

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 405**

51 Int. Cl.:  
**C07D 413/14** (2006.01)  
**A61K 31/4375** (2006.01)  
**A61K 31/4709** (2006.01)  
**C07D 471/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09742552 .4**  
96 Fecha de presentación: **08.05.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2296651**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2011**

54 Título: **Derivados de 5-hidroximetil-oxazolidin-2-ona para el tratamiento de enfermedades intestinales bacterianas**

30 Prioridad:  
**09.05.2008 WO PCT/IB2008/051854**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.11.2012**

73 Titular/es:  
**ACTELION PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)**  
**Gewerbstrasse 16**  
**4123 Allschwil, CH**

72 Inventor/es:  
**HUBSCHWERLEN, CHRISTIAN y**  
**LOCHER, HANS**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 390 405 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

Derivados de 5-hidroxi-metil-oxazolidin-2-ona para el tratamiento de enfermedades intestinales bacterianas

La presente invención se refiere al uso de ciertos derivados de 5-hidroxi-metil-oxazolidin-2-ona para la prevención o el tratamiento de enfermedades intestinales que son causadas por *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus*.

Ciertas cepas de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus* producen toxinas que causan diarrea. Frecuentemente, la incidencia de estas cepas productoras de toxinas está relacionada con el uso de antibióticos.

Entre estas cepas, *Clostridium difficile*, una bacteria anaeróbica grampositiva formadora de esporas que produce dos enterotoxinas (A y B), no sólo causa diarrea sino también afecciones intestinales más serias tal como colitis pseudomembranosa que es una amenaza letal. Actualmente es la fuente más común de diarrea infecciosa en hospitales y en las instalaciones de cuidados médicos de largo plazo en el mundo industrializado. Durante los últimos años, su incidencia ha aumentado progresivamente y ahora es un problema clínico significativo en América del Norte y en Europa. Los factores de riesgo incluyen tratamiento previo con antibióticos, edad y un sistema inmune comprometido que resulta por ejemplo de una quimioterapia citotóxica o del trasplante de órganos.

El tratamiento actual para diarrea asociada con *Clostridium difficile* (CDAD) es ya sea vancomicina o metronidazol. Sin embargo, en ambos casos se observan altas tasas de recaída y no se evita la producción de toxinas y de esporas. Más aún, el tratamiento con vancomicina o metronidazol es un factor adicional de promoción de la aparición de cepas resistentes a la vancomicina de *Enterococcus spp.* (*E. faecalis* y *E. faecium*) y de *Staphylococcus aureus* (VRE y VRSA, respectivamente) en el intestino (véase W.N. Al-Nassir *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, publicado antes de impresión el 28 de abril de 2008). Los *Enterococci* son *cocci* Gram positivos que se encuentran de manera natural en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, también pueden convertirse en patógenos significativos, causando endocarditis e infecciones del tracto urinario, sistema sanguíneo y de heridas. Una vez adquirida, la colonización intestinal por VRE puede durar varios años, sirviendo como una reserva para una infección potencial del paciente colonizado y para la propagación de VRE a otros pacientes. El VRE puede aparecer como una co-infección en pacientes infectados con *C. difficile*, o de manera más común causa infección en ciertos pacientes de alto riesgo tales como los pacientes hematológicos y oncológicos, los pacientes en las unidades de cuidado intensivo, los pacientes de edad avanzada y en las instalaciones de cuidados médicos de largo plazo, y en pacientes que han recibido trasplantes de órganos sólidos.

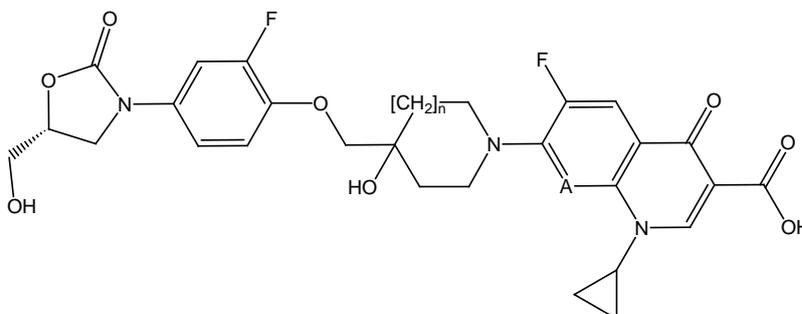
Por lo tanto, existe una necesidad de un mejor tratamiento para los casos de CDAD y las infecciones relacionadas, en particular mediante la identificación de compuestos con una fuerte actividad contra *C. difficile* que reduzca de manera significativa la carga de toxina, la producción de esporas y que supere la VRE y que a la vez tenga un impacto reducido en la flora intestinal comensal.

En los documentos WO 03/032962, WO 2004/096221 y WO 2005/058888 se divulgan compuestos antibacterianos que contienen una fracción oxazolidina y un ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico o ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidro-[1,8]naftiridin-3-carboxílico.

Además, los compuestos de fórmula I tal como se lo define anteriormente y su actividad antibacteriana han sido previamente descritos en la publicación PCT N° PCT/IB2007/054557.

A continuación se presentan diversas realizaciones de la invención:

i) De acuerdo con su primera realización principal, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula I



I

2

en la que

A es N o CH; y

n es 0 ó 1;

- 5 o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades intestinales que son causadas por bacterias seleccionadas de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus*.

Los siguientes párrafos proporcionan definiciones de diversos términos empleados en este texto y están destinadas a ser aplicadas de manera uniforme a través de la memoria descriptiva y reivindicaciones salvo que otra definición expresamente presentada proporcione un significado más amplio o más restrictivo.

- 10 El término “previniendo”, “prevenir” o “prevención”, empleado en referencia a una enfermedad significa, ya sea que dicha enfermedad no ocurre en el paciente o animal, o que, a pesar de que el animal o paciente están afectados por la enfermedad, parte o todos los síntomas de la enfermedad se ven, ya sea reducidos, o están ausentes.

- 15 El término “tratando”, “tratar”, o “tratamiento” empleado en referencia a una enfermedad significa ya sea que la enfermedad es curada en el paciente o animal, o que, a pesar de que el animal o paciente permanece afectado por la enfermedad, parte o todos los síntomas de la enfermedad se ven, ya sea disminuidos o eliminados.

El término “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales de adición de ácidos o bases, no tóxicas, orgánicas o inorgánicas. Se puede hacer referencia a “Salt selection for basic drugs”, *Int. J. Pharm.* (1986), 33, 201–217.

El término “halógeno” se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, y preferentemente a flúor o cloro.

- 20 Salvo respecto de las temperaturas, el término “alrededor de” ubicado antes de un valor numérico “X” se refiere en esta solicitud a un intervalo que se extiende desde X menos 10% de X hasta X más 10% de X, y preferentemente a un intervalo que se extiende desde X menos 5% de X hasta X más 5% de X. En el caso particular de las temperaturas, el término “alrededor de” ubicado antes de una temperatura “Y” se refiere en esta solicitud a un intervalo que se extiende desde la temperatura Y menos 10 °C hasta Y más 10 °C, y preferentemente a un intervalo que se extiende desde la temperatura Y menos 5 °C hasta Y más 5 °C; además, la temperatura ambiente significa en la presente solicitud 25 °C.

- 30 ii) Preferentemente, el compuesto de fórmula I tal como se lo define en la realización i), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, permitirá la prevención o el tratamiento efectivos de enfermedades de diarrea asociadas con cepas entero-tóxicas de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus* sin aumentar la concentración de enterococos resistentes a vancomicina (VRE) en el intestino.

iii) Más preferentemente, el compuesto de fórmula I tal como se lo define en la realización i), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, permitirá la prevención o el tratamiento efectivos de enfermedades de diarrea asociadas con cepas entero-tóxicas de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus* y la reducción de la concentración de VRE en el intestino.

- 35 iv) Preferentemente, los compuestos de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a iii), o la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, serán tales que A es CH.

v) También preferentemente, los compuestos de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a iv), o la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, serán tales que n es 1.

- 40 vi) De acuerdo con sub-realizaciones preferidas de las realizaciones i) a iii), el compuesto de fórmula I o sus sales farmacéuticamente aceptables serán seleccionados de entre:

– ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroxi-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico;

– ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroxi-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-[1,8]naftiridin-3-carboxílico;

- 45 – ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{3-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroxi-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-3-hidroxi-pirrolidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico;

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- vii) De acuerdo con subrealizaciones más preferidas de las realizaciones i) a iii), el compuesto de fórmula I o su sal farmacéuticamente aceptable será ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroxi-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 viii) De acuerdo con un aspecto de las realizaciones i) a vii), la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en el tratamiento de enfermedades intestinales que son causadas por bacterias seleccionadas de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.
- 10 ix) De acuerdo con un aspecto preferido de la realización viii), la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en el tratamiento de enfermedades intestinales que son causadas por *Clostridium difficile* (de manera destacable por una cepa de *Clostridium difficile* que produzca una toxina).
- 15 x) De acuerdo con otro aspecto principal de las realizaciones i) a vii), la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en la prevención de enfermedades intestinales que son causadas por bacterias seleccionadas de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.
- 20 xi) De acuerdo con un aspecto preferido de la realización x), la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o la sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso en la prevención de enfermedades intestinales que son causadas por *Clostridium difficile* (de manera destacable por una cepa de *Clostridium difficile* que produzca una toxina).
- 25 xii) Preferentemente, los pacientes en los cuales las enfermedades intestinales mencionadas en las realizaciones i) a xi) están destinadas a ser prevenidas, serán pacientes tratados con otros antibióticos o con terapias antivirales, pacientes con un sistema inmune comprometido tal como con quimioterapia citotóxica o pacientes de trasplante de órganos, pacientes de edad avanzada (65 o más años), o pacientes de unidades de cuidado intensivo o de instalaciones de cuidados médicos de largo plazo.
- 30 xiii) Aún otra realización principal de esta invención se refiere al uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad intestinal en un paciente, enfermedad que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, comprendiendo dicho uso la administración a dicho paciente de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, durante un período suficiente para la prevención o el tratamiento de la enfermedad intestinal.
- 35 xiv) Preferentemente, el uso de la realización xiii) permitirá la prevención o el tratamiento efectivos de enfermedades de diarrea asociadas con cepas enterotoxigénicas de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus* sin aumentar la concentración de enterococos resistentes a vancomicina (VRE) en el intestino.
- 40 xv) Más preferentemente, el método de la realización xiii) permitirá la prevención o el tratamiento efectivos de enfermedades de diarrea asociadas con cepas enterotoxigénicas de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus* y la reducción de la concentración de VRE en el intestino.
- 45 xvi) De acuerdo con un aspecto de las realizaciones xiii) a xv), la presente invención se refiere a un uso en el tratamiento de una enfermedad intestinal en un paciente, enfermedad que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, uso que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, durante un período suficiente para el tratamiento de la enfermedad intestinal.
- 50 xvii) De acuerdo con un aspecto preferido de la realización xvi), la presente invención se refiere a un uso en el tratamiento de una enfermedad intestinal en un paciente, enfermedad que es causada por *Clostridium difficile* (de manera destacable por una cepa de *Clostridium difficile* que produce una toxina).
- xviii) De acuerdo con otro aspecto de las realizaciones xiii) a xv), la presente invención se refiere a un uso en la prevención de una enfermedad intestinal en un paciente, enfermedad que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, uso que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, durante un período suficiente para prevenir la enfermedad intestinal.

xix) De acuerdo con un aspecto preferido de la realización xviii), la presente invención se refiere a un uso en la prevención una enfermedad intestinal en un paciente, enfermedad que es causada por *Clostridium difficile* (de manera destacable por una cepa que de *Clostridium difficile* que produce una toxina).

5 xx) Preferentemente, los pacientes sometidos a un uso de una de las realizaciones xiii) a xix) serán pacientes tratados con otros antibióticos o con terapias antivirales, pacientes con un sistema inmune comprometido tales como pacientes de quimioterapia citotóxica o pacientes de trasplante de órganos, pacientes de edad avanzada (65 o más años), o pacientes de unidades de cuidado intensivo o de instalaciones de cuidados médicos de largo plazo.

10 xxi) Aún un aspecto adicional de esta invención se refiere a el uso de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, para la producción de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de una enfermedad intestinal que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.

15 xxii) De acuerdo con un aspecto de la realización xxi), la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, para la producción de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad intestinal que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.

20 xxiii) De acuerdo con un aspecto preferido de la realización xxii), la enfermedad intestinal destinada a ser tratada será causada por *Clostridium difficile* (de manera destacable por una cepa de *Clostridium difficile* que produzca una toxina).

25 xxiv) De acuerdo con otro aspecto de la realización xxi), la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, para la producción de un medicamento destinado a la prevención de una enfermedad intestinal que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.

xxv) De acuerdo con un aspecto preferido de la realización xxiv), la enfermedad intestinal destinada a ser prevenida es causada por *Clostridium difficile* (de manera destacable por una cepa de *Clostridium difficile* que produzca una toxina).

30 xxvi) Preferentemente, los pacientes para los cuales el medicamento producido de acuerdo con una de las realizaciones xxi) a xxv) está destinado, serán pacientes tratados con otros antibióticos o con terapias antivirales, pacientes con un sistema inmune comprometido tal como bajo quimioterapia citotóxica o pacientes de trasplante de órganos, pacientes de edad avanzada (65 o más años), o pacientes de unidades de cuidado intensivo o de instalaciones de cuidados médicos de largo plazo.

35 xxvii) Otro aspecto de esta invención se refiere a un paraíso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad intestinal en un animal (por ejemplo, en un perro, gato, cerdo, vaca o caballo), enfermedad causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, uso que comprende la administración a dicho animal de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, durante un período suficiente para el tratamiento de la enfermedad intestinal.

40 xxviii) De acuerdo con un aspecto de la realización xxvii), la presente invención se refiere a un paraíso en el tratamiento de una enfermedad intestinal en un animal (por ejemplo, en un perro, gato, cerdo, vaca o caballo), enfermedad que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, uso que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, durante un período suficiente para el tratamiento de la enfermedad intestinal.

45 xxix) De acuerdo con otro aspecto de la realización xxvii), la presente invención se refiere a un uso en la prevención de una enfermedad intestinal en un animal (por ejemplo, en un perro, gato, cerdo, vaca o caballo), enfermedad que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, uso que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, durante un período suficiente para prevenir la enfermedad intestinal.

50 Las enfermedades intestinales destinadas a ser prevenidas o tratadas de acuerdo con las realizaciones i) a xxix) de esta invención comprenden, de manera destacable, diarrea, colitis y colitis pseudomembranosa. Preferentemente,

dichas enfermedades intestinales serán causadas por *Clostridium difficile* (y de manera especial por una cepa de *Clostridium difficile* que produce una toxina).

5 La vía de administración más adecuada para los compuestos de fórmula I usados de acuerdo con las realizaciones i) a xxix) de la presente invención será la vía oral. La administración puede ser diaria (por ejemplo, una a cuatro veces de manera diaria) o puede ser menos frecuente (por ejemplo, una vez cada dos días o dos veces por semana).

10 A pesar de que las dosis de administración exactas de un compuesto de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii), o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, deberán ser determinadas por el médico o veterinario tratante, se espera que una cantidad entre 0,5 y 50 mg de un compuesto de fórmula I o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo por kg de peso corporal del paciente por día (por ejemplo una cantidad entre 1 y 5 mg del compuesto de fórmula I o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo por kg de peso corporal del paciente por día) administrada una o dos veces por día durante un período de 3 a 15 días (por ejemplo, por un período de 7 a 14 días) sea apropiada.

15 La producción de composiciones farmacéuticas que contengan los compuestos de fórmula I tal como se lo define en una de las realizaciones i) a vii) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos puede llevarse a cabo de una manera que sea familiar para cualquier persona experimentada en la técnica (véase por ejemplo *Remington, The Science and Practice of Pharmacy*, 21<sup>a</sup> edición (2005), Parte 5, "Pharmaceutical Manufacturing" [publicado por Lippincott Williams & Wilkins]) llevando el compuesto de fórmula I descrito o sus sales farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en combinación con otras sustancias de valor terapéutico, a una forma de administración galénica con materiales portadores sólidos o líquidos no tóxicos, inertes adecuados, terapéuticamente compatibles, y, si se desea, con los adyuvantes farmacéuticos habituales.

20 Los compuestos de fórmula I pueden ser producidos de acuerdo con la presente invención empleando los procedimientos descritos a continuación.

### **Preparación de los compuestos de fórmula I**

#### Abreviaturas:

25 Las siguientes abreviaturas son empleadas en esta memoria descriptiva y ejemplos:

AcOH ácido acético

AD-mix  $\alpha$  1,4-bis(dihidroquinin)ftalazina,  $K_3Fe(CN)_6$ ,  $K_2CO_3$  y  $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$

AD-mix  $\alpha$  1,4-bis(dihidroquinidin)ftalazina,  $K_3Fe(CN)_6$ ,  $K_2CO_3$  y  $K_2OsO_4 \cdot 2H_2O$

Alloc aliloxicarbonilo

30 aq. acuoso

Boc terc-butoxicarbonilo

t-BuOK terc-butilato de potasio

Cbz benciloxicarbonilo

CDAD diarrea asociada a *Clostridium difficile*

35 CFU unidades formadoras de colonia

CLSI *Clinical Laboratory Standards Institute*

DBU 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DCM diclorometano

DIAD azodicarboxilato de diisopropilo

40 DIPEA N,N-diisopropiletilamina

DMF N,N-dimetilformamida

DMSO dimetilsulfóxido

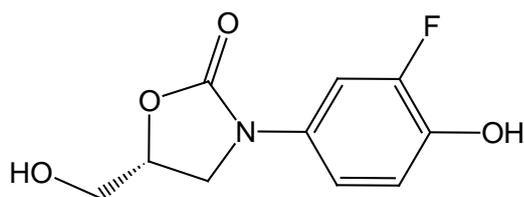
AcOEt acetato de etilo

	EDC	clorhidrato de 1-(dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
	ESI	ionización por electropulverización
	éter o Et <sub>2</sub> O	dietiléter
	FC	cromatografía <i>flash</i>
5	h	hora
	Hex	n-hexano
	CI50	concentración que reduce el efecto en un 50%
	LZD-R	resistente a linezolida
	MeCN	acetonitrilo
10	MCPBA	ácido meta-cloroperbenzóico
	CIM	concentración inhibitoria mínima para inhibir el crecimiento bacterial
	CIM90	concentración inhibitoria mínima para inhibir el crecimiento de ≥ 90% de las cepas
	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
	MeOH	metanol
15	EM	Espectroscopía de masas
	NaOMe	metilato de sodio
	NMP	N-metilpirrolidinona
	DO <sub>595</sub>	densidad óptica medida a 595 nm
	org.	orgánico
20	Pd/C o Pd(OH) <sub>2</sub> /C	paladio o dihidroxipaladio en carbón
	PPh <sub>3</sub>	trifenilfosfina
	rt	temperatura ambiente
	sat.	saturado
	SiO <sub>2</sub>	gel de sílice
25	TBDMSCI	cloruro de terc-butildimetilsililo
	TEA	triethylamina
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	TMSCI	cloruro de trimetilsililo

30 Métodos generales de preparación:

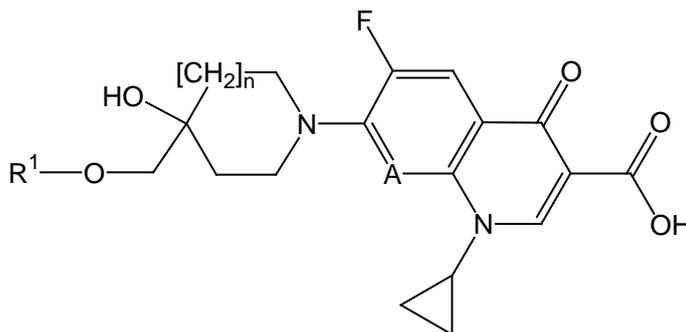
Los compuestos de fórmula I pueden ser producidos de acuerdo con la presente invención mediante

a) la reacción del compuesto de fórmula II



II

con un compuesto de fórmula III

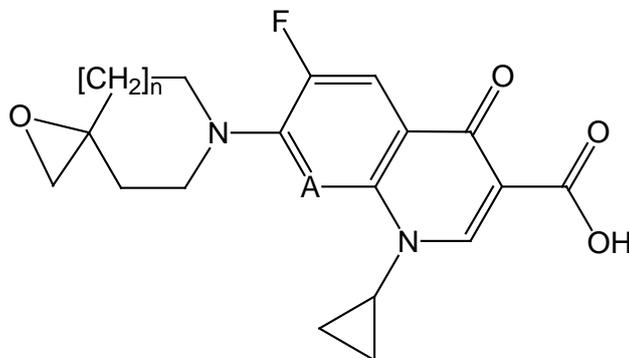


III

5 en la que n y A son tal como se define en la fórmula I y R<sup>1</sup> es (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)alquilsulfonilo (por ejemplo, metilsulfonilo), trifluorometilsulfonilo o arilsulfonilo (por ejemplo fenil- o p-tolil-sulfonilo) preferentemente entre alrededor de 10 °C y 100 °C (más preferentemente entre alrededor de 40 °C y 80 °C), en presencia de una base inorgánica tal como K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o de una base orgánica tal como TEA en un disolvente orgánico (por ejemplo DMF);

10 o

b) mediante la reacción de un compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula IV

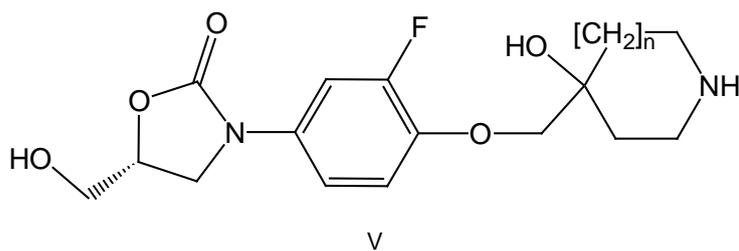


IV

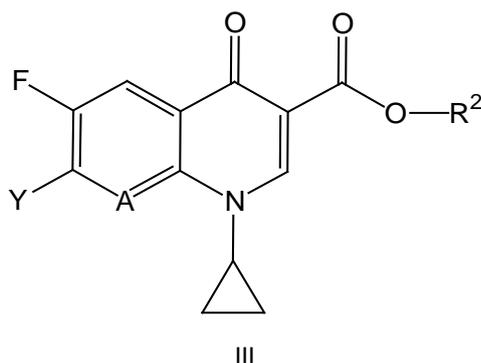
15 en el que n y A son tal como se define en la fórmula I, tal como se describe en la sección a). Dichos compuestos de fórmula IV pueden obtenerse mediante el tratamiento de compuestos de fórmula III en presencia de una base orgánica (por ejemplo TEA) o de una base inorgánica (por ejemplo K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o un metilato alcalino tal como NaOMe o un hidruro alcalino tal como NaH) en un disolvente orgánico (por ejemplo DMF);

o

c) mediante la reacción de un compuesto de fórmula V



en la que n es tal como se define en la fórmula I,  
con un compuesto de fórmula VI



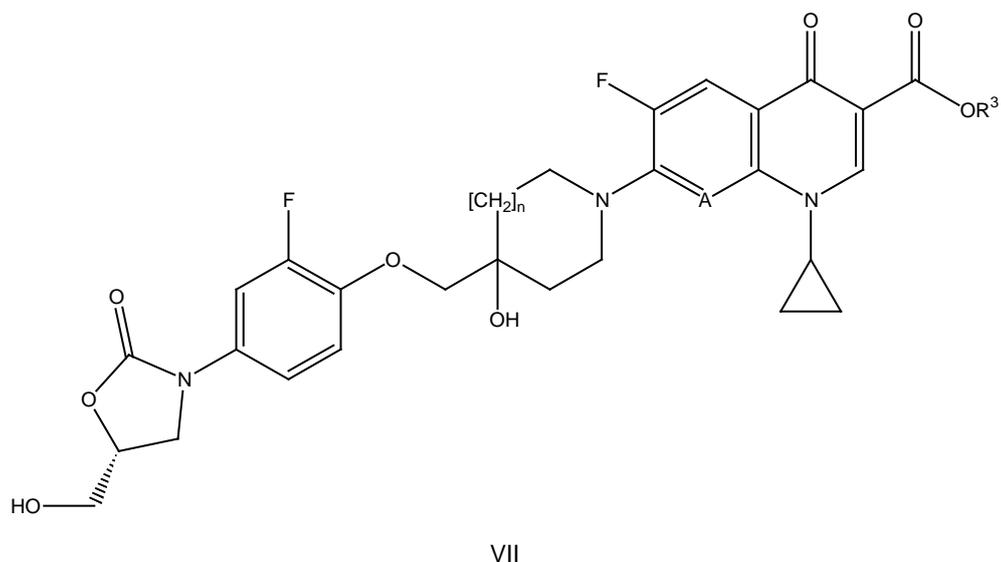
5

10

en la que A es tal como se define en la fórmula I, Y es halógeno y R<sup>2</sup> es hidrógeno, BF<sub>2</sub> o B(OC(=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquil)<sub>2</sub>, (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilo (por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo o terc-butilo), alilo, aril-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilo (por ejemplo bencilo, p-nitrobencilo o p-metoxibencilo), tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilsililo (por ejemplo trimetilsililo o terc-butildimetilsililo) o diaril-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilsililo (por ejemplo terc-butildifenilsililo), preferentemente entre alrededor de 10 °C y 100 °C, más preferentemente entre alrededor de 40 °C y 80 °C en presencia de una base orgánica, tal como TEA o DIPEA, en un disolvente orgánico, por ejemplo NMP;

o

d) mediante la conversión de un compuesto de fórmula VII



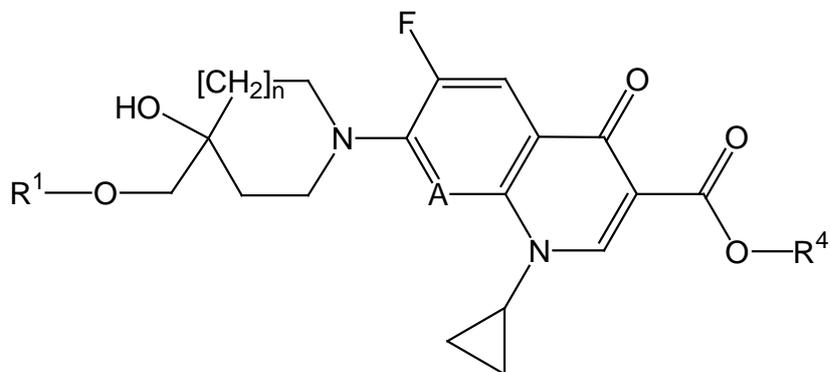
15

en la que R<sup>3</sup> es (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilo (por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo o terc-butilo), aril-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilo (por ejemplo bencilo, p-nitrobencilo o p-metoxibencilo), alilo, tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilsililo (por ejemplo trimetilsililo o terc-butildimetilsililo) o diaril-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilsililo (por ejemplo terc-butildifenilsililo) y n y A son tal como se define en la

fórmula I en el compuesto de fórmula I correspondiente mediante hidrólisis, saponificación o hidrógenolisis (por ejemplo tal como se revisa en *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994)).

Respecto del procedimiento anterior, se debe hacer notar lo siguiente:

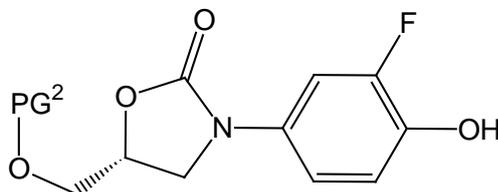
- 5 ❖ a propósito de la variante a), el compuesto de fórmula III también podría ser reemplazado por un éster del mismo, *i.e.* un compuesto de fórmula III<sub>E</sub>



III<sub>E</sub>

- 10 en la cual n, A y R<sup>1</sup> son tal como se define en la fórmula III y R<sup>4</sup> representa alquilo, alilo o arilalquilo, caso en el cual una etapa de desprotección de éster seguiría a la reacción del compuesto de fórmula III<sub>E</sub> con el compuesto de fórmula II (los métodos generales para llevar a cabo la desprotección de ésteres han sido recopilados en *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994));

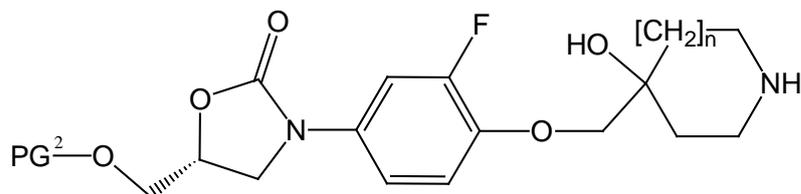
- ❖ a propósito de la variante a), el compuesto de fórmula II también podría ser reemplazado por un éter de sililo del mismo, *i.e.* un compuesto de fórmula II<sub>PG</sub>



II<sub>PG</sub>

- 15 en la que PG<sup>2</sup> representa un grupo protector sililo para una función alcohol tal como un tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilsililo (por ejemplo trimetilsililo o terc-butildimetilsililo) o diaril-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilsililo (por ejemplo terc-butildifenilsililo), caso en el cual una etapa de desprotección seguiría a la reacción del compuesto de fórmula III o III<sub>E</sub> con el compuesto de fórmula II<sub>PG</sub> (los métodos generales para llevar a cabo tales reacciones han sido recopilados en *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994));

- 20 ❖ a propósito de la variante c), el compuesto de fórmula V también podría ser reemplazado por un compuesto de fórmula V<sub>p</sub>



V<sub>P</sub>

- 25 en la que n es tal como se define en la fórmula V y PG<sup>2</sup> representa un grupo protector de una función alcohol (por ejemplo un grupo alquilsililo o diarilalquilsililo tal como trimetilsililo, terc-butildimetilsililo o terc-butildifenilsililo), caso en el cual la etapa apropiada de desprotección seguiría a la reacción del compuesto de

fórmula V<sub>P</sub> con el compuesto de fórmula VI (los métodos generales para llevar a cabo tales reacciones han sido recopilados en *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994));

- ❖ a propósito de la variante c), cuando R<sup>2</sup> no es H, se requiere una etapa adicional de desprotección de éster (los métodos generales para llevar a cabo tales reacciones han sido recopilados en *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994)), salvo para los casos en los que R<sup>2</sup> es BF<sub>2</sub> o B(OC(=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquil)<sub>2</sub> en los cuales la hidrólisis ya tiene lugar durante el procesamiento ácido.

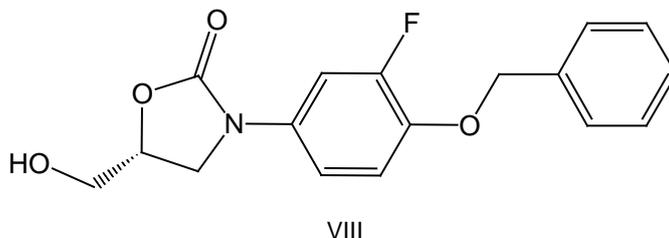
Los compuestos de fórmula I así obtenidos pueden, si se desea, ser convertidos en sus sales, y de manera destacable en sus sales farmacéuticamente aceptables.

- De manera adicional, cuando los compuestos de fórmula I se obtengan en la forma de mezclas de enantiómeros, los enantiómeros pueden ser separados empleando métodos conocidos por las personas experimentadas en la técnica (por ejemplo mediante la formación y separación de sales diastereoméricas o mediante cromatografía empleando una fase estacionaria quiral). Cuando los compuestos de fórmula I sean obtenidos en la forma de mezclas de diastereómeros se los puede separar mediante una combinación adecuada de técnicas de cromatografía usando gel de sílice, HPLC y cristalización.

15 Preparación de los diversos intermedios de síntesis:

*Preparación del compuesto de fórmula II*

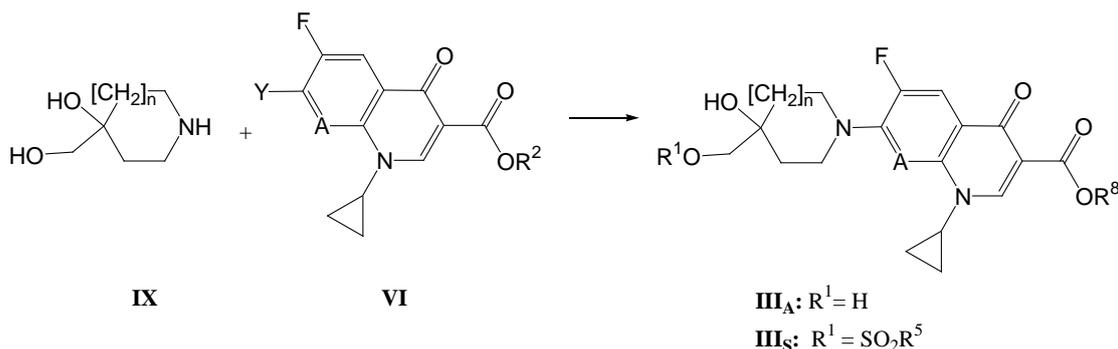
El compuesto de fórmula II puede ser obtenido mediante la hidrogenación del compuesto de fórmula VIII



- 20 sobre un catalizador de metal noble tal como paladio en carbón en un disolvente tal como THF, MeOH o AcOEt entre 0 °C y 40 °C o mediante hidrólisis en presencia de una solución de HBr en agua o AcOH entre 0 °C y 80 °C en un disolvente tal como AcOH.

*Preparación de los compuestos de fórmula III*

Los compuestos de fórmula III pueden prepararse tal como se resume en el Esquema 1 a continuación.



25

**Esquema 1**

En el Esquema 1, R<sup>2</sup> es H, alquilo, alilo o arilalquilo, y los demás símbolos son tal como se ha definido previamente.

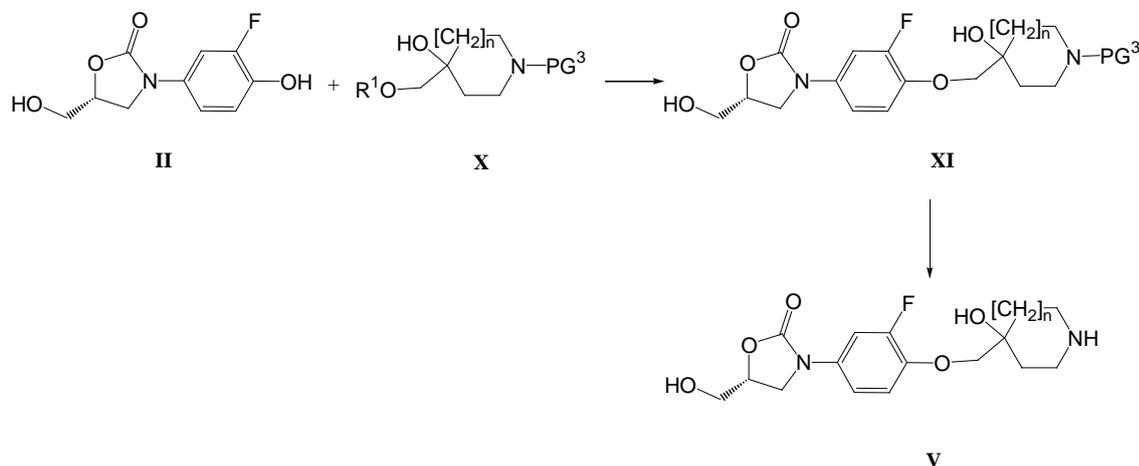
- Los compuestos de fórmula III en los cuales R<sup>1</sup> es SO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>, siendo R<sup>5</sup> alquilo, trifluorometilo o arilo tal como fenilo o p-tolilo pueden obtenerse (Esquema 1) a partir de los compuestos de fórmula III<sub>A</sub> en los cuales R<sup>1</sup> es H mediante la reacción con los cloruros de sulfonilo correspondientes en presencia de una base orgánica tal como TEA en un disolvente tal como DCM o THF entre -10 °C y 50 °C. Los compuestos de fórmula III<sub>A</sub> pueden prepararse mediante la reacción de los compuestos de fórmula VI con las piperidinas o pirrolidinas de fórmula IX en presencia de una base orgánica tal como TEA o DIPEA entre 40 °C y 100 °C en un disolvente tal como THF, DMF o NMP. Si R<sup>2</sup> es

30

bencilo, el ácido carboxílico de fórmula III<sub>S</sub> puede ser liberado de acuerdo con procedimientos estándar tal como se describe en *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994) (por ejemplo hidrogenación empleando Pd/C).

#### Preparación de los compuestos de fórmula V

Los compuestos de fórmula V pueden prepararse tal como se resume en el Esquema 2 a continuación.



5

#### Esquema 2

Los compuestos de fórmula V pueden obtenerse mediante la desprotección de los compuestos de fórmula XI en los cuales PG<sup>3</sup> representa un grupo amino protector tal como alcoxycarbonilo (por ejemplo Boc), benciloxycarbonilo (por ejemplo Cbz), Alloc o bencilo. Los métodos generales para llevar a cabo tales secuencias de protección/desprotección de aminas secundarias han sido recopilados en *Protecting groups*, Kocienski, P.J., *Thieme* (1994).

Los compuestos de fórmula XI pueden obtenerse mediante la reacción de un compuesto de fórmula II con los compuestos de fórmula X en la que R<sup>1</sup> es SO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>, siendo R<sup>5</sup> alquilo, trifluorometilo o arilo tal como fenilo o p-tolilo, o mediante la reacción de un compuesto de fórmula II con los epóxidos correspondientes derivados de los compuestos de fórmula X. Dichos epóxidos pueden obtenerse a partir de los compuestos de fórmula X, en la que R<sup>1</sup> es SO<sub>2</sub>R<sup>5</sup> luego de tratamiento con ya sea una base orgánica tal como TEA, piridina o DBU o con una base inorgánica tal como K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en un disolvente tal como THF, éter o DCM entre -10 °C y 40 °C. Los compuestos de fórmula X en la que R<sup>1</sup> es H están ya sea disponibles en el comercio (por ejemplo compuestos X en los cuales PG<sup>3</sup> = Boc, n = 1 y R<sup>1</sup> = H, o el epóxido derivado de los compuestos de fórmula X en los cuales PG<sup>3</sup> = Boc, n = 0), o pueden prepararse tal como se explica más adelante. De manera alternativa, los compuestos de fórmula XI pueden obtenerse mediante la reacción del compuesto de fórmula II con los compuestos de fórmula X en los cuales R<sup>1</sup> es H bajo condiciones de Mitsunobu.

#### Preparación de los compuestos de fórmula VI

Los compuestos de fórmula VI en la que R<sup>2</sup> es hidrógeno, Me o Et están disponibles en el comercialmente (por ejemplo compuestos en los cuales A = CH, Y = Cl y R<sup>2</sup> = H, Me o Et, o Y = F y R<sup>2</sup> = BF<sub>2</sub>, o compuestos en los cuales A = N, Y = Cl y R<sup>2</sup> = H o Et). Los compuestos de fórmula VI en la que R<sup>2</sup> es B(OC(=O)(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquil)<sub>2</sub> pueden obtenerse a partir de los compuestos de fórmula VI en los cuales R<sup>2</sup> es H de acuerdo con WO 88/07998. Los demás compuestos de fórmula VI pueden obtenerse de acuerdo con métodos convencionales a partir de los compuestos de fórmula VI en la que R<sup>2</sup> es H.

#### Preparación de los compuestos de fórmula VII

Los compuestos de fórmula VII pueden obtenerse mediante el acoplamiento de compuestos de fórmula V o, de manera alternativa, compuestos de fórmula V<sub>P</sub> tal como se ha definido previamente con compuestos de fórmula VI tal como se ha definido anteriormente salvo que R<sup>2</sup> representa (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilo (por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo o terc-butilo), aril-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilo (por ejemplo bencilo, p-nitrobencilo o p-metoxibencilo), alilo, tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilsililo (por ejemplo trimetilsililo o terc-butildimetilsililo) o diaril-(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alquilsililo (por ejemplo terc-butildifenilsililo), bajo las mismas condiciones que aquellas descritas para la reacción de los compuestos de fórmula V con los compuestos de fórmula VI. Si se emplean los compuestos de fórmula V<sub>P</sub>, la etapa de desprotección se puede llevar a cabo después de la reacción de acoplamiento.

35

*Preparación de los compuestos de fórmula VIII*

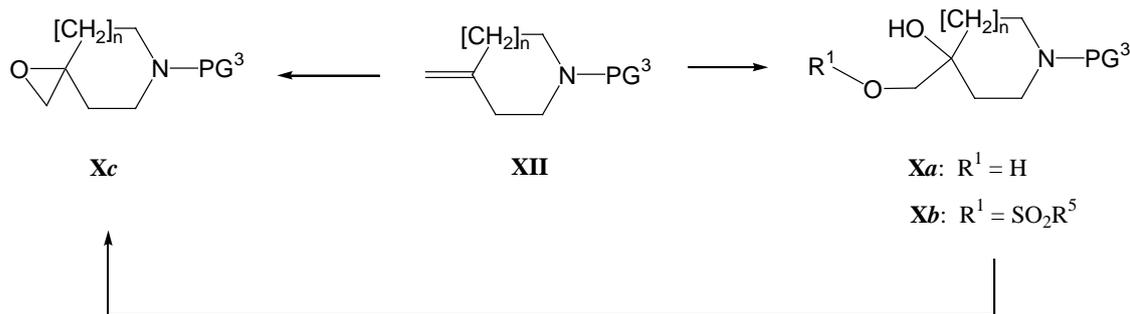
El compuesto de fórmula VIII puede obtenerse de acuerdo con WO 2004/096221.

*Preparación de los compuestos de fórmula IX*

5 Los compuestos de fórmula IX pueden obtenerse mediante la desprotección de los compuestos de fórmula X ( $R^1 = H$ ), por ejemplo mediante tratamiento de los compuestos correspondientes Boc protegidos con TFA o mediante hidrogenación de los compuestos correspondientes Cbz protegidos empleando Pd/C.

*Preparación de los compuestos de fórmula X*

Los compuestos de fórmula X pueden prepararse a partir de derivados metilideno de fórmula XII tal como se resume en el Esquema 3 a continuación.



10

**Esquema 3**

15

20

25

Los compuestos de fórmula Xb, *i.e.* los compuestos de fórmula X en la que  $R^1$  es  $\text{SO}_2R^5$ , se preparan a partir de los compuestos correspondientes de fórmula Xa en los cuales  $R^1$  es H empleando los mismos métodos empleados para la conversión de los compuestos de fórmula III<sub>A</sub> en compuestos de fórmula III<sub>S</sub>. Los compuestos de fórmula Xa se obtienen ya sea a partir de los derivados metilideno conocidos de fórmula XII (por ejemplo aquellos en los cuales  $n = 0$  y  $\text{PG}^3 =$  bencilo, Boc o benciloxicarbonilo – véase EP 241206 y EP 550025; o aquellos en los cuales  $n = 1$  y  $\text{PG}^3 =$  bencilo, Boc, que están disponibles en el comercio) ya sea mediante *cis*-dihidroxiclación catalizada con tetróxido de osmio o mediante su versión asimétrica (dihidroxiclación de *Sharpless* empleando AD-mix  $\alpha$  o  $\beta$ ) tal como se describe en *J. Am. Chem. Soc.* (1988), 110, 1968. Los compuestos de fórmula Xc, *i.e.* el derivado epóxido de los compuestos de fórmula Xb se obtienen ya sea mediante cierre intramolecular del anillo de los compuestos de fórmula Xb con una base inorgánica tal como  $\text{K}_2\text{CO}_3$  o NaH o con una base orgánica tal como TEA o DBU, o mediante epoxidación del doble enlace metilideno de los compuestos de fórmula XII con un perácido tal como MCPBA. De manera alternativa, los compuestos de fórmula Xc también pueden obtenerse mediante la reacción de los derivados oxo correspondientes (disponibles en el comercio cuando  $n = 0$  ó 1 y  $\text{PG}^3 =$  Cbz o Boc) con yoduro de trimetilsulfonio o yoduro de trimetilsulfonio en presencia de un hidróxido alcalino tal como hidróxido de potasio en un disolvente polar tal como MeCN entre 20 y 100 °C (tal como se describe en *J. Am. Chem. Soc.* (1965), 87, 1353–1364 y *Tetrahedron Lett.* (1987), 28, 1877–1878).

En los siguientes Ejemplos se describen realizaciones particulares de la invención, lque sirven para ilustrar la invención con mayor detalle sin limitar su alcance de ninguna manera.

30

**Ejemplos**

35

Todas las temperaturas se presentan en °C. Todas las investigaciones de HPLC analíticas y preparativas en fases no quirales se llevan a cabo empleando columnas basadas en RP-C18. Las investigaciones de HPLC analítica se llevan a cabo en dos instrumentos diferentes con tiempos de ciclo de ~2,5 min y ~3,5 min respectivamente. Salvo que se indique de otra manera, los valores indicados para las EM corresponden a los picos principales ((M+H)<sup>+</sup> con una variación de +/- 0,5 unidades). En los espectros de RMN, las constantes de acoplamiento J se presentan en Hz.

Procedimiento estándar de procesamiento:

40

Después de dilución en el disolvente orgánico apropiado (véase el texto correspondiente en el Ejemplo), la fase orgánica es separada y secuencialmente lavada con agua y con solución salina. En el caso en que la reacción se lleve a cabo en un disolvente soluble en agua (por ejemplo, MeOH, THF o DMF), las fases acuosas combinadas se vuelven a extraer con el mismo disolvente empleado para realizar el procesamiento. Las fases orgánicas combinadas se secan empleando  $\text{MgSO}_4$  y se filtran. El filtrado se evapora bajo presión reducida.

Procedimiento estándar de cromatografía:

El material crudo se disuelve en el mínimo de eluyente (véase el texto correspondiente en el Ejemplo) y se somete a cromatografía empleando SiO<sub>2</sub>. Las fracciones relevantes son retiradas y evaporadas bajo presión reducida.

5 **Ejemplo 1: ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico:**

1.i. (R)-3-(3-fluoro-4-hidroxi-fenil)-5-hidroximetil-oxazolidin-2-ona:

10 Una solución de (R)-3-(4-benciloxi-3-fluoro-fenil)-5-hidroximetil-oxazolidin-2-ona (6,34 g, preparada de acuerdo con WO 2004/096221) en THF/MeOH (1:1; 200 ml) se hidrogena empleando Pd/C 10% (1 g) durante toda la noche. El catalizador se retira mediante filtración, el filtrado se evapora bajo presión reducida y el residuo se agita en EA. Los cristales son recolectados mediante filtración, obteniéndose 3,16 g (70% de rendimiento) de un sólido incoloro.

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

EM (ESI): 228,1.

15 **1.ii. bencil éster de ácido 4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-carboxílico:**

20 Una solución del intermedio 1.i (1,27 g) y bencil éster de ácido 1-oxa-6-aza-spiro[2.5]octan-6-carboxílico (1,60 g; preparado de acuerdo con US 4.244.961) se disuelve en DMF (15 ml) y se trata con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,16 g). La mezcla se calienta a 100 °C durante toda la noche. El residuo obtenido después del procesamiento (DCM) se agita en EA, y el sólido se recoge mediante filtración y secuencialmente se lava con AcOEt y con Hex, obteniéndose 2,52 g (94,5% de rendimiento) de un sólido beige.

RMN de <sup>1</sup>H (DMSO<sub>d6</sub>; δ ppm): 1,57 (m, 4H), 3,14 (m, 2H), 3,54 (m, 1H), 3,64 (m, 1H), 3,79 (m, 5 H), 4,03 (t, J = 9,1, 1 H), 4,66 (m, 1 H), 4,78 (s, 1 H), 5,05 (s, 2 H), 5,16 (t, J = 5,6, 1 H), 7,18 (m, 2 H), 7,32 (m, 5 H), 7,55 (d, J = 12, 1 H).

EM (ESI): 475,0.

25 **1.iii. (R)-3-[3-fluoro-4-(4-hidroxi-piperidin-4-ilmetoxi)-fenil]-5-hidroximetil-oxazolidin-2-ona:**

Una suspensión del intermedio 1.ii (2,5 g) en EA/MeOH (1:1; 100 ml) es hidrogena empleando Pd/C durante 48 h. La suspensión se calienta a 40 °C y el catalizador se retira mediante filtración. El filtrado se evapora empleando presión reducida obteniendo 1,61 g (89% de rendimiento) de un polvo amarillo.

30 RMN de <sup>1</sup>H (DMSO<sub>d6</sub>; δ ppm): 1,4-1,63 (m, 4H), 2,67 (m, 2H), 2,83 (m, 2H), 3,53 (dd, J = 4,0, 12,0, 1H); 3,66 (dd, J = 3,3, 12,0, 1H), 3,71 (s, 2H); 3,80 (m, 1H), 4,05 (t, J = 9,0, 1H), 4,48 (s, 1H), 4,68 (m, 1H), 5,20 (s, 1H), 7,20 (m, 2H), 7,57 (d, 1H).

EM (ESI): 341,5.

**1.iv. ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico:**

35 Una solución del intermedio 1.iii (200 mg), complejo diacetato de boro ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico (241 mg; preparado de acuerdo con WO 88/07998) y DIPEA (100 μl) en NMP (2 ml) se agita a 85 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se evapora bajo presión reducida y el residuo se recoge en HCl 5 M en MeOH (3 ml) y se agita. El sólido resultante se recoge mediante filtración y lavado con MeOH para obtener 230 mg (67% de rendimiento) de un sólido amarillo.

40 RMN de <sup>1</sup>H (DMSO<sub>d6</sub>; δ ppm): 1,66-1,35 (m, 4H), 1,75 (d, J = 12,8, 2H), 1,95 (m, 2H), 3,33 (t amplio, J = 11,0, 2H), 3,57 (m, 3H), 3,67 (dd, J = 12,3, 3,3, 1H), 3,83 (m, 2H), 3,92 (s, 2H), 4,06 (t, J = 9,0, 1H), 4,69 (m, 1H), 7,24 (m, 2H), 7,60 (m, 2H), 7,90 (d, J = 13,3, 1H), 8,66 (s, 1H).

EM (ESI): 585,9.

45 **Ejemplo 2: ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-[1,8]naftiridin-3-carboxílico:**

Una solución de ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-1,8-naftiridin-3-carboxílico (166 mg; producto comercial) y del intermedio 1.iii (200 mg) en NMP (5 ml) se trata con TEA (0,32 ml) y TMSCl y se calienta a 85 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se evapora bajo presión reducida y el residuo se recoge en HCl 5 M en MeOH (3 ml) y se agita durante 30 min. La solución se evapora bajo presión reducida y el residuo se recoge en EA. El sólido resultante se recoge mediante filtración y se lava con EA, obteniéndose 271 mg (78% de rendimiento) de un sólido amarillo.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 0,89–1,27 (m, 4H); 1,78 (d,  $J = 12,8$ , 2H); 1,90–2,04 (m, 2H); 3,53–3,88 (m, 6H); 3,88 (s, 2H), 4,06 (t,  $J = 9,0$ , 1H), 4,42 (d amplio,  $J = 13,2$ , 2H), 4,44 (m, 1H); 7,11 (m, 2H); 7,55 (d,  $J = 14,5$ , 1H); 8,05 (d,  $J = 13,5$ , 1H); 8,60 (s, 1H).

EM (ESI): 586,8.

**Ejemplo 3: ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-((RS)-3-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-3-hidroxi-pirrolidin-1-il)-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico:**

*3.i. bencil éster de ácido dialil-carbámico:*

Se agrega cloruro de benzoilo (15,5 ml) gota a gota durante 30 min a una solución de dialilamina (12,3 ml) y TEA (21 ml) en DCM (100 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 h. El residuo obtenido después del procesamiento (DCM) se purifica mediante cromatografía (Hex/EA 95:5) para proveer 20,71 g (88% de rendimiento) de un líquido incoloro.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 3,83 (dt,  $J = 1$  y  $J = 6$ , 4H); 5,05–5,18 (m, 6H); 5,70–5,86 (m, 2H); 7,27–7,48 (m, 5H).

*3.ii. bencil éster de ácido 2,5-dihidro-pirrole-1-carboxílico:*

Se agrega benciliden-bis(triciclohexilfosfin)diclororutenio (5 g) a una solución del intermedio 3.i (17,56 g) en DCM (1,5 l) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agita a 40 °C durante 2 h y se concentra *in vacuo*. El residuo se purifica mediante FC (Hex/EA 90:10) para proveer 14,08 g (91% de rendimiento) de un líquido amarillo.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 4,05–4,16 (m, 4H); 5,08 (s, 2H); 5,81–5,92 (m, 2H); 7,27–7,41 (m, 5H).

*3.iii. bencil éster de ácido (RS)-3-hidroxi-pirrolidin-1-carboxílico:*

Se agrega una solución 1 M de borano en THF (9 ml) a una solución del intermedio 3.ii (1,81 g) en THF (25 ml) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 h y es enfriada a 0 °C. Se agrega cuidadosamente NaOH 20% (1,8 ml) gota a gota seguido de peróxido de hidrógeno acuoso al 35% (1,2 ml). La mezcla se agita a 0 °C durante 30 min y a temperatura ambiente durante 2 h. Se añaden  $\text{Et}_2\text{O}$  y una solución acuosa al 40% de bisulfito de sodio y la mezcla de reacción se agita vigorosamente durante 15 min. El residuo obtenido después del procesamiento ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) se purifica mediante FC (Hex/EA 5:5 hasta 3:7) para proveer 1,01 g (51% de rendimiento) de un aceite incoloro.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 1,67–1,82 (m, 1H); 1,82–1,96 (m, 1H); 3,16–3,25 (m, 1H); 3,28–3,44 (m, 3H); 4,20–4,29 (amplio, 1H); 4,92 (d,  $J = 3$ , 1H); 5,06 (s, 2H); 7,27–7,41 (m, 5H).

*3.iv. bencil éster de ácido 3-oxo-pirrolidin-1-carboxílico:*

Una solución del intermedio 3.iii (1,10 g) en DCM (8 ml) se enfría a 0 °C y se agrega DIPEA (2,5 ml) gota a gota, seguido de una solución de complejo piridina trióxido de azufre (1,79 g) en DMSO (6,5 ml). La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 1 h y se apaga mediante la adición de agua (6 ml). La fase acuosa se extrae con  $\text{Et}_2\text{O}$ /Hex (1:1, 3 x 5 ml) y las fases orgánicas combinadas se concentran *in vacuo*. El residuo obtenido después del procesamiento ( $\text{Et}_2\text{O}$ /Hex 1:1) se purifica mediante FC (Hex/EA 5:5) proporcionando 1,05 g (96% de rendimiento) de un aceite amarillento.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 2.48–2.61 (m, 2H); 3.61–3.80 (m, 4H); 5.09 (s, 2H); 7.27–7.41 (m, 5H).

*3.v. bencil éster de ácido 3-metilen-pirrolidin-1-carboxílico:*

Se agrega t-BuOK (617 mg) en una porción a una suspensión blanca de bromuro de metil trifenilfosfonio (1,98 g) en THF (10 ml) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La suspensión amarilla se agita a temperatura ambiente durante 1 h y luego se enfría a -10 °C. Se agrega gota a gota una solución del intermedio 3.iv (1,05 g) en THF (2 ml) durante 10 min y la mezcla de reacción se deja entibiar hasta temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se apaga mediante la adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso saturado (1 ml) y se diluye con EA. El residuo obtenido después del

procesamiento (EA) se purifica mediante cromatografía (Hex/EA 90:10) para proveer 633 mg (64% de rendimiento) de un líquido amarillento.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 2,48–2,61 (m, 2H); 3,36–3,53 (m, 2H); 3,84–4,01 (m, 2H); 4,97–5,03 (m, 2H); 5,08 (s, 2H); 7,27–7,41 (m, 5H).

5 **3.vi. bencil éster de ácido 1-oxa-5-aza-spiro[2.4]heptan-5-carboxílico:**

Una solución del intermedio 3.v (7,21 g) en DCM (400 ml) es tratada con MCPBA (20,1 g) y  $\text{NaHCO}_3$  (22,3 g) a temperatura ambiente. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, se diluye con DCM (200 ml) y se vierte en una solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (45 g) en agua (400 ml). La mezcla se agita durante 10 min y la fase orgánica se separa. El residuo obtenido después del procesamiento (DCM) se purifica mediante FC (Hex/EA 6:4) para proveer 4,37 g (56% de rendimiento) de un aceite amarillo.

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 1,70–1,83 (m, 1H); 2,22–2,37 (m, 1H); 2,90–2,94 (m, 1H); 2,95–2,99 (m, 1H); 3,15 (t,  $J = 11$ , 1H); 3,39–3,77 (m, 3H); 5,09 (s, 2H); 7,27–7,41 (m, 5H).

**3.vii. bencil éster de ácido (RS)-3-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-3-hidroxi-pirrolidin-1-carboxílico:**

15 Se agrega  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (274 mg) a una suspensión del intermedio 1.i (300 mg) y del intermedio 3.vi (338 mg) en DMF (3 ml). La mezcla de reacción se agita a 80 °C durante 3 h y el disolvente se retira *in vacuo*. El residuo obtenido después del procesamiento (DCM) se purifica mediante FC (DCM/MeOH 95:5) para proveer 531 mg (87% de rendimiento) de una espuma beige.

20 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 1,80–1,92 (m, 1H); 1,96–2,08 (m, 1H); 3,32–3,59 (m, 5H); 3,66 (ddd,  $J = 3$ ,  $J = 6$  y  $J = 13$ , 1H); 3,80 (dd,  $J = 6$  y  $J = 9$ , 1H); 3,97–4,09 (m, 3H); 4,64–4,72 (m, 1H); 5,07 (s, 2H); 5,19 (t,  $J = 6$ , 1H); 5,23 (s, 1H); 7,18–7,23 (m, 2H); 7,27–7,38 (m, 5H); 7,57 (dd,  $J = 2$  y  $J = 14$ , 1H).

EM (ESI): 460,9.

**3.viii. (R)-3-[3-fluoro-4-((RS)-3-hidroxi-pirrolidin-3-ilmetoxi)-fenil]-5-hidroximetil-oxazolidin-2-ona:**

25 Una solución del intermedio 3.vii (259 mg) en THF/MeOH (1:1; 20 ml) se hidrogena empleando Pd/C 10% (60 mg) durante 20 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra *in vacuo*, se recoge en DCM/MeOH 90:10 (20 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 30 min. El catalizador se retira mediante filtración y el filtrado se concentra *in vacuo* para proveer 184 mg (100% de rendimiento) como una espuma naranja.

EM (ESI): 327,3.

30 **3.ix. ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-((RS)-3-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-3-hidroxi-pirrolidin-1-il)-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico:**

35 Una solución del intermedio 3.viii (226 mg) y complejo diacetato de boro ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico (270 mg; preparada de acuerdo con WO 88/07998) en NMP (5 ml) es tratada con DIPEA (120  $\square$ ) y agitada a 60 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se concentra *in vacuo* y el residuo se recoge en HCl 5 M en MeOH (2 ml). La solución se agita a temperatura ambiente durante 1 h, concentrada *in vacuo* y el residuo se purifica mediante FC (DCM/MeOH/AcOH 95:4:1 hasta 90:9:1). El residuo espumoso se recoge en MeOH (2 ml), agitado durante 1 h y filtrado. Los cristales se recogen y se secan *in vacuo* obteniendo 23 mg (6% de rendimiento) de un sólido beige.

40 RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ ;  $\delta$  ppm): 1,10–1,34 (m, 4H); 1,98–2,10 (m, 1H); 2,14–2,26 (m, 1H); 3,48–3,70 (m, 3H); 3,71–3,89 (m, 5H); 4,05 (t,  $J = 9$ , 1H); 4,09–4,18 (m, 2H); 4,66–4,74 (m, 1H); 5,19 (t,  $J = 6$ , 1H); 5,40 (s, 1H); 7,09 (d,  $J = 8$ , 1H); 7,18–7,31 (m, 2H); 7,59 (dd,  $J = 2$  y  $J = 14$ , 1H); 7,82 (d,  $J = 14$ , 1H); 8,59 (s, 1H); 15,52 (s, 1H).

EM (ESI): 572,3.

**Ejemplo 4: Actividad antibacteriana *in vitro* de los compuestos de la invención respecto de cepas de referencia de *Clostridium difficile* o *Clostridium perfringens*:**

**4.i. Método experimental:**

45 Se determinan las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) mediante un ensayo de microdilución de medio de cultivo. Como medio de ensayo se emplea medio Brucella suplementado con una concentración final de 0,5 mg/l de vitamina K1 y 5 mg/l de hemina. Brevemente, se preparan soluciones *madre* de los compuestos en DMSO (5,12 mg/ml), y 5  $\mu$ l de una serie de diluciones seriales de dos-veces en 50% DMSO/50%  $\text{H}_2\text{O}$  se disponen en placas de

microtitulación de 96 pocillos que contienen 45 µl de medio Brucella suplementado y se agitan durante 5 min. Para preparar el inóculo se suspenden colonias de 24 horas de edad de *C. difficile* cultivadas en agar Brucella suplementado con 5% de sangre de ovejas *laked*, 5 µg de hemina/ml, y 1 µg de vitamina K1/ml en medio de cultivo Brucella suplementado y se ajustan a una densidad que coincida con 0,5 del estándar de McFarland. 50 µl de una dilución de 50–veces de esta suspensión es empleada para inocular los pocillos en la placa de 96 pocillos, lo que resulta en aproximadamente 10<sup>4</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por pocillo. La concentración final en DMSO es de 2,5%. El intervalo de concentración final es des 0,03 – 16 µg /mL. Las placas se incuban bajo condiciones anaeróbicas durante 48 h a 37 °C. Después de la incubación las placas son leídas en un lector de placas a DO<sub>595</sub> (Ultramark, Biorad Laboratories). Las CIM son inicialmente leídas a la concentración más baja que presenta >90% de inhibición del crecimiento en comparación con los pocillos de control. Las placas también son revisadas de manera visual con la ayuda de un espejo de lectura, y las CIM son confirmados por la ausencia de crecimiento visible.

#### 4.ii. Resultados:

Los compuestos de los Ejemplos 1–3 son ensayados *in vitro* para véase su actividad en la inhibición del crecimiento de tres cepas de referencia de *C. difficile* o *Clostridium perfringens*. Los resultados obtenidos están resumidos en la Tabla 1 a continuación.

**Tabla 1**

Compuesto ensayado	CIM respecto de <i>C. difficile</i> ATCC 43596 (µg/ml)	CIM respecto de <i>C. difficile</i> ATCC 9689 (µg/ml)	CIM respecto de <i>C. difficile</i> NC 13366 (µg/ml)	CIM respecto de <i>C. perfringens</i> DSM 756 (µg/ml)
Ciprofloxacina	8	8	> 16	0,25
Linezolid	8	2	1	4
Ejemplo 1	0,125	0,125	0,06	≤ 0,03
Ejemplo 2	0,06	0,125	0,03	≤ 0,03
Ejemplo 3	0,25	0,5	0,25	0,125

Los compuestos de los Ejemplos 1–3 presentan una potente actividad *in vitro* de frente a las cepas de *C. difficile* y de *C. perfringens* ensayadas. También se observa una fuerte actividad de frente a la cepa hiper–virulenta NC13366 resistente a quinolona. Los compuestos de los Ejemplos 1 y 2 son levemente más activos que el compuesto del Ejemplo 3 y todos los compuestos Ejemplo son claramente más activos que ciprofloxacina y linezolid.

#### **Ejemplo 5: actividad antibacteriana *in vitro* del compuesto del Ejemplo 1 de frente a una colección de *Clostridium difficile* aislada clínicamente:**

##### 5.i. Método experimental:

Se emplea el método de referencia recomendado por el CLSI de dilución de agar para anaerobios (M11–A6) para el ensayo de susceptibilidad. El medio de ensayo es agar Brucella suplementado con 5% de sangre de oveja *laked*, 5 µg de hemina/ml, y 1 µg de vitamina K<sub>1</sub>/ml. Los compuestos de ensayo son diluidos en serie y se añaden al agar suplementado fundido. Se preparan controles de crecimiento en placas libres de fármacos. Antes de los ensayos, todos los aislados son sub–cultivados dos veces en placas de agar brucella enriquecido. Las colonias bacterianas se suspenden en medio de cultivo brucella. Se emplea estandarización con un colorímetro Vitek para preparar cada inóculo al equivalente de 0,5 del estándar de McFarland, aproximadamente 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> CFU por punto después de la aplicación con un replicador Steers. Las placas se incuban en condiciones anaeróbicas durante 48 h a 37 °C. La concentración inhibidora mínima (MIC) es la concentración que inhibe completamente el crecimiento visible en comparación con el control libre de fármacos. Todos los antibióticos son preparados y ensayados en conjunto con vancomicina y metronidazol como controles.

##### 5.ii. Resultados:

El compuesto del Ejemplo 1 es ensayado por su actividad para inhibir el crecimiento de una colección de 209 diversos *C. difficile* aislados de manera clínica *in vitro*. El compuesto del Ejemplo 1 presenta un MIC<sub>90</sub> (concentración mínima inhibidora para inhibir el crecimiento de 90% de las cepas o más) de 0,25 µg/ml, los CIM

obtenidos se encuentran en el rango desde 0,06 hasta 0,5 µg/ml. En promedio es más activo que vancomicina, metronidazol y linezolid, que tiene CIM90 of 2, 1 y 8 µg/ml, respectivamente.

**Ejemplo 6: actividad antibacteriana *in vitro* de los compuestos de la invención de frente a bacterias aeróbicas Gram-positivas:**

5 6.i. Método experimental:

Se determinan las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mediante un ensayo de microdilución de medio de cultivo de acuerdo con las pautas del *Clinical Laboratory Standards Institute* [CLSI, antiguamente NCCLS, 1997]. Brevemente, se preparan soluciones *stock* de los compuestos en DMSO (5,12 mg/ml), diluidas de manera serial en medio de cultivo II de Mueller-Hinton (CaMHB) ajustado en cationes, y dispuesto en placas de microtitulación con la ayuda de un robot de pipeteo Biomek 2000 (Beckman Coulter). La concentración final de DMSO es de 2,5% o menor. Las placas se inoculan para obtener una concentración generalmente de 3–6x10<sup>5</sup> CFU/ml. Después de incubación a 37 °C durante 18–24 h, las placas se leen en un lector de placas a DO<sub>595</sub> (Ultramark, Biorad Laboratories). Las CIM son inicialmente leídas a la concentración más baja, presentando un >90% de inhibición de crecimiento en comparación con los pocillos de control. Las placas también se revisan de manera visual con la ayuda de un espejo de lectura, y los CIM se confirman mediante la ausencia de un crecimiento visible.

6.ii. Resultados:

El compuesto del Ejemplo 1 se ensayó de frente a bacterias aerobias Gram-positivas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Cepa	CIM medida para vancomicina (µg/ml)	CIM medida para ciprofloxacina (µg/ml)	CIM medida para linezolid (µg/ml)	CIM medida para el compuesto del Ejemplo 1 (µg/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1	0,25	2	0,25
<i>S. aureus</i> A-798 (MRSA)	1	> 16	2	0,25
<i>S. aureus</i> ATCC 43300 (MRSA)	1	0,25	2	0,25
<i>S. aureus</i> S1 (LZD-R)	1	0,25	> 32	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1	2	2	0,25
<i>E. faecalis</i> H 4060	> 32	> 16	2	0,25
<i>E. faecalis</i> H 6279	> 32	> 16	2	0,25
<i>E. faecalis</i> H 6897	> 32	> 16	4	1
<i>E. faecalis</i> H 7094	> 32	> 16	4	0,5
<i>E. faecalis</i> H 7460	> 32	> 16	16	1
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	1	8	2	0,25
<i>E. faecium</i> H 9070	> 32	> 16	2	1
<i>E. faecium</i> H 7969	> 32	> 16	4	1
<i>E. faecium</i> H 7966	> 32	> 16	1	0,5
<i>E. faecium</i> H 7965	> 32	> 16	2	0,5
<i>E. faecium</i> H 7937	> 32	> 16	1	0,25
<i>E. faecium</i> A 962	> 32	> 16	4	0,5

Cepa	CIM medida para vancomicina (µg/ml)	CIM medida para ciprofloxacina (µg/ml)	CIM medida para linezolid (µg/ml)	CIM medida para el compuesto del Ejemplo 1 (µg/ml)
<i>E. faecium</i> A 949	> 32	> 16	2	1
<i>E. faecium</i> L1 (LZD-R)	0,5	> 16	> 32	2

En resumen, el compuesto del Ejemplo 1 presenta una potente actividad *in vitro* de frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* MRSA, *Enterococcus faecalis*, y *Enterococcus faecium*. Es activo frente a cepas que resisten a la vancomicina, ciprofloxacino o linezolid.

5 **Ejemplo 7: actividad antibacteriana *in vitro* del compuesto del Ejemplo 1 frente a cepas bacterianas anaerobias particulares:**

10 Empleando el método experimental descrito en el Ejemplo 5 (véase 5.i), el compuesto del Ejemplo 1 (Ej. 1) es probado *in vitro* por la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertas bacterias anaeróbicas que son conocidas o de las cuales se sospecha que juegan un rol en la flora normal del intestino y en el mantenimiento de su papel en la protección frente a un sobre crecimiento de *C. difficile* (de aquí en adelante llamada las "bacterias comensales del intestino"). Como referencias, el compuesto del Ejemplo 5 de WO 2005/058888 (R1) y ciprofloxacino (CP) se ensayaron al mismo tiempo. Las CIM así obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 3.

**Tabla 3**

Cepas		CIM [µg/ml ]		
		R1	Ej, 1	CP
<i>Clostridium difficile</i> A-1179	NC 13366	≤0,06	≤0,06	>32
<i>Fusobacterium necrophorum</i> A-1260	DSM 20698	1	1	4
<i>Bacteroides ovatus</i> A-991	ATCC 8483	8	16	16
<i>Bacteroides fragilis</i> A-992	ATCC 25285	2	8	8
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> A-990	ATCC 29741	4	8	16
<i>Bacteroides vulgatus</i> A-989	ATCC 8482	1	2	32
<i>Bacteroides fragilis</i> A-502	T 7403	2	4	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-348	T 8673	1	2	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-217	B 6306	2	4	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-501	B 8039	4	4	32
<i>Bacteroides fragilis</i> A-294	T 9174	2	4	8
<i>Bacteroides fragilis</i> A-293	B 2518	2	4	8

Cepas		CIM [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
		R1	Ej, 1	CP
<i>Bacteroides fragilis</i> A-260	T 9865	1	4	8
<i>Eubacterium limosum</i> A-1259	DSM 20698	0,125	1	2
<i>Finegoldia magna</i> A-1254	DSM 20470	$\leq 0,06$	0,25	2
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> A-1257	DSM 20083	$\leq 0,06$	0,5	2
<i>Bifidobacterium bifidum</i> A-1258	DSM 20456	0,125	0,5	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> A-1255	DSM 20079	$\leq 0,06$	0,5	32
<i>Lactococcus lactis</i> A-1256	DSM 20069	$\leq 0,06$	0,5	1

En resumen, el compuesto del Ejemplo 1 presenta una actividad reducida respecto de las bacterias comensales en comparación con *C. difficile*. Para *Bacteroides spp.*, que son miembros importantes de la flora protectora humana del intestino, la actividad es 30 a 200 veces menor. Esta actividad selectiva ofrece el potencial de una destrucción selectiva de *C. difficile* en el intestino mientras se evitan importantes bacterias de la flora intestinal.

Además, cuando se lo compara con el compuesto del Ejemplo 5 de WO 2005/058888, el compuesto del Ejemplo 1 presenta en la mayor parte de los casos 2 a 4 veces menos de actividad frente a la *Bacteroides spp.* ensayada, 4 veces menos actividad frente a las cepas *Eubacterium limosum* A-1259 o *Finegoldia magna* A-1254, 4 a 8 veces menos activa frente al *Bifidobacterium spp.* ensayado y 8 veces menos activa frente a las cepas *Lactobacillus acidophilus* A-1255 y *Lactococcus lactis* A-1256.

Por lo tanto, cuando se compara con el compuesto del Ejemplo 5 de WO 2005/058888 (R1), el compuesto del Ejemplo 1 es significativamente menos activo frente a las bacterias comensales del intestino, lo que indica una ventaja en cuanto a la destrucción selectiva de *C. difficile* en el intestino.

#### **Ejemplo 8: Efecto del compuesto del Ejemplo 1 en la producción de toxinas de *C. difficile*:**

##### *8.i. Método experimental:*

La cepa hipertoxigénica *C. difficile* NC13366 se cultiva de manera anaeróbica en medio Brucella suplementado durante 24 horas a 37 °C hasta una densidad celular de aproximadamente  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Las bacterias son lavadas mediante centrifugación y resuspendidas en el mismo volumen de medio Brucella suplementado que contiene antibióticos a 1 y 8  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. El control no contiene antibiótico. Los cultivos son incubados adicionalmente de manera anaeróbica a 37 °C. En el día 5 se recolectan los sobrenadantes de los cultivos y se los ensaya respecto a toxina A y respecto a toxina B tal como se describe más adelante.

Se detecta la toxina A mediante *Western Blotting* usando un sistema de ensayo para análisis de proteínas grandes NuPage (*Large Protein Analysis System*) (Invitrogen LP0001, de acuerdo con las instrucciones del *kit*). Se emplea el juego de inmunodetección *Western Breeze* anti ratón (Invitrogen WB7103) con anticuerpos monoclonales anti CdTA de ratón (PCG4.1, Biodesign C70517M).

Se detecta la toxina citotóxica de *C. difficile* (toxina B) de manera semi-cuantitativa mediante el ensayo de los sobrenadantes de los cultivos de *C. difficile* por la actividad de *rounding* de células (*cell-rounding*, células que se hacen redondas) en células CHO. Las células CHO se siembran en placas de 96 pocillos de fondo plano ( $1 \times 10^5$  células/ pocillo) y se deja que se adhieran durante 3 h. Se añaden las diluciones apropiadas de los sobrenadantes esterilizados mediante filtración a las células y se las incuban adicionalmente a 37 °C, en 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de 20 h de incubación se determina el *rounding* celular empleando un microscopio invertido. El título de las toxinas es definido como la más alta dilución serial de 10 veces de sobrenadante que produce más que un 90% de *rounding* celular.

Las unidades formadoras de colonias (CFU) se determinan mediante el plaqueo de las diluciones apropiadas de las muestras de ensayo en agar Brucella suplementado y conteo de colonias después de 48 horas de incubación a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas.

#### 8.ii. Resultados:

5 La vista general de una placa de *Western Blot* para analizar la producción de toxina A en el sobrenadante de cultivos celulares estáticos de alta densidad de *C. difficile* NC 13366 (una cepa hiper-productora de toxina de tipo NAPI/027 que causa violentos episodios en hospitales con alta mortalidad) se muestra en la Figura 1.

10 El método experimental mencionado en el párrafo 8.i es empleado para obtener el resultado mostrado en la Figura 1. En el día 1 (D1), los cultivos se tratan con ya sea el compuesto del Ejemplo 1 (Ex. 1), vancomicina (V), metronidazol (M) a 1 y 8 µg/ml o se dejan sin tratamiento (U); en el día 5 (D5), se analizan los contenidos de la toxina A en los sobrenadantes y se los compara con aquellos observados en D1 (véase Figura 1). En los cultivos en fase estacionaria de alta densidad de cinco días de edad de *C. difficile* toxigénica, el compuesto del Ejemplo 1 inhibe *de novo* la producción de toxina A empleando concentraciones de 1 y 8 µg/ml, *i.e* a 2 y 16x la CIM (véase la Figura 1). En contraste, el metronidazol y la vancomicina no inhibieron la producción de toxina A bajo estas condiciones o sólo lo hicieron de manera débil.

15 Los sobrenadantes del cultivo también fueron analizados respecto a la toxina B citotóxica mediante el uso del ensayo de *rounding* de células basado en células mencionado en el párrafo 8.i. Las actividades de los sobrenadantes de los cultivos tratados con el compuesto del Ejemplo 1 se redujeron en más que un 90% en comparación con el control sin tratamiento. En contraste, las actividades de los sobrenadantes de los cultivos tratados con vancomicina no se redujeron (a 1 µg/ml) o sólo se redujeron en un 30% (a 8 µg/ml).

20 En resumen, el compuesto del Ejemplo 1 tiene la capacidad de detener de manera eficiente la síntesis de las toxinas A y B de *C. difficile* incluso en cultivos estáticos de alta densidad y en ausencia de muerte celular, lo que no es el caso para vancomicina y metronidazol, los fármacos de preferencia actualmente empleados para el tratamiento de infecciones de *C. difficile*.

#### 25 **Ejemplo 9: Efecto del compuesto del Ejemplo 1 en la formación de esporas de *C. difficile*:**

##### 9.i. Método experimental:

30 Se cultiva *C. difficile* A-1050 (ATCC 43596) hasta crecimiento logarítmico en medio de cultivo Brucella suplementado, lo que resulta en que la turbidez alcance 0,5 del estándar de McFarland (6–7 h a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas). Los cultivos son diluidos 1:50 en tubos que contienen 1 ml de medio de cultivo Brucella suplementado que contiene los antibióticos a diversas concentraciones en pasos de dilución de 2 veces. Los tubos se incubaron adicionalmente durante 4 días a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. La CIM se define como la concentración que inhibe completamente el crecimiento visible (turbidez). 0,5x CIM es la concentración más alta del fármaco que deja el crecimiento visible.

35 La evaluación de las unidades formadoras de colonias (CFUs) de las células totales se lleva a cabo mediante el plaqueo de diluciones de 10 veces apropiadas de los cultivos en agar de Brazier que contiene 4% de suspensión de yema de huevo y 1% de sangre de caballo lisada (Lab M). Las colonias se contaron después de incubación a 37 °C durante 48 h bajo condiciones anaeróbicas. Los conteos de esporas se llevaron a cabo mediante la muerte selectiva de células vegetativas mediante tratamiento con 50% de etanol durante 1 h a temperatura ambiente y el conteo posterior de CFU en agar de Braziers tal como se indica anteriormente.

##### 40 9.ii. Resultados:

45 *C. difficile* es un organismo formador de esporas y las esporas pueden persistir por largo tiempo en el ambiente hospitalario. Las esporas son muy resistentes a los procedimientos de desinfección habituales. Por lo tanto, las esporas juegan un papel importante en la transmisión y en la persistencia de las infecciones con *C. difficile*. Se tratan cultivos de *C. difficile in vitro* con diversas concentraciones inferiores a la CIM del compuesto del Ejemplo 1, vancomicina o metronidazol y se investiga el efecto sobre la producción de esporas después de 4 días de incubación anaeróbica a 37 °C (véase párrafo 9.i). A una concentración que representa 0,5x de la CIM, el tratamiento con el compuesto del Ejemplo 1 produjo bajos conteos de esporas (<1% de esporas del conteo de células totales). En contraste, los cultivos no tratados y los cultivos tratados con metronidazol o vancomicina a concentraciones de 0,5x de CIM presentaron altas tasas de esporulación (>90% de esporas del conteo de células totales). Esto indica que el compuesto del Ejemplo 1 tiene la capacidad de reducir la producción de esporas durante el tratamiento de una infección con *C. difficile* de manera más eficiente que la vancomicina o el metronidazol.

**Ejemplo 10: Actividad *in vivo* de un compuesto de la invención en el modelo de *C. difficile* en hámster:**

*10.i. Método experimental:*

5 Se aplicó una única inyección de fosfato de clindamicina (10 mg/kg s.c.), a hámsteres *Golden Syrian*, y un día después los animales se infectaron mediante sonda esogáfrica con  $10^8$  CFU de cepa *C. difficile* toxigénica 10465. Se produce una colitis fulminante en la mayoría de los animales (~95%) y se desarrolla 1 a 2 días después de la administración de *C. difficile*. Sin tratamiento, la colitis progresa rápidamente y se convierte en colitis severa, necrosis hemorrágica del intestino ciego y muerte. El compuesto del Ejemplo 1 se administró de manera oral como una suspensión a tres niveles de dosificación (10 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg; n = 10 por grupo). Se empleó vancomicina (50 mg/kg) como un control. Los animales se trataron una vez diariamente durante 5 días y a 10 continuación se mantuvieron en observación durante 21 días adicionales.

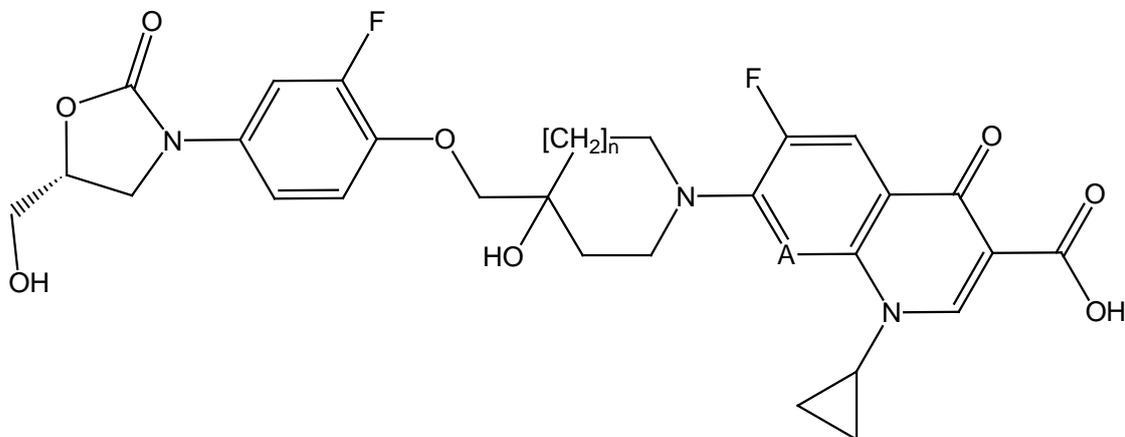
Los animales se observaron tres veces diariamente en lo referente a la morbilidad y la presencia o ausencia de diarrea. El punto final del estudio fue la supervivencia. Los animales para los cuales se juzó que estaban en un estado moribundo [período extendido de pérdida de peso que progresa a un estado escuálido, anorexia durante 24–48 h, letargo prolongado (más que 3 días), signos de parálisis, erosiones cutáneas o trauma, postura encorvada, abdomen distendido] se sacrificaron mediante una única inyección de pentobarbital sódico. 15

*10.ii. Resultados:*

La utilidad terapéutica del compuesto del Ejemplo 1 se ensayó empleando el protocolo del párrafo 10.i. Todos los animales infectados no tratados murieron entre 2 y 5 días después de la infección, mientras que todos los animales tratados con 10, 30 ó 100 mg/kg del compuesto del Ejemplo 1 sobrevivieron durante el período de tratamiento de 5 20 días. Al nivel de dosis más bajo, 40% de los animales sobrevive la fase de recaída 21 días después del tratamiento, mientras que en los grupos de 30 y 100 mg/kg 80 y 100% de los animales sobrevivieron sin una recaída. Como control se empleó vancomicina con una dosis de 50 mg. Estos resultados demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 tiene la capacidad de tratar animales infectados con *C. difficile* de manera comparable a vancomicina.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I



5

I

en la que

A es N o CH; y

n es 0 ó 1;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades intestinales que están causadas por bacterias seleccionadas de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus*.

2. Un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso mencionado en la reivindicación 1, en el que A es CH.

3. Un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso mencionado en la reivindicación 1 en el que n es 1.

4. Un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado de entre:

– ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico;

– ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-[1,8]naftiridin-3-carboxílico; y

– ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{3-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-3-hidroxi-pirrolidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico;

o una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades intestinales que son causadas por bacterias seleccionadas de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus*.

5. Un compuesto de fórmula I de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-7-{4-[2-fluoro-4-((R)-5-hidroximetil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-fenoximetil]-4-hidroxi-piperidin-1-il}-4-oxo-1,4-dihidro-quinolin-3-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la prevención o el tratamiento de enfermedades intestinales que son causadas por bacterias seleccionadas de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus*.

6. Un compuesto de fórmula I de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades intestinales que son causadas por *Clostridium difficile*.

7. Un compuesto de fórmula I tal de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades intestinales que son causadas por una cepa de *Clostridium difficile* que produce una toxina.
- 5 8. Un compuesto de fórmula I de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades de diarrea asociadas con cepas entero-toxigénicas de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus* sin el aumento de la concentración de enterococos resistentes a vancomicina en el intestino.
- 10 9. Un compuesto de fórmula I de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades de diarrea asociadas con cepas entero-toxigénicas de *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* o *Staphylococcus aureus* y la reducción de la concentración de enterococos resistentes a vancomicina en el intestino.
- 15 10. El uso de un compuesto de fórmula I de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, o de una sal farmacéuticamente aceptable de un tal compuesto, para la producción de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de una enfermedad intestinal que es causada por una bacteria seleccionada de entre *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el medicamento fabricado está destinado al tratamiento de una enfermedad intestinal.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el medicamento fabricado está destinado a la prevención de la enfermedad intestinal.
- 20 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el medicamento fabricado también está destinado a no aumentar la concentración de enterococos resistentes a vancomicina en el intestino.
14. El uso de acuerdo la reivindicación 10, en el que el medicamento fabricado también está destinado a reducir la concentración de enterococos resistentes a la vancomicina en el intestino.

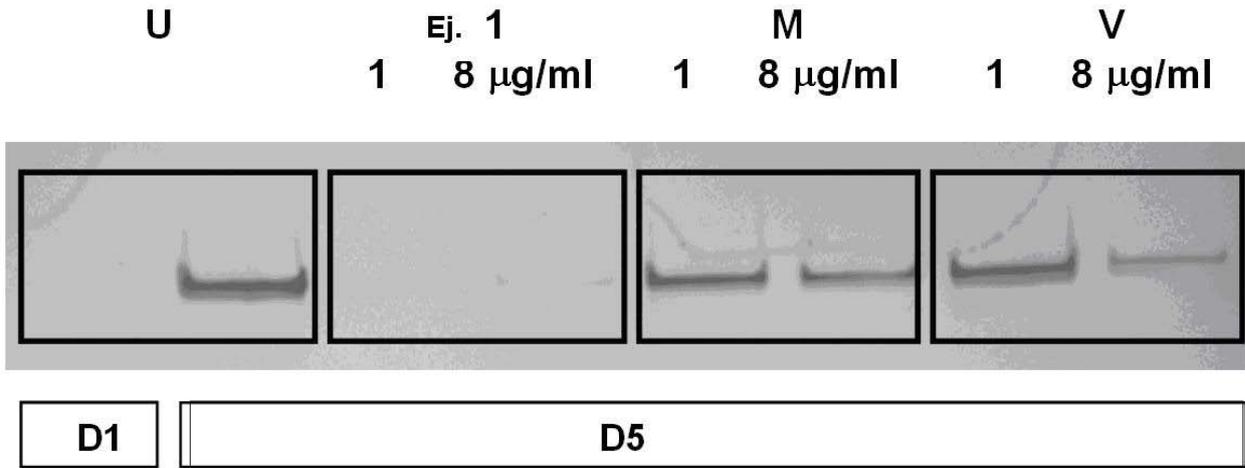


Figura 1