532	31.528	220	8.6
2.46449	36.426	170	6.6
2.36407	38.031	125	4.9
2.28144	39.465	116	4.5