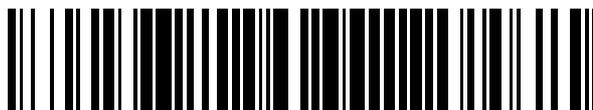


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 897**

51 Int. Cl.:

C07D 513/04 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

C07D 409/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07842226 .8**

96 Fecha de presentación: **11.09.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2094714**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54

Título: **Compuestos tienopiridona sustituidos con actividad antibacteriana**

30

Prioridad:

26.09.2006 US 826945 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73

Titular/es:

**CRESTONE, INC. (100.0%)
6973 CARTER TRAIL
BOULDER, CO 80301, US**

72

Inventor/es:

**GILES JOSEPH;
SUN XICHENG;
JANJIC NEBOJSA y
STRONG SARAH**

74

Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 392 897 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

Compuestos tienopiridona sustituidos con actividad antibacteriana

Campo técnico

La presente invención se refiere a compuestos heteroaromáticos bicíclicos novedosos que tienen un lado izquierdo que incluye un grupo tetrahidroquinolina o cromano y un grupo tienopiridona en el lado derecho. La presente invención también se refiere al uso de estos compuestos como inhibidores de la metionil ARNt sintetasa bacteriana (MetRS), a procedimientos para su preparación y a sus usos terapéuticos como agentes antibacterianos. En concreto, la invención se refiere a estos compuestos tal como se utilizan en la terapia para infecciones por *Clostridium difficile*.

Antecedentes de la invención

La búsqueda de agentes antibacterianos se inició a finales de 1800 con la idea de que los "gérmenes" causaban enfermedades humanas. Durante el siglo pasado, los científicos han desarrollado una variedad de fármacos útiles en la dianización y en la inhibición de numerosas cepas bacterianas. En concreto, se han desarrollado agentes antibacterianos conocidos como antibióticos y son de uso común en todo el mundo industrializado para tratar las infecciones bacterianas más conocidas. Originalmente, los antibióticos como la penicilina inhibían la replicación de las bacterias bloqueando la acción de la transpeptidasa, una enzima responsable de la construcción de las paredes celulares bacterianas. Sin embargo, debido al uso excesivo y a las adaptaciones de resistencia de muchas cepas de bacterias, muchos antibióticos han perdido parte o la totalidad de su eficacia en el tratamiento de la infección. Resultaría útil una línea de agentes antibacterianos que tengan como diana nuevos mecanismos de crecimiento molecular para evitar que aumente más la resistencia a los antibióticos. Una de tales dianas es la ARNt sintetasa.

Las ARNt sintetasa están implicadas en la biosíntesis de proteínas, de manera que puede esperarse que la inhibición de las mismas conduzca a una detención del crecimiento celular. De esta manera, por ejemplo, el compuesto mupirocina, producido por el organismo *Pseudomonas fluorescens*, es un agente antibacteriano, y se utiliza como principio activo en el producto Bactroban®, comercializado por Glaxo-SmithKline. La mupirocina ha demostrado ser un inhibidor de la isoleucil ARNt sintetasa. Cada ARNt sintetasa representa una diana distinta para el descubrimiento de fármacos. Los inhibidores de ARNt sintetasa que son selectivos para las células bacterianas más que para las células de mamífero son de considerable interés terapéutico, ya que tienen el potencial de utilizarse como agentes antibacterianos en el tratamiento de enfermedades humanas.

Recientemente se ha determinado la secuencia de los genes de ARNt sintetasa en el organismo Gram positivo *S. aureus* (véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea nº 97300317.1, SmithKline Beecham, para MetRS de *S. aureus*), facilitando así al procedimiento de identificación de inhibidores. Además, también se ha publicado la secuencia de los genes de ARNt sintetasa en otras bacterias patógenas, por ejemplo, el organismo Gram negativo *H. influenzae*, (R.D. Fleischmann y col., Science, 269, 496-512, 1995).

Recientemente se han desvelado varios compuestos por su actividad inhibidora hacia la metionil ARNt sintetasa (MetRS) y por su capacidad como agentes antibacterianos. En concreto, Jarvest y col. describieron diversos compuestos heteroaromáticos bicíclicos que han demostrado inhibir la MetRS. (Bioorg. & Med. Chem. Lett. 14 (2004) 3937-3941). A la luz de estos hallazgos sigue existiendo una necesidad en la técnica de identificar y utilizar compuestos que tengan como diana la MetRS y por lo tanto proporcionar nuevos enfoques para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Una diana bacteriana particularmente interesante es el organismo *Clostridium difficile* (*C. difficile*). *C. difficile* se está convirtiendo en un agente infeccioso cada vez más frecuente, siendo del uno al tres por ciento de los individuos sanos portadores del organismo. (Bartlett y Perl, N. Engl. J Med., 353, 2503-2505, 2005; Clabots y col., J Infect Dis, 166, 561-567, 1992; McFarland y col., N. Engl. J Med., 320, 204-210, 1989). El riesgo de infección y enfermedad se vuelven cada vez más frecuentes en personas mayores, inmunodeficientes, y en especial en las personas mayores en centros de salud, por ejemplo, hogar de ancianos, hospital, consultorio médico, etc. Pocos fármacos antibacterianos convencionales han demostrado ser prometedores en el tratamiento de *C. difficile*, de hecho, sólo la vancomicina está aprobada por la FDA para el tratamiento de la diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) (*C. difficile* ha demostrado una resistencia sorprendente al tratamiento antibiótico convencional, creciendo con frecuencia en el intestino de individuos sometidos a tratamiento). Como tal, existe una necesidad en la técnica para obtener enfoques adicionales para el tratamiento de la infección por *C. difficile*, especialmente tratamientos que eviten los tratamientos antibióticos convencionales y por lo tanto la resistencia a los antibióticos. Gentry y col., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 47, nº 6, 2003, páginas 1784-1789, informan de que la sensibilidad variable a inhibidores de la metionil ARNt sintetasa bacteriana pondría de manifiesto subpoblaciones de *Streptococcus pneumoniae* con dos genes de la Metionil-ARNt sintetasa. Jarvest y col., Journal of Medicinal Chemistry, vol. 45, Nº 10, 2002, páginas 1959-1962, informan de que se han derivado inhibidores nanomolares potentes de metionil ARNt sintetasa de *Staphylococcus aureus* a partir de un *hit* por cribado de alto rendimiento de los compuestos del archivo. Los compuestos optimizados presentaron una excelente actividad antibacteriana frente a estafilococos y enterococos patógenos, incluyendo cepas resistentes a los antibióticos clínicos. Hurdle y col., Antimicrobial Agents and

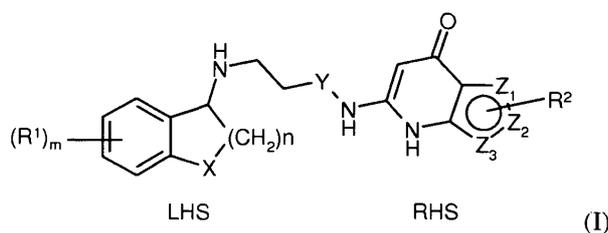
Chemotherapy, vol. 49, N° 12, 2005, páginas 4821-4833, describen las perspectivas para los inhibidores de la aminoacil-ARNt sintetasa como nuevos agentes antimicrobianos.

La presente invención se ha descubierto en este contexto.

Descripción detallada de la invención

5 Los inventores han descubierto recientemente una nueva clase de compuestos heteroaromáticos bicíclicos que son potentes inhibidores de la MetRS bacteriana. Esta nueva clase de compuestos demuestra tener una amplia aplicabilidad como agentes antibacterianos para numerosas bacterias Gram positivas y Gram negativas, y en concreto, han demostrado ser potentes agentes antibacterianos para la infección por *C. difficile* (los inhibidores de MetRS tienen mayor actividad frente a organismos Gram positivos y una actividad mucho menor frente a organismos Gram negativos).

En general, los compuestos heteroaromáticos bicíclicos de la invención tienen un lado izquierdo (LHS) como se muestra en la Fórmula 1 y un grupo tienopiridona en el lado derecho (RHS). En concreto, la invención proporciona compuestos de la fórmula (I):



15 en la que

R^1 está seleccionado de entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C_{1-6}) (opcionalmente sustituido por halo, hidroxilo, amino, mono a perfluoro alquilo (C_{1-3}), carboxi, o alcóxicarbonilo (C_{1-6})), cicloalquilo (C_{3-7}), alcoxi (C_{1-6}), amino, mono- o dialquilamino (C_{1-6}), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C_{1-6}), carboxi alquilo (C_{1-6}), alquiltio (C_{1-6}), alquilsulfanilo (C_{1-6}), alquilsulfonilo (C_{1-6}), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C_{1-6}), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C_{1-6}), y heterociclilo;

Y es un grupo de engarce que tiene de uno a seis grupos metileno en una cadena lineal y en el que uno o más grupos metileno pueden tener uno o más sustituyentes alquilo (C_{1-6}), alcoxi (C_{1-6}) o alquilidenilo (C_{1-6});

R^2 está seleccionado de entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C_{1-6}) (opcionalmente sustituido por halo, hidroxilo, amino, mono a perfluoro alquilo (C_{1-3}), carboxi, o alcóxicarbonilo (C_{1-6})), cicloalquilo (C_{3-7}), alcoxi (C_{1-6}), amino, mono- o dialquilamino (C_{1-6}), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C_{1-6}), carboxi-alquilo (C_{1-6}), alquiltio (C_{1-6}), alquilsulfanilo (C_{1-6}), alquilsulfonilo (C_{1-6}), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C_{1-6}), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C_{1-6}), y heterociclilo;

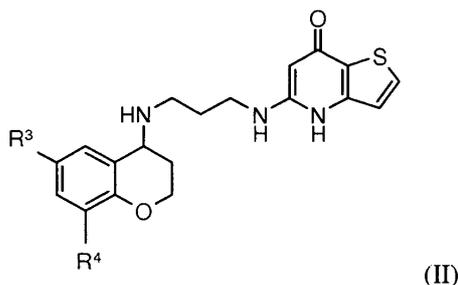
cuando Z_1 es S, Z_2 y Z_3 son CH; cuando Z_2 es S, Z_1 y Z_3 son CH; cuando Z_3 es S, Z_1 y Z_2 son CH;

x es NH, S, SO, SO_2 , O o CH_2 ;

30 m es 0 o un número entero de 1 a 4; y

n es uno, dos o tres.

En una forma de realización preferente se proporcionan compuestos de la invención que tienen un grupo cromano en el lado izquierdo y un grupo tienopiridona en el lado derecho, como se muestra en la fórmula (II):

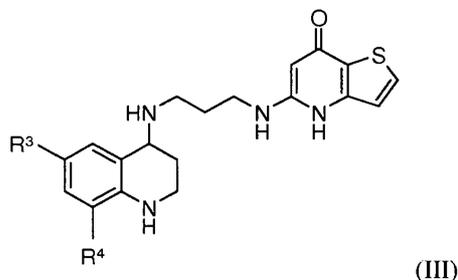


35 en la que:

R^3 y R^4 pueden ser el mismo sustituyente o uno diferente y son como se ha definido anteriormente para R^1 . En las

formas de realización preferentes, R^3 es un halógeno y en las formas de realización más preferentes R^3 es bromo, cloro o yodo. En las formas de realización preferentes, R^4 es un halógeno o sulfano, y en las formas de realización más preferentes R^4 es bromo, cloro, yodo o sulfano.

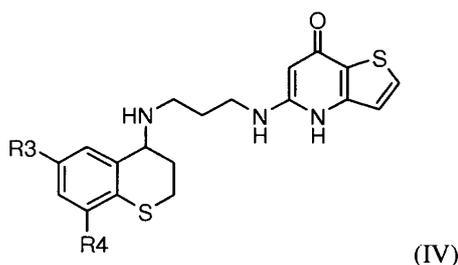
- 5 En otra forma de realización preferente de la invención, en la fórmula (III) se desvelan y se muestran compuestos que tienen un grupo tetrahidroquinolina en el lado izquierdo y un grupo tienopiridona en el lado derecho:



en la que:

- 10 R^3 y R^4 pueden ser el mismo sustituyente o uno diferente y son como se ha definido anteriormente para R^1 . En las formas de realización preferentes, R^3 es un halógeno y en las formas de realización más preferentes R^3 es bromo, cloro o yodo. En las formas de realización preferentes, R^4 es un halógeno o sulfano, y en las formas de realización más preferentes R^4 es bromo, cloro, yodo o sulfano.

En otra forma de realización preferente de la invención, en la fórmula (IV) se desvelan y se muestran compuestos que tienen un grupo benzotiofano en el lado izquierdo y grupo tienopiridona en el lado derecho:



- 15 en la que:

R^3 y R^4 pueden ser el mismo sustituyente o uno diferente y son como se ha definido anteriormente para R^1 . En las formas de realización preferentes, R^3 es un halógeno y en las formas de realización más preferentes R^3 es bromo, cloro o yodo. En las formas de realización preferentes, R^4 es un halógeno o sulfano, y en las formas de realización más preferentes R^4 es bromo, cloro, yodo o sulfano.

- 20 Los compuestos de fórmula (I)-(IV) son inhibidores de la MetRS novedosos.

- Pueden formarse sales a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos y orgánicos adecuados a partir de los cuales pueden formarse sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmulas (I)-(IV) incluyen los ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, pamoico, succínico, bismetileno salicílico, metanosulfónico, etanodisulfónico, acético, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, aspártico, esteárico, palmítico, itacónico, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, ciclohexilsulfámico, fosfórico y nítrico.
- 25

Quando se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" y términos similares tales como "alcoxi" incluye todos los isómeros ramificados y de cadena lineal. Los ejemplos representativos de los mismos incluyen metilo, etilo, n-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo y *n*-hexilo.

- 30 Cuando se utilizan en el presente documento, los términos "alqueno" y "alquino" incluyen todos los isómeros ramificados y de cadena lineal. Los ejemplos representativos de los mismos incluyen vinilo, etinilo y 1-propinilo.

- Los sustituyentes preferentes para los grupos alquilo y alqueno incluyen, por ejemplo, y a menos que se defina lo contrario, halógeno, ciano, azido, nitro, carboxi, alcocarbonilo (C_{1-6}), carbamoilo, mono- o dialquilcarbamoilo (C_{1-6}), sulfo, sulfamoilo, mono- o dialquilsulfamoilo (C_{1-6}), amino, mono- o dialquilamino (C_{1-6}), acilamino, ureido, alcocarbonilamino (C_{1-6}), 2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino, arilo, heterociclilo, hidroxilo, alcoxi (C_{1-6}), aciloxi, oxo, acilo, 2-tienoilo, alquiltio (C_{1-6}), alquilsulfino (C_{1-6}), alquilsulfonilo (C_{1-6}), hidroximino, alcoximino (C_{1-6}), hidrazino, hidrazono, benzohidroximoilo, guanidino, amidino y iminoalquilamino.
- 35

Cuando se utiliza en el presente documento, el término "arilo" incluye, a menos que se defina lo contrario, fenilo o naftilo opcionalmente sustituido con hasta cinco, preferentemente hasta tres sustituyentes.

5 Cuando está sustituido, un grupo arilo puede tener hasta tres sustituyentes. Los sustituyentes preferentes para un grupo arilo incluyen, por ejemplo, y a menos que se defina lo contrario, halógeno, ciano, alquilo (C₁₋₆), mono a perfluoro alquilo (C₁₋₃), cicloalquilo (C₃₋₇), alquenoilo (C₂₋₆), alcoxi (C₁₋₆), alquenoxi (C₂₋₆), alcoxiarilo (C₁₋₆), haloalquilo (C₁₋₆), hidroxilo, amino, mono- o dialquilamino (C₁₋₆), acilamino, nitro, carboxi, alcoxycarbonilo (C₁₋₆), alquenoiloxycarbonilo (C₁₋₆), alcoxycarbonilo (C₁₋₆), alquilo (C₁₋₆), carboxialquilo (C₁₋₆), alquilcarbonilo (C₁₋₆), carboxi alquilo (C₁₋₆), alcoxycarbonilo (C₁₋₆), alcoxi (C₁₋₆), alquiltio (C₁₋₆), alquilsulfinilo (C₁₋₆), alquilsulfonilo (C₁₋₆), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C₁₋₆), carbamoilo, mono y dialquicarbamoilo (C₁₋₆), y heterocíclico.

10 Cuando se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilo" incluye un anillo único o fusionado que comprende hasta cuatro heteroátomos en el anillo seleccionados de entre oxígeno, nitrógeno y azufre. Preferentemente, el anillo heteroarilo comprende de 4 a 7, preferentemente de 5 a 6, átomos en el anillo. Un sistema de anillo heteroarilo fusionado puede incluir anillos carbocíclicos y sólo necesita incluir un anillo heterocíclico.

15 Cuando se utiliza en el presente documento, el término "heterocíclico" incluye anillos únicos o fusionados aromáticos y no aromáticos que comprenden hasta cuatro heteroátomos en el anillo seleccionados de entre oxígeno, nitrógeno y azufre. Convenientemente, el anillo heterocíclico comprende de 4 a 7, preferentemente de 5 a 6, átomos en el anillo. Un sistema de anillo heterocíclico fusionado puede incluir anillos carbocíclicos y sólo necesita incluir un anillo heterocíclico.

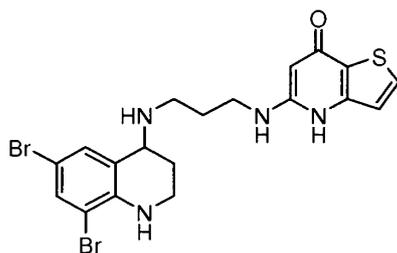
20 Cuando está sustituido, un grupo heteroarilo o heterocíclico puede tener hasta tres sustituyentes. Los sustituyentes preferentes incluyen los mencionados anteriormente para un grupo arilo, así como oxo.

Cuando se utilizan en el presente documento, los términos "halógeno" y "halo" incluyen flúor, cloro, bromo, y yodo y fluoro, cloro, bromo, y yodo, respectivamente.

25 Los compuestos de la presente invención se proporcionan convenientemente en forma prácticamente pura, por ejemplo por lo menos con un 50% de pureza, convenientemente con por lo menos un 60% de pureza, ventajosamente con por lo menos un 75% de pureza, preferentemente con por lo menos un 85% de pureza, más preferentemente con por lo menos un 95% de pureza, especialmente por lo menos un 98% de pureza. Todos los porcentajes se calculan en peso/peso. Todas las formas impuras o menos puras de un compuesto de acuerdo con la invención pueden utilizarse, por ejemplo, en la preparación de formas más puras del mismo compuesto o de un compuesto relacionado (por ejemplo un derivado correspondiente) adecuado para uso farmacéutico.

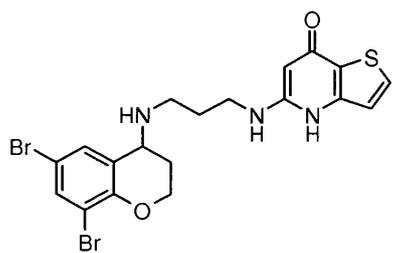
30 Se entenderá que determinados compuestos de la presente invención pueden comprender uno o más centros quirales de manera que los compuestos puedan existir como estereoisómeros, incluyendo diastereoisómeros y enantiómeros. Las formas de realización de la invención cubren todos estos estereoisómeros y mezclas de los mismos, incluyendo los racematos y mezclas que tienen un exceso enantiomérico de uno de los enantiómeros.

Por consiguiente, la presente invención proporciona compuestos preferentes de la fórmula (V)-(XIII):



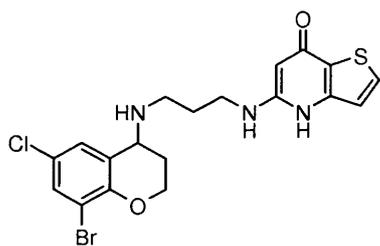
(V)

5-[3-(6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;



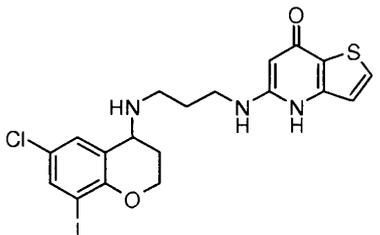
(VI)

5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;



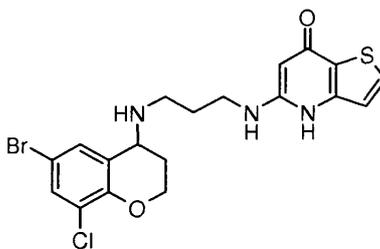
(VII)

5-[3-(8-bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;



(VIII)

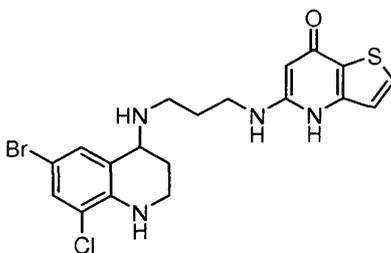
5-[3-(6-cloro-8-yodo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;



(IX)

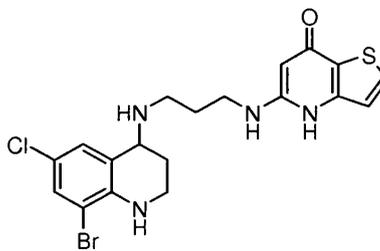
5

5-[3-(6-bromo-8-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;



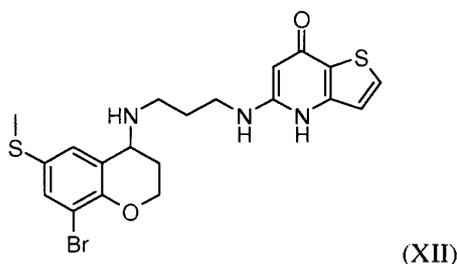
(X)

5-[3-(6-bromo-8-cloro-1,2,3,4-tetraidro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;

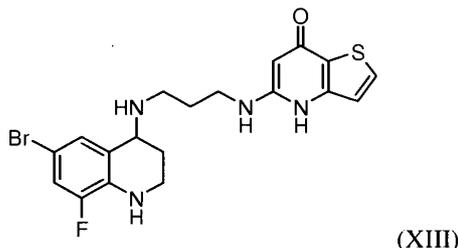


(XI)

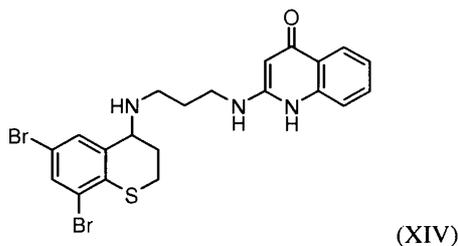
10 5-[3-(8-bromo-6-cloro-1,2,3,4-tetraidro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;



5-[3-(8-bromo-6-metilsulfanil-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;



5-[3-(6-bromo-8-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona; y



5

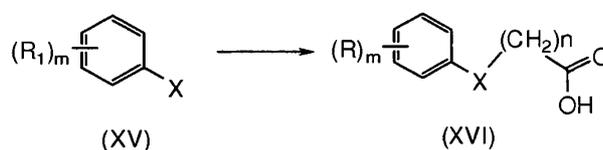
2-[3-(6,8-dibromo-1-benzotiofiran-4-ilamino)-propilamina]-1H-quinolin-4-ona.

Los compuestos de fórmulas (I)-(XIV) pueden prepararse mediante los procedimientos descritos en el presente documento o mediante los procedimientos descritos en la técnica anterior que se incorporan por referencia en el presente documento más adelante. Además, como se ha descrito para las fórmulas (I)-(IV), los compuestos de fórmula (V)-(XIV) pueden ser sales farmacéuticamente aceptables.

10

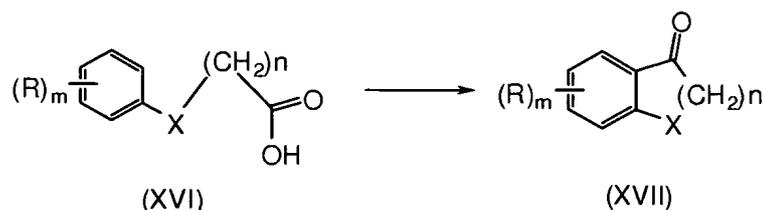
En una primera forma de realización, se disuelve un compuesto de anilina de fórmula (XV, X = NH₂), (u otro compuesto similar) en acetonitrilo, y se añade β-propiono-lactona (n = 2). La mezcla se agita a reflujo y a continuación se diluye con agua y se eleva el pH con una base hasta pH 9. Se extrae la mezcla con diclorometano y se separa la capa acuosa y se reduce el pH a aproximadamente 5,0 con ácido concentrado. Se recoge el precipitado concomitante en un embudo de vidrio sinterizado y se lava la torta con agua hasta que el filtrado alcanza un pH neutro. A continuación se seca el sólido al vacío para producir el compuesto de fórmula (XVI) (ácido fenilaminopropanoico).

15

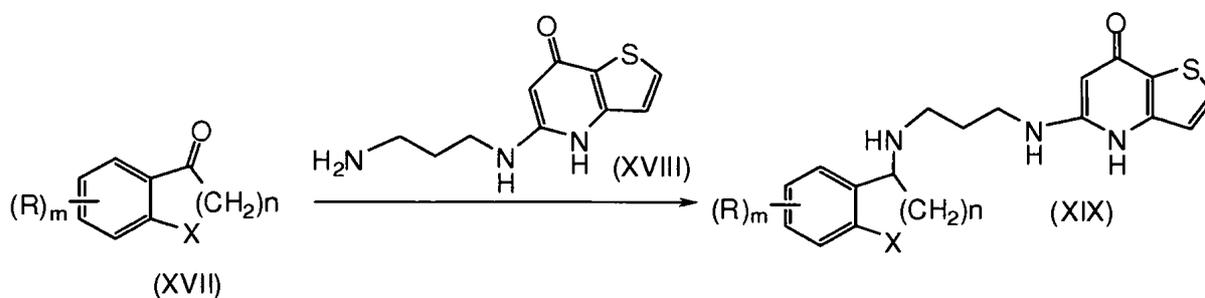


20

En una forma de realización alternativa, el compuesto de fórmula (XVI) puede prepararse a partir de un fenol (XV, X = OH) o tiofenol (XV, X = SH) y disolviéndolo primero en una base. Se combina la mezcla con β-propiono-lactona (n = 2) y se calienta la reacción a reflujo. Una vez enfriada y acidificada a pH < 4,0, se extrae la mezcla con éter dietílico. Los extractos orgánicos combinados se reparten con salmuera, se secan y se evaporan para dar el compuesto de fórmula (XVI, X = O o S, n = 2, ácido propanoico).



A continuación se añade el compuesto de fórmula (XVI, X = NH, n = 2) a una mezcla de P₂O₅ y H₃PO₄ a 100°C. Se agita la mezcla, determinándose la terminación de la reacción por LC-MS. Una vez terminada, se interrumpe la reacción con hielo y se filtra el precipitado, se lava con agua, y se seca para dar un sólido blanquecino de fórmula (XVII, X = NH, n = 2). En una forma de realización alternativa, se disuelve un ácido fenoxipropanoico (XVI, X = O, o S, n = 2) en benceno y se añade P₂O₅. Se calienta la mezcla a reflujo hasta su terminación y a continuación se enfría a temperatura ambiente. Se separa el benceno por decantación y se inactiva el residuo con agua helada. Se extrae la mezcla con éter dietílico y los extractos orgánicos combinados se reparten con bicarbonato sódico saturado y se secan sobre sulfato sódico, a continuación se filtra y se evapora a sequedad al vacío. Se purifica el residuo mediante cromatografía en columna para dar un compuesto de fórmula (XVII, X = O o S, n = 2).



Puede prepararse un compuesto que tiene la fórmula (XIX) como se ha mostrado en general anteriormente, haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (XVIII) (síntesis descrita en la sección de Ejemplos) con un compuesto de fórmula (XVII) en condiciones de alquilación reductora. Los ejemplos específicos del procedimiento se describen a más adelante en el Ejemplo 1.

Los compuestos de la presente invención son activos frente a una variedad de bacterias patógenas importantes, que incluyen organismos Gram positivos, tales como estafilococos, por ejemplo *S. aureus*, cepas Oxford y coagulasa negativas de estafilococos, tales como *S. epidermidis*; estafilococos, por ejemplo *S. pyogenes* ATCC19615 y *S. pneumoniae* R6; *Clostridium*, por ejemplo, *C. difficile*, y enterococos, por ejemplo *E. faecalis* 1 y *E. faecium*. Preferentemente, los compuestos de la presente invención también son activos frente a organismos Gram negativos, tales como *Haemophilus*, por ejemplo *H. influenzae* Q1; *Moraxella*, por ejemplo *M. catarrhalis* 1502; *Helicobacter*, por ejemplo *H. pylori* ATCC700824 y *Escherichia*, por ejemplo *E. coli* DCO. Los compuestos más preferentes de la presente invención serán activos frente a los microorganismos *C. difficile*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *H. influenzae* y *M. catarrhalis* y *H. pylori*.

Además, los compuestos de la presente invención son activos frente a organismos estafilococos tales como *S. aureus* y cepas coagulasa negativas de estafilococos, tales como *S. epidermidis* que son resistentes (incluyendo la resistencia múltiple) a otros agentes antibacterianos, por ejemplo, antibióticos β-lactámicos tales como, por ejemplo, meticilina, macrólidos, aminoglucósidos, oxazolidinonas, y lincosamidas. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención resultan útiles en el tratamiento de MRSA y MRCNS.

Los compuestos de la presente invención también son activos frente a cepas de *E. faecalis* incluyendo cepas resistentes a la vancomicina y por lo tanto de uso en el tratamiento de infecciones asociadas con organismos VRE. Además, los compuestos de la presente invención resultan útiles en el tratamiento de organismos estafilococos que son resistentes a mupirocina.

Los compuestos de la invención son especialmente potentes, es decir, activos, frente a las cepas de *Clostridium* incluyendo *C. difficile*. Por lo tanto, los compuestos de la invención pueden utilizarse para tratar infecciones asociadas con *C. difficile*, por ejemplo, colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico, y otras diarreas asociadas a antibióticos (DAA).

Sin embargo, los compuestos de la invención no son activos frente a las células de mamíferos. Esto proporciona una combinación óptima de elevada actividad frente a bacterias patógenas y baja o nula actividad frente a células de mamífero, lo que permite el uso de los compuestos de la invención en el tratamiento de mamíferos, y en concreto de seres humanos.

Las infecciones bacterianas que pueden tratarse incluyen infecciones de las vías respiratorias, otitis media,

meningitis, endocarditis, infecciones de la piel y de tejidos blandos en el hombre, mastitis en el ganado, así como infecciones respiratorias en animales de granja tales como cerdos y ganado vacuno. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar infecciones bacterianas en animales humanos o no humanos, procedimiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I)-(XIV) como se ha definido anteriormente en el presente documento, a un animal humano o no humano que necesite tal terapia. Se entenderá que un compuesto de la presente invención que tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana, incluyendo la actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, será de uso general en la sociedad para el tratamiento empírico de las infecciones comunitarias. En comparación, es más probable que en circunstancias en las que se ha identificado el organismo patógeno causante, se utilice un compuesto de la presente invención con un espectro más limitado, por ejemplo, la actividad frente a bacterias Gram positivas.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos de fórmula (I)-(XIV) junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden combinaciones de compuestos de fórmula (I)-(XIV) junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede incluir un compuesto de fórmula (V) y un compuesto de fórmula (VII) en combinación con el vehículo o excipiente.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar infecciones bacterianas en mamíferos, especialmente en seres humanos y en animales domésticos, que comprende administrar un compuesto de la invención, o una composición de acuerdo con la invención, a un paciente que lo necesite.

La invención proporciona adicionalmente el uso de compuestos de la invención en la preparación de una composición de medicamento para uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.

Los compuestos y las composiciones de acuerdo con la invención pueden formularse para su administración de cualquier modo conveniente para su uso en medicina y veterinaria, por analogía con otros antibióticos.

Los compuestos y las composiciones de acuerdo con la invención pueden formularse para su administración por cualquier vía, por ejemplo oral, tópica, parenteral o rectal. Las composiciones pueden, por ejemplo, hacerse en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas para chupar, cremas, supositorios, pomadas, geles, lociones, jarabes o preparaciones líquidas, por ejemplo soluciones o suspensiones, que pueden formularse para uso oral o en forma estéril para su administración parenteral por inyección o infusión.

Los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden estar en forma farmacéutica unitaria, y pueden contener excipientes convencionales que incluyen, por ejemplo, agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, sacarosa, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes para la fabricación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo almidón de patata; y agentes humectantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo lauril sulfato sódico. Los comprimidos pueden recubrirse de acuerdo con procedimientos conocidos en la práctica farmacéutica normal.

Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, que incluyen, por ejemplo, agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo aceite de almendra, ésteres oleosos (por ejemplo glicerina), propilenglicol, o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico; y, si se desea, agentes colorantes y saboríferos convencionales.

Las composiciones de acuerdo con la invención destinadas a la administración tópica pueden estar, por ejemplo, en forma de pomadas, cremas, lociones, pomadas oculares, gotas oculares, gotas para los oídos, apósitos impregnados y aerosoles, y pueden contener aditivos convencionales apropiados, que incluyen, por ejemplo, conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, y emolientes en pomadas, geles y cremas. Tales formulaciones tópicas también pueden contener vehículos convencionales compatibles, por ejemplo bases de crema o pomada, y etanol o alcohol oleílico para lociones. Tales vehículos pueden constituir de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 98% en peso de la formulación; más habitualmente constituirán hasta aproximadamente el 80% en peso de la formulación.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden formularse como supositorios, que pueden contener bases de supositorio convencionales, por ejemplo manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones de acuerdo con la invención destinadas a la administración parenteral pueden estar convenientemente en formas farmacéuticas unitarias fluidas, que pueden prepararse utilizando el compuesto y un

vehículo estéril, resultando preferente el agua. El compuesto, dependiendo del vehículo y de la concentración utilizada, puede estar suspendido o disuelto en el vehículo. En la preparación de soluciones, el compuesto puede disolverse en agua para inyección y esterilizarse por filtración antes de introducirse en un vial o ampolla adecuada, que a continuación se sella. Ventajosamente, pueden disolverse en el vehículo aditivos convencionales que incluyen, por ejemplo, anestésicos locales, conservantes y agentes tampón. Con el fin de mejorar la estabilidad de la solución, la composición puede congelarse después de introducirse en el vial, y el agua eliminarse al vacío; a continuación puede sellarse el polvo liofilizado seco resultante en el vial y puede suministrarse un vial adjunto de agua para inyección para reconstituir el líquido antes de su uso. Las suspensiones parenterales pueden prepararse básicamente de la misma manera salvo que el compuesto se suspende en el vehículo en lugar de disolverse y la esterilización no puede llevarse a cabo por filtración. El compuesto puede esterilizarse en su lugar por exposición a óxido de etileno antes de ser suspendido en el vehículo estéril. Ventajosamente, en tales suspensiones se incluye un agente tensioactivo o humectante con el fin de facilitar la distribución uniforme del compuesto.

Puede administrarse convenientemente al paciente un compuesto o una composición de acuerdo con la invención en una cantidad antibacteriana eficaz.

Una composición de acuerdo con la invención puede contener convenientemente del 0,1% en peso, preferentemente del 10 al 60% en peso, de un compuesto de acuerdo con la invención (en base al peso total de la composición), dependiendo del procedimiento de administración.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden administrarse convenientemente al paciente a una dosis diaria de 1,0 a 100 mg/kg de peso corporal. Para un ser humano adulto (de aproximadamente 70 kg de peso corporal), pueden administrarse diariamente de 50 a 3.000 mg, por ejemplo aproximadamente 1.500 mg, de un compuesto de acuerdo con la invención. Convenientemente, la dosificación para seres humanos adultos es de 5 a 40 mg/kg al día. Sin embargo, pueden utilizarse dosis mayores o menores de acuerdo con la práctica clínica normal.

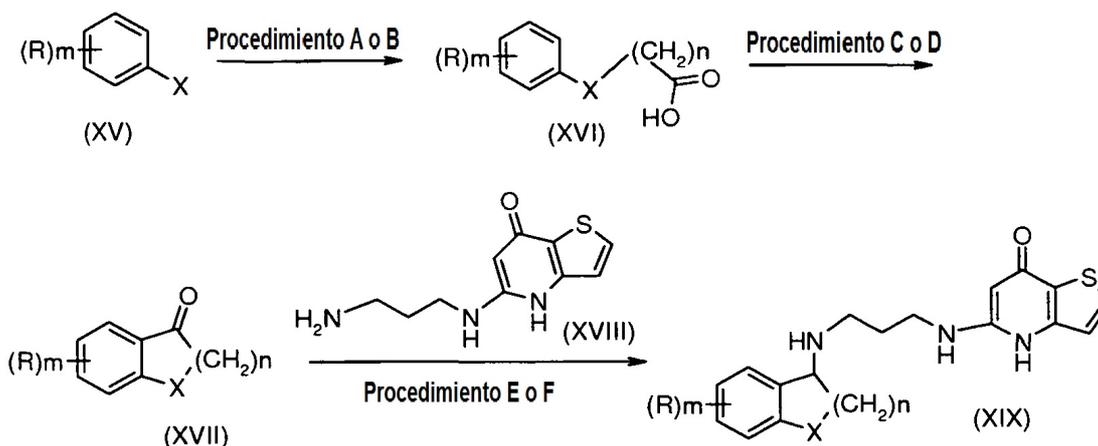
Cuando las composiciones de acuerdo con la invención se presentan en forma farmacéutica unitaria, cada dosis unitaria puede comprender convenientemente de 25 a 1.000 mg, preferente de 50 a 500 mg, de un compuesto de acuerdo con la invención.

Los ejemplos 13 a 18 que se presentan a continuación ilustran la potente actividad antibacteriana de los compuestos de la presente invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos de la presente invención



Procedimiento A: Se disolvió una anilina de fórmula (XV, X = NH₂, 30 mmol) en acetonitrilo y se añadió β-propiono-lactona (un equivalente). Se agitó la mezcla a reflujo durante 3 horas y a continuación se diluyó con agua y se elevó el pH con hidróxido sódico a pH = 9. Se extrajo la mezcla con diclorometano tres veces y se separó la capa acuosa y se redujo el pH a aproximadamente 5,0 con HCl concentrado. Se recogió el precipitado concomitante (fórmula XVI) en un embudo de vidrio sinterizado y se lavó la torta con agua hasta que el filtrado alcanza un pH neutro. A continuación, se secó el sólido al vacío para producir el compuesto de fórmula (XVI, X = NH, n = 2).

Procedimiento B: Se disolvió un fenol o tiofenol de fórmula (XV, X = OH, o SH, 30 mmol) en hidróxido sódico acuoso 2 M (30 mmol). A la mezcla, se añadió β-propiono-lactona (30 mmol) y se calentó a reflujo la reacción durante dos horas. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se acidificó con HCl a pH < 4 y se extrajo con éter dietílico. Los extractos orgánicos combinados se extrajeron con bicarbonato sódico acuoso saturado. La capa

acuosa básica se acidificó a pH < 4 y a continuación se extrajo con éter. A continuación, se repartió este extracto de éter con salmuera, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se evaporó al vacío para dar un sólido blanquecino de fórmula (XVI, X = O, o S, n = 2).

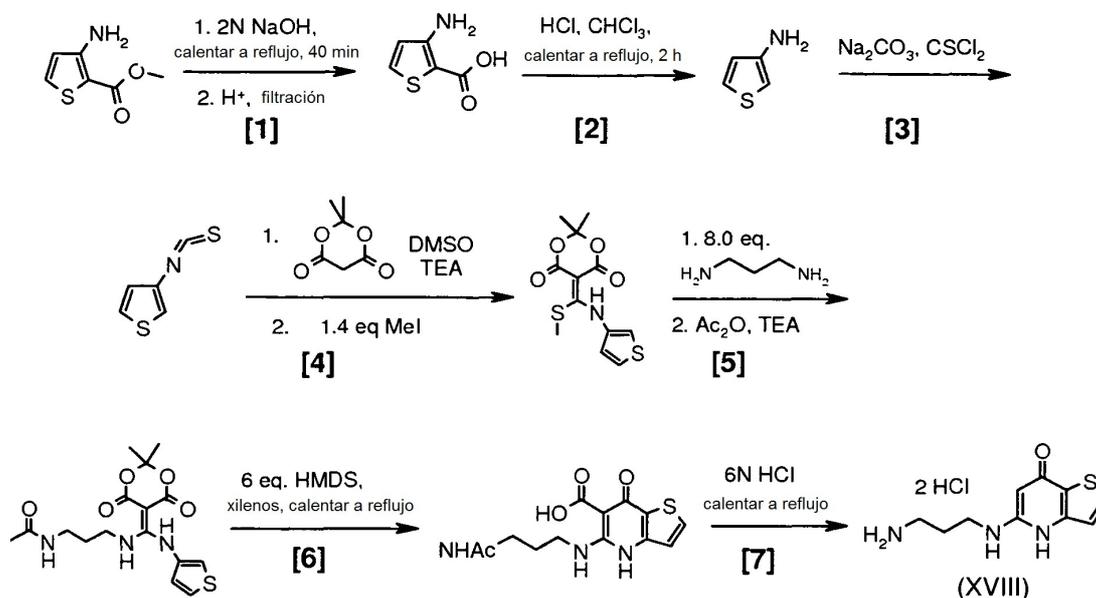
5 Procedimiento C: Se añadió un ácido fenilaminopropanoico (fórmula XVI, X = NH, n = 2, 2,0 mmol) a una mezcla de P₂O₅ (15 g) y H₃PO₄ (6 ml) a 100°C. Se agitó la mezcla durante dos horas mientras se mantenía la temperatura. Cuando terminó la reacción, según la LC-MS, se interrumpió la reacción con hielo y el precipitado se filtró y se lavó con agua y se secó al vacío para dar un sólido blanquecino de la fórmula (XVII, X = NH, n = 2).

10 Procedimiento D: Se disolvió un ácido fenoxipropanoico (fórmula XVI, X = O, o S, n = 2, 6,0 mmol) en benceno y se añadió P₂O₅. Se calentó la mezcla a reflujo durante 2 horas y a continuación se enfrió a temperatura ambiente. Se separó el benceno por decantación y se inactivó el residuo con agua helada. Se extrajo la mezcla con éter dietílico tres veces y se repartieron los extractos orgánicos combinados con bicarbonato sódico saturado, y a continuación se secó sobre sulfato sódico, se filtró, y se evaporó a sequedad al vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna, se eluyó el producto con un gradiente de acetato de etilo del 0 al 20% en hexanos, para dar un sólido blanco de fórmula (XVII, X = O, o S, n = 2).

15 Procedimiento E: Un ejemplo representativo del procedimiento E es el siguiente. Preparación de 5-[3-(8-bromo-6-cloro-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona: Se preparó una solución de diclorhidrato de 5-(3-amino-propilamino)-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona (XVIII) en metanol (0,08 M) y a continuación se trató con metóxido sódico (2 equivalentes, 0,5 M en metanol). Se añadió 8-bromo-6-cloro-2,3-dihidro-1H-quinolin-4-ona (1 equivalente) como un sólido. Se añadió cianoborohidruro sódico (3 20 equivalentes) como un sólido. A continuación, se calentó la mezcla a reflujo durante 20 horas, añadiendo un equivalente adicional de cianoborohidruro sódico después de 16 horas. Se vertió la mezcla de reacción en una columna de gel de sílice y se eluyó el producto con un 10% de NH₃ (sat.)/MeOH y diclorometano. A continuación, se eliminó el disolvente al vacío. La purificación del producto bruto se llevó a cabo mediante cromatografía flash, se eluyó el producto con un gradiente del 0 al 12% de NH₃ (sat.)/MeOH y diclorometano. Se trituró el sólido resultante 25 con éter, se aisló por filtración, y se secó para dar el compuesto del título como un sólido blanco (fórmula XIX, X = NH).

Procedimiento F: Un ejemplo representativo del procedimiento F es el siguiente. Preparación de 5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona: Se preparó una solución de diclorhidrato de 5-(3-amino-propilamino)-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona (XVIII) en metanol (0,125 M). Se trató esta 30 solución con metóxido sódico (0,5 M en metanol, 2 equivalentes) y exceso de ácido acético (0,5 ml/mmol). Se añadió 6,8-dibromo-croman-4-ona (un equivalente) como un sólido. Se calentó la reacción a reflujo. Una vez que se obtuvo una solución transparente, se retiró el calor y se añadió cianoborohidruro sódico (2 equivalentes) como un sólido. A continuación, se calentó la mezcla a reflujo durante 48 horas. Se vertió la mezcla de reacción en agua (6x el volumen de metanol). Se aisló el sólido resultante por filtración al vacío a través de celite. A continuación se recogió el sólido en metanol y se filtró para eliminar el celite. Se llevó a cabo la purificación del producto bruto mediante cromatografía flash, se eluyó el producto con un gradiente del 0 al 12% de NH₃ (sat.)/MeOH y diclorometano, para 35 dar el compuesto del título como un sólido blanco (fórmula XIX, X = O, o S).

Síntesis del compuesto XVIII, sal de clorhidrato de 5-(3-amino-propilamino)-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona



Etapa [1]: Se suspendió metil éster de 3-aminotiofeno-2-carboxílico (31 g, 0,197 mmol) en NaOH 2N (acuoso) (150 ml) y se calentó a reflujo durante 40 minutos. La solución resultante se enfrió y se acidificó mediante HCl concentrado a pH 2. La suspensión resultante se filtró y se dejó sobre la membrana de filtro aplicando vacío constante al matraz de filtración durante una hora.

- 5 Etapa [2]: Se suspendió la torta húmeda de sal de clorhidrato del ácido 3-aminotiofeno-2-carboxílico (Barker, J.M., y col. Synthetic Comm. 1995, 25, 3729-3734) en cloroformo (300 ml) en presencia de cloruro de hidrógeno concentrado (1 ml) y se calentó a reflujo hasta consumir todo el material de partida. Se dejó que la reacción alcanzase la temperatura ambiente y se llevó la solución de reacción a la siguiente etapa.

- 10 Etapa [3]: Se trató la solución orgánica resultante (véase la etapa [2]) con carbonato sódico (31 a) y agua (100 ml) (pH: 8,0). La solución bifásica anterior se enfrió con un baño de hielo y se añadió, gota a gota, tiosfogeno (19 ml, 0,236 mmol) controlando la temperatura de reacción por debajo de 10°C. Después de terminar la adición, se agitó la reacción durante 20 minutos. Se separó la capa orgánica, se repartió con salmuera y se secó sobre sulfato sódico anhidro. Después de la filtración y la eliminación del disolvente al vacío, se purificó la mezcla mediante una columna flash de gel de sílice, se eluyó el producto con acetato de etilo/hexano (1:4), para proporcionar el producto deseado 3-tiofeno isotiocianato (14a, 50%) como un aceite oscuro. ¹H RMN (CDCl₃): 7,27 (1H, m), 7,17 (1H, m), 6,98 (1H, d, J = 5,2 MHz) ppm.

- 20 Etapa [4]: Se trató 3-tiofeno isotiocianato (14 g, 99 mmol) con 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (15,7 g, 109 mmol) en dimetilsulfóxido (85 ml) en presencia de trietilamina (15,3 g, 109 mmol) y se agitó durante 10 horas. A continuación, se trató la mezcla con yodometano (14,78 g, 104 mmol) por adición lenta durante 2 horas. Se comprobó el punto final de la reacción mediante HPLC. Se añadió lentamente agua (500 ml) a la mezcla anterior para precipitar el producto. Después de la filtración y el secado al vacío, se obtuvo 2,2-dimetil-5-(metilsulfanil-tiofeno-3-ilamino-metileno)-[1,3]dioxano-4,6-diona (27,38 g, 94%) como un sólido de color canela. ¹H RMN (CDCl₃): 12,7 (1H, brs), 7,38 (1H, dd, J = 3,2, 5 MHz), 7,25 (1H, d, J = 3,2 MHz), 7,09 (1H, d, J = 5), 2,38 (3H, s), 1,76 (6H, s) ppm.

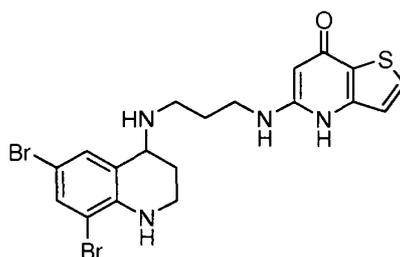
- 25 Etapa [5]: Se añadió una solución de 2,2-dimetil-5-(metilsulfanil-tiofeno-3-ilamino-metileno)-[1,3]dioxano-4,6-diona (27,83 g, 92,8 mmol) en DCM/MeOH (4:1, 120 ml) a una solución de 1,3-diaminopropano (54,9 g, 138 mmol) en DCM/MeOH (4:1, 140 ml) (enfriado en un baño de hielo) más de una hora. Se retiró el baño de hielo después de terminar la adición. Se agitó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente, a continuación se diluyó con DCM (100 ml) y se lavó la solución orgánica resultante con agua (60 ml x 4) y salmuera (60 ml). A continuación, se añadió anhídrido acético (11 ml, 116 mmol) y trimetilamina (16 ml, 111,4 mmol) a la solución orgánica anterior y se agitó durante 30 minutos. Se llevó a cabo un tratamiento acuoso con HCl 1N, a continuación con NaHCO₃ (saturado) y a continuación con salmuera. Se secó la fase orgánica con MgSO₄, se filtró y se eliminaron los disolventes volátiles al vacío para proporcionar el producto deseado N-(3-((2,2-dimetil-4,6-dioxo-[1,3]dioxan-5-iliden)-(tiofen-3-ilamino)-metil)-amino)-propil)-acetamida (30,7 g, 84%) como un aceite marrón, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación. ¹H RMN (CDCl₃): 11,3 (1H, br s), 10,0 (1H, br s), 7,33 (1H, dd, J = 3,2, 5 MHz), 7,07 (1H, d, J = 3,2 MHz), 6,98 (1H, d, J = 5), 3,20 (2H, cuarto, J = 6,4 MHz), 3,90 (1H, cuarto. J = 6,8 MHz), 1,94 (3H, s), 1,73 (6H, s), 1,68 (2H, m) ppm.

- 40 Etapa [6]: Se calentó a reflujo una solución de N-(3-((2,2-dimetil-4,6-dioxo-[1,3]dioxan-5-iliden)-(tiofen-3-ilamino)-metil)-amino)-propil)-acetamida (30,65 g, 83,5 mmol) y hexametildisilazano (40,4, 251 mmol) en xilenos (150 ml) durante 4 horas, y a continuación se concentró a sequedad. Se trató cuidadosamente el aceite resultante con metanol (20 ml). Se eliminó el metanol para dar un sólido como el producto deseado 5-(3-acetamida-propilamino)-6-carboxil-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona. ¹H RMN (D₆-DMSO): 11,9 (1H, br s), 9,91 (1H, br s), 8,04 (1H, d, J = 4,8 MHz), 7,90 (1H, br s), 7,27 (1H, d, J = 4,8 MHz), 3,41 (1H, cuarto. J = 6,0 MHz), 3,20 (2H, cuarto, J = 6,0 MHz), 1,78 (3H, s), 1,74 (2H, m) ppm.

- 45 Etapa [7]: Se suspendió 5-(3-acetamida-propilamino)-6-carboxil-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona (bruto de la Etapa [6]) en HCl 6N (200 ml) y se calentó a reflujo durante 16 horas. Después de evaporar la solución acuosa al vacío, se disolvieron las sales resultantes en etanol/agua (85:15, 100 ml), y se calentó a reflujo con carbón vegetal durante 20 minutos. A continuación, la filtración proporcionó una solución marrón, y se añadió a la solución acetato de etilo (400 ml) para precipitar el producto deseado. La filtración y el aclarado con acetato de etilo proporcionaron el producto final puro (23,8 g, 96%) como un sólido de color canela. ¹H RMN (D₂O) para la sal de clorhidrato de 5-(3-amino-propilamino)-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona (XVI): 7,77 (1H, d, J = 5,6 MHz), 7,14 (1H, d, J = 5,6 MHz), 3,35 (1H, t. J = 6,4 MHz), 3,13 (2H, t, J = 7,6 MHz), 2,03 (2H, m) ppm.

Ejemplo 2: Preparación de 5-[3-(6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

- 55 Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.

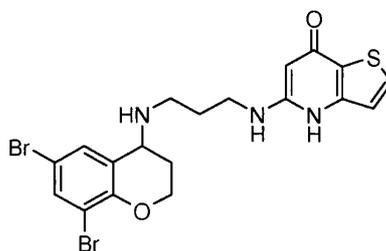


(V)

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,69 (d, 1H), 7,39 (d, 1H), 7,25 (d, 1H), 7,03 (d, 1H), 5,57 (s, 1H), 3,81 (t, 1H), 3,33-3,39 (m, 3H), 2,82 (m, 2H), 2,00-2,10 (m, 1H), 1,87 (m, 4H). MS (ES⁺): M/Z 512 (M+1).

Ejemplo 3: Preparación de 5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

- 5 Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.

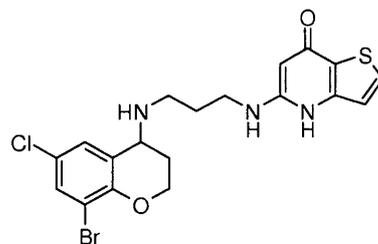


(VI)

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,69 (d, 1H), 7,53 (s, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,04 (d, 1H), 5,57 (s, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,24 (m, 1H), 3,84 (t, 1H), 3,34 (t, 2H), 2,79 (m, 2H), 2,03 (m, 2H), 1,86 (m, 2H). MS (ES⁺): M/Z 514 (M+1).

10 **Ejemplo 4: Preparación de 5-[3-(8-bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona**

Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.

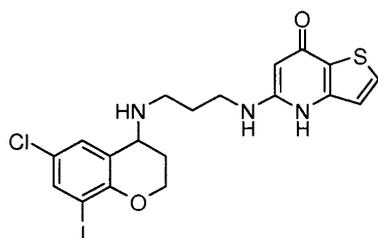


(VII)

- 15 ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,69 (d, 1H), 7,42 (d, 1H), 7,36 (d, 1H), 7,03 (d, 1H), 5,57 (s, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,91 (t, 1H), 3,35 (t, 2H), 2,84 (m, 2H), 2,07 (m, 2H), 1,88 (m, 2H). MS (ES⁺): M/Z 470 (M+1).

Ejemplo 5: Preparación de 5-[3-(6-cloro-8-yodo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.

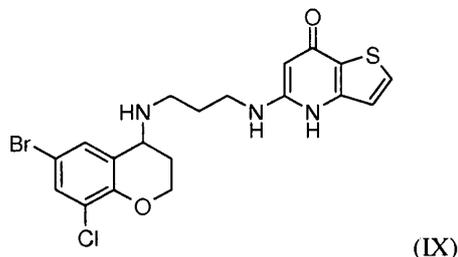


(VIII)

- 20 ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,64 (d, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,32 (d, 1H), 6,98 (d, 1H), 5,52 (s, 1H), 4,33 (m, 1H), 4,23 (m, 1H), 3,77 (t, 1H), 3,29 (t, 2H), 2,75 (m, 2H), 1,97 (m, 2H), 1,82 (m, 2H). MS (ES⁺): M/Z 516 (M+1).

Ejemplo 6: Preparación de 5-[3-(6-bromo-8-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

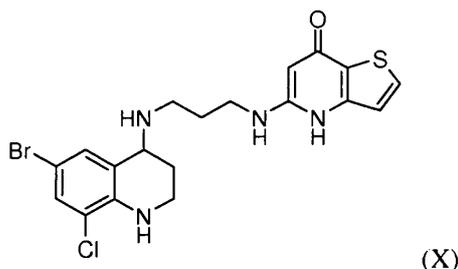
Seguendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.



- 5 ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,69 (d, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,04 (d, 1H), 5,58 (s, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 3,84 (t, 1H), 3,34 (t, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,04 (m, 2H), 1,87 (m, 2H). MS (ES⁺): M/Z 470 (M+1).

Ejemplo 7: Preparación de 5-[3-(6-bromo-8-cloro-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

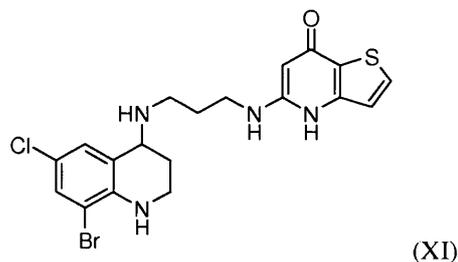
- 10 Seguendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.



- 15 ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,69 (d, 1H), 7,22 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,03 (d, 1H), 5,57 (s, 1H), 3,78 (t, 1H), 3,45-3,33 (m, 4H), 2,80 (m, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,90-1,79 (m, 3H). MS (ES⁺): M/Z 469 (M+1).

Ejemplo 8: Preparación de 5-[3-(8-bromo-6-cloro-1,2,3,4-tetrahidro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

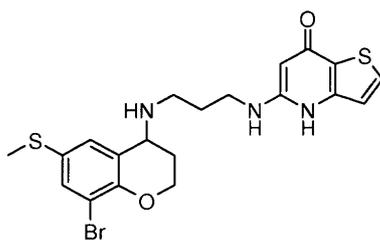
- 15 Seguendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.



- 20 ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7,69 (d, 1H), 7,27 (s, 1H), 7,13 (s, 1H), 7,03 (d, 1H), 5,57 (s, 1H), 3,79 (br s, 1H), 3,50-3,33 (m, 4H), 2,82 (m, 2H), 2,04 (m, 1H), 1,92-1,78 (m, 3H). MS (ES⁺): M/Z 469 (M+1).

Ejemplo 9: Preparación de 5-[3-(8-bromo-6-metilsulfanil-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

Seguendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.

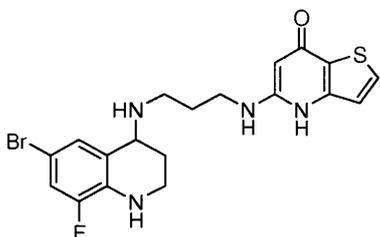


(XII)

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,70 (d, 1H), 7,36 (s, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,02 (d, 1H), 5,58 (s, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 3,86 (t, 1H), 3,35 (t, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,05 (m, 2H), 1,88 (m, 2H). MS (ES⁺): M/Z 481,7 (M+1).

Ejemplo 10: Preparación de 5-[3-(6-bromo-8-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona

5 Siguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.

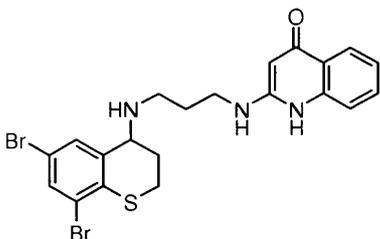


(XIII)

10 ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7,69 (d, 1H), 7,11 (s, 1H), 7,03 (d, 1H), 7,00 (d, 1H), 5,57 (s, 1H), 3,79 (br s, 1H), 3,40-3,33 (m, 4H), 2,82 (m, 2H), 2,04 (m, 1H), 1,92-1,78 (m, 3H). MS (ES⁺): M/Z 452 (M+1).

Ejemplo 11: Preparación de 2-[3-(6,8-dibromo-1-benzotiopiran-4-ilamino)-proplamino]-1H-quinolin-4-ona

Seguiendo el procedimiento general de síntesis descrito en el Ejemplo 1, se preparó el siguiente compuesto. Los datos espectrales confirman la identidad del compuesto.



(XIV)

15 ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,06 (d, 1H), 7,51 (m, 3H), 7,32 (d, 1H), 7,22 (d, 1H), 5,65 (s, 1H), 3,83 (bs, 1H), 3,39 (t, 2H), 2,97 (m, 1H), 2,77 (m, 2H), 2,34 (m, 1H), 1,86 (m, 4H).

Ejemplo 12: Expresión y purificación de MetRS

El siguiente Ejemplo ilustra la expresión y la purificación de MetRS de *C. difficile* útil en los ensayos funcionales mostrados en los Ejemplos 13, 14 y 15.

20 **Clonación de un vector sobreproductor:** Se amplificó MetRS de *C. difficile* marcada en el extremo N-terminal con hexaHis y se clonó en pETcoco-2. Se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar ADN a partir de ADN genómico: 5'-CTGCAGAGCTAGCAAACCGAGTTTTATGTAAC-3' (directo) (SEQ ID NO: 1), 5'-CTTCTAAGCTTCTACTAACGAACCTCGGATCC-3' (inverso) (SEQ ID NO: 2). Se trató el ADN amplificado con Sph1 y endonucleasas de restricción HindIII, que se inactivaron por calor después de la digestión. Se hizo precipitar el fragmento con etanol y se combinó con el vector pETcoco-2 (Novagen) que había sido tratado con las mismas enzimas y con fosfatasa alcalina de camarón. Se ligaron los fragmentos y se transformó la mezcla de ligación en *E. coli* DH10 competentes. Se cultivaron los transformantes en medio F y glucosa con 50 ug/ml de ampicilina. El crecimiento en glucosa mantiene el estado reprimido del promotor pBAD que activa la expresión del replicador TifA, manteniendo así bajo número de copias. Se confirmó el clon de expresión resultante, pETcoco-Cdiff-MRS, por secuenciación del inserto en ambas direcciones.

Purificación de MetRS de *C. difficile*. Se transformó el vector de expresión pETcoco-Cdiff-MRS en la cepa de

expresión Rosetta DE3 y se utilizó para inocular 4 litros de medio F complementado con 10 ug/ml de cloranfenicol, 50 ug/ml de ampicilina, glucosa al 0,2%. Se indujo el cultivo con IPTG 1 mM a una DO de 0,66. Se recogieron las células a las 4 horas después de la inducción (rendimiento = 38 g de sedimento celular). Se lisaron las células sedimentadas añadiendo 78 g de una suspensión 1:1 de células congeladas (39 g de células) en Tris-sacarosa que se habían almacenado a -20°C, a 107,25 ml de tampón Tris-sacarosa que había sido precalentado a 45°C (2,75 ml/g de células). A la mezcla agitada, se añadieron 1,95 ml de 0,5M de 1,4-ditiotreitol (DTT) (0,05 ml/g de células) y 9,75 ml de tampón de lisis (NaCl 2 M, espermidina 0,3 M en Tris-sacarosa ajustado a pH 7,5) (0,25 ml/g de células). Se sometió a ensayo el pH de la suspensión con papel de pH y se ajustó a pH 8,0 añadiendo 50 ml de base Tris 2 M. Se añadió lisozima (117 mg) en 20 ml de tampón Tris-sacarosa (3 mg, lisozima/g de células). Se distribuyó la suspensión en frascos de centrifuga y se incubó a 4°C durante 1 hora, seguido de incubación a 37°C durante 4 minutos. Se eliminaron los componentes celulares insolubles por centrifugación (23.000 x g, 60 minutos, 4°C). El sobrenadante recuperado (192 ml) constituía la Fracción I. Se cargó la Fracción I en una columna de 15 ml de Ni-NTA que se equilibró en tampón de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10%, KCl 40 mM, imidazol 10 mM, pH 6,8, y mercaptoetanol beta 7 mM). Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10%, KCl 800 mM, imidazol 20 mM, pH 6,8, y mercaptoetanol beta 7 mM). Se eluyó la proteína en gradiente de 10 volúmenes de columna de tampón de lavado a tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10%, KCl 40 mM, imidazol 250 mM, pH 6,8, y mercaptoetanol beta 7 mM) a 0,5 ml/min recogiendo fracciones de 3 ml. Se recogieron y se analizaron las fracciones para la determinación de proteína por SDS-PAGE. Se sometieron a ensayo las fracciones en el ensayo de carga de MetRS-ARNt de *C. difficile*. Se agruparon las fracciones que contenían el pico de actividad para formar la Fracción II (60 mg en 1,3 mg/ml). La Fracción II tenía una actividad específica de $3,2 \times 10^5$ unidades por miligramo. Se estimó una pureza superior al 97% en base a la densitometría de un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie.

Ejemplo 13: Los compuestos de la presente invención tienen una potente actividad frente a las enzimas MetRS.

Los compuestos de la presente invención pueden someterse a ensayo para determinar su capacidad para inhibir la enzima MetRS, utilizando MetRS recombinante de la siguiente manera:

Mezcla de reacción (por 1 ml)

Reserva	Volumen (µl)	Concentración Final
Tris/Cl 100 mM, pH 7,9	600	30 mM
KCl 250 mM		75 mM
ATP 125 mM	40	2,5 mM
MgCl ₂ 250 mM	80	10 mM
DTT 50 mM	80	2 mM
Met 1 mM (H-3 caliente y frío)	20	10 µM
ARNt sólido (<i>E. coli</i> MRE 600 mezclada)	4 mg/ml	2 mg/ml
H ₂ O	180	
10 x inhibidor (0 - 100 µM) 5 µl por pocillo	0 - 10 µM	

La reacción se inició añadiendo 20 µl de enzima pura convenientemente diluida (preincubada con el inhibidor) a 25 µl de mezcla de reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió añadiendo 150 µl de citrato sódico 167 mM, pH 2,15 que contenía perlas SPA de fosfodiesterasa (PDE) (0,833 mg/ml). La unión del producto radiomarcado a la perla pone lo suficientemente cerca el isótopo para permitir que la radiación del tritio excite el centelleador dentro de la perla. Cualquier radiomarcador no unido no está lo suficientemente cerca del centelleador para permitir esta transferencia de energía, por lo que no se genera ninguna señal. Después de la interrupción de la reacción, se centrifugan las placas a 2.500 rpm durante 5 min en una centrifuga de placa Mistral 3000E (o, de manera alternativa, se deja reposar durante 1 hora). El ensayo se lleva a cabo en Optiplates de 96 pocillos (Packard). El recuento de las placas se hace en un TopCount (contador de 96 pocillos de Packard).

Reactivos: El ATP y la ARNt de *E. coli* MRE 600 mezclada se adquirieron en Boehringer-Mannheim, las perlas de centelleo por proximidad (SPA) de fosfodiesterasa y L-[metil-³H]metionina de Amersham Pharmacia Biotech y los demás reactivos de Sigma.

Resultados: Los datos indican que los compuestos de la invención tienen valores de CI₅₀ frente a MetRS en el intervalo comprendido entre < 1,5 y 100 nM. Todos son altamente selectivos con respecto a la enzima de mamífero (sin inhibición de la MetRS de rata hasta 1 µM). Los inhibidores de MetRS son inhibidores competitivos de metionina e inhibidores no competitivos de ATP.

Ejemplo 14: Los compuestos de la presente invención tienen una potente actividad antibacteriana frente a *C. difficile*.

Los compuestos de la presente invención también pueden someterse a ensayo para determinar su capacidad de inhibir el crecimiento de *C. difficile*. Se determinó la CIM₉₀ (concentración inhibitoria mínima requerida para inhibir el crecimiento del 90% de *C. difficile*) utilizando ensayos basados en agar convencionales.

5 **Organismos:** Se sometieron a ensayo todos los compuestos para determinar la actividad antibacteriana frente a un grupo de aislados clínicos de no repetición de *C. difficile*. Los organismos se almacenaron congelados en caldo *Brucella* complementado con glicerol al 20%. Se recuperaron los organismos del congelador y se subcultivaron dos veces en agar CDC para garantizar la pureza y el crecimiento. Se incubaron las placas en condiciones anaerobias durante por lo menos 24 horas. Las colonias bacterianas se examinaron para determinar la morfología; color amarillo, textura de vidrio esmerilado y olor característico. El organismo testigo sometido a ensayo fue *Bacteroides*
10 *fragilis* ATCC 25285.

Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana: Se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad antimicrobiana mediante el procedimiento de dilución en agar sobre agar *Brucella* complementado con vitamina K₁, hemina y sangre de oveja lacada al 5% de acuerdo con las directrices del CLSI (CLSI, M11-A2). Se realizaron diluciones seriadas de los compuestos de ensayo y se añadieron a agar *Brucella* complementado fundido. Se inocularon placas libres de fármaco antes y después de la inoculación de cada serie de placas antimicrobianas y se utilizaron como testigos de crecimiento. Se llevaron a cabo controles de crecimiento anaerobio/aerobio en placas libres de fármaco después de dos grupos de placas con fármaco. Se suspendieron las colonias de bacterias en caldo *Brucella* a una turbidez igual a la del patrón 0,5 de McFarland y se aplicó a una placa con un replicador de Steers que proporcionaba 10⁵ CFU/mancha. Se incubaron las placas en condiciones anaerobias durante 24 horas a 35°C antes de la lectura
15 de los resultados. La concentración inhibitoria mínima (CIM) es la concentración que inhibe completamente el crecimiento o provoca una marcada reducción en la aparición de crecimiento en comparación con la del testigo de crecimiento libre de fármaco. **Resultados:** Los MIC₉₀ de los compuestos ilustrados en los ejemplos oscilan entre 0,5 y 8 µg/ml. Estos resultados indican la potente actividad de los compuestos de la presente invención frente a *C. difficile*, por lo general alrededor de 1,0 µg/ml. Además, los datos del CI₅₀ indican que los compuestos de la presente invención son específicos para *C. difficile*, que presenta poca o ninguna actividad frente a la MetRS de mamíferos. Los compuestos inhibidores de MetRS presentan una potente actividad frente a *C. difficile* y bacterias aerobias Gram-positivas sin dañar la flora intestinal normal.
20
25

Ejemplo 15: Los compuestos de la presente invención tienen una potente actividad antibacteriana frente a otras bacterias

30 Se sometieron a ensayo los compuestos de la presente invención para determinar la actividad antibacteriana frente a un panel de bacterias Gram-positivas. Se sometieron a ensayo los compuestos frente a bacterias aerobias Gram-positivas utilizando el procedimiento de microdilución en caldo de referencia del CLSI. Se obtuvieron datos frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. Los compuestos sometidos a ensayo demostraron una potente actividad antibacteriana frente a todos los aislados con un valor de
35 CIM de < 0,008 a 8 µg/ml, incluyendo cepas resistentes de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes*. También se obtuvieron datos frente a *Helicobacter*, *H. pylori* utilizando procedimiento convencional de dilución en agar según la directriz del CLSI y los resultados indican que los compuestos de la invención son activos frente a *H. pylori*.

Los datos ilustraron la utilidad del uso de los compuestos de la presente invención como agentes antibacterianos frente a otras bacterias Gram-positivas, por ejemplo, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis*,
40 y *S. haemolyticus* y frente a la bacteria Gram-negativa *H. pylori*.

Ejemplo 16: Los compuestos de la presente invención muestran una gran utilidad terapéutica durante los ensayos in vivo:

Se llevaron a cabo estudios con animales para determinar la eficacia de los inhibidores de MetRS para tratar las infecciones por *C. difficile*. Los inhibidores de MetRS sometidos a ensayo fueron 5-[3-((R)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona (la mezcla racémica y el enantiómero R) y 5-[3-((R)-8-bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona. También se sometió a ensayo la 2-(3-{3,5-dibromo-2-[2-(4-metil-tiazol-5-il)-etoxi]-bencilamino}-propilamino)-1H-quinolin-4-ona.
45

Se compararon los resultados con hámsteres infectados con *C. difficile* tratados con el antibiótico convencional, la vancomicina. Se trató a los hámsteres infectados con una solución o suspensión de un inhibidor de MetRS en una cantidad de 5 a 50 mg/kg o vancomicina en una cantidad de 2,5, 5 ó 25 mg/kg. Ocho hámsteres por grupo llegaron vivos hasta el punto final del experimento. Se examinaron los hámsteres muertos para determinar la enfermedad gastrointestinal.
50

Los datos de los estudios indicaron que los hámsteres testigos (infectados con *C. difficile*, pero que no recibieron tratamiento) murieron a los 3 ó 4 días. Los animales tratados con inhibidores de MetRS presentaron un aumento significativo de la supervivencia, viviendo con frecuencia hasta la finalización del estudio, por lo general 28 días o más. Estos resultados fueron similares o superiores a los resultados obtenidos utilizando el tratamiento con vancomicina. La 5-[3-((R)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona demostró la mayor eficacia. La 5-[3-((R)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona presentó una
55

eficacia superior a la vancomicina al observarse una supervivencia > 60 % en el Día 28 (5 mg/kg dos veces al día) en comparación con un 0 a un 10% de supervivencia con vancomicina. Los animales supervivientes tenían una histopatología y un aspecto gastrointestinal saludable. Se observó en los hámsteres una biodisponibilidad y exposición sistémica bajas tras la administración oral de los inhibidores de MetRS.

- 5 Los datos de este ejemplo ilustran que los compuestos de la presente invención eran comparables o superiores a la vancomicina respecto a su capacidad para tratar animales infectados con *C. difficile*.

Ejemplo 17: Los compuestos de la presente invención tienen efecto sobre la producción de toxinas de *C. difficile*:

10 La patogenicidad de *C. difficile* está asociada con su capacidad de producir las toxinas extracelulares A y B. Las cepas hipertoxigénicas son responsables de brotes recientes con una elevada mortalidad. Por el contrario, los aislados que no producen toxinas no son patógenos. Puesto que la producción de toxinas requiere la síntesis activa de proteínas, se espera para la inhibición de la maquinaria de síntesis de proteínas suprima la producción de toxinas *de novo*. Por lo tanto, se evaluaron los inhibidores de MetRS para determinar su efecto sobre la producción de toxinas de *C. difficile in vitro*.

15 **Procedimientos:**

Se cultivó *C. difficile* cepa ATCC43255 y se mantuvo anaerobiamente en agar anaerobio CDC (Remel, Lenexa, KS). Para someter a ensayo el efecto de los agentes antibacterianos en el crecimiento, se cultivaron las células anaerobiamente durante 40 horas a 35°C en caldos de cultivo de infusión de cerebro corazón (BHI) de 96 pocillos, con un inóculo inicial de 10^6 ufc/ml. Para someter a ensayo el efecto de los agentes antibacterianos en la producción de la toxina a altas densidades celulares de *C. difficile*, se cultivaron las células anaerobiamente durante 24 horas a 35°C en caldos de cultivo de infusión de cerebro corazón (BHI) de 96 pocillos. A continuación se reemplazó el medio consumido con caldo fresco que contenía agentes de control e inhibidores de MetRS en un intervalo de concentraciones de 0,015 a 16 µg/ml. Después de 4 días, se controlaron el crecimiento y la viabilidad celular mediante mediciones de la densidad óptica a 595 nm y mediante cultivo en agar anaerobio CDC, respectivamente. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo, y se detectó la toxina A mediante ELIFA (ensayo de inmunofiltración ligado a enzimas) utilizando un anticuerpo monoclonal anti toxina A (Novus Biologicals, Centennial, CO).

Resultados:

Los inhibidores de MetRS 5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona y 5-(3-(3,5-dibromo-2-[2-(4-metil-tiazol-5-il)-etoxi]-bencilamino)-propilamino)-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona impedía el crecimiento de *C. difficile* en el caldo a concentraciones $\geq 0,25$ µg/ml.

Se inhibió la producción de toxina en cultivos en fase estacionaria de 4 días de alta densidad celular mediante cuatro inhibidores de MetRS diferentes (5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona, 5-(3-(3,5-dibromo-2-[2-(4-metil-tiazol-5-il)-etoxi]-bencilamino)-propilamino)-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona, diclorhidrato de R-(+)-5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3, 2-b]piridin-7-ona, triclorhidrato de 5-[3-(6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona) a concentraciones tan bajas como 0,25 µg/ml. Por el contrario, se necesitaron concentraciones mucho más altas (4 a > 16 µg/ml) de los agentes comparativos (metronidazol, vancomicina, levofloxacina) para inhibir la producción de toxina.

Conclusiones:

Los inhibidores de MetRS demuestran efectos inhibidores sobre el crecimiento y la producción de toxina de *C. difficile* en caldos de cultivo. Además, se bloqueaba de manera eficaz la producción de toxina en los cultivos en fase estacionaria. Como consecuencia de esta supresión de la producción de toxina por los inhibidores de MetRS bacteriostáticos, *C. difficile* se vuelve básicamente no toxigénico y por lo tanto no patógeno. Este efecto es exclusivo de los inhibidores de la síntesis de proteínas, tales como los inhibidores de MetRS, cuyo modo de acción no requiere que las bacterias están creciendo activamente.

45 **Ejemplo 18: Los compuestos de la presente invención tienen efecto sobre la producción de esporas de *C. difficile*:**

C. difficile es un organismo conocido por su capacidad de formar esporas que son resistentes al calentamiento, al secado y a muchos agentes de limpieza tales como los desinfectantes. Las esporas presentes en el ambiente pueden servir como reservorio para organismos que causan enfermedades. Las infecciones por *C. difficile* se inician con frecuencia por la ingestión de esporas que germinan en el tracto gastrointestinal provocando DACD. También se cree que la retención de esporas en el intestino después del tratamiento de la DACD es una fuente importante de recidiva de la enfermedad. La reducción de la capacidad de *C. difficile* para producir esporas o la germinación de esporas podría representar un importante avance en el tratamiento de esta enfermedad. Las cubiertas de las esporas se componen principalmente de proteínas, la generación de la cubierta de la espора requiere la síntesis de proteínas y se espera que la inhibición de la síntesis activa de proteínas influya en la producción de esporas de este organismo. Por lo tanto, se evaluaron los inhibidores de MetRS para determinar su efecto sobre la producción de

esporas de *C. difficile* *in vitro*.

Procedimientos:

Se evaluaron los inhibidores MetRS para determinar su efecto sobre la esporulación de cuatro aislados clínicos de *C. difficile*, que incluían dos aislados recientes del brote que pertenecen al genotipo BI/NAP1. Se cultivaron cepas de *C. difficile* en sangre *Brucella* complementado durante 24 a 48 horas y se suspendieron las colonias en solución salina para alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland. Se diseminaron suspensiones de *C. difficile* (10 µl) sobre la superficie de placas de agar *Brucella* complementado fresco con sangre lacada de oveja al 5% que contenía inhibidores de MetRS a concentraciones comprendidas entre 0,06 y 2 µg/ml y se incubaron anaerobiamente a 35°C durante 96 horas. También se sembraron en placas alícuotas de las mismas suspensiones de células utilizadas para inocular las placas que contenían MetRS para el recuento de viables y se trató un alícuota adicional de 250 µl con 250 µl de etanol absoluto durante 1 hora a temperatura ambiente para eliminar las células vegetativas y permitir el recuento de esporas. Se determinó de nuevo la relación entre esporas y células totales para las cuatro cepas después de 96 horas de incubación en presencia de compuesto y se utilizó para comparar los efectos de los inhibidores de MetRS con los testigos libres de fármaco en las tasas de esporulación.

Resultados:

Tres de cada cuatro cepas de *C. difficile* producían un número medible de esporas y se evaluaron como se ha descrito anteriormente. El tratamiento de todas las cepas con 5-[3-((R)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona en todas las cepas presentó reducciones en la producción de esporas a 0,25x CIM (< 2% de las esporas) y a 0,5x CIM (< 1% de las esporas). Esto está en marcado contraste con los resultados obtenidos después del tratamiento con metronidazol, donde todas las cepas sometidas a ensayo presentan notables aumentos en la producción de esporas (hasta un 100% de esporas) después de la exposición a concentraciones subCIM del fármaco. El tratamiento con vancomicina inducía aumentos similares de la producción de esporas en dos cepas, pero no en una cepa en la que los recuentos de esporas permanecieron bajos.

Conclusiones:

La 5-[3-((R)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona a subCIM (0,25 y 0,5x CIM) era eficaz para evitar que las células vegetativas de *C. difficile* formasen esporas. Estos datos sugieren que la 5-[3-((R)-6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridina-7-ona también podría tener un papel útil en la prevención de brotes y en la reducción de las tasas de recidiva que se han correlacionado con la prevalencia generalizada de las esporas de *C. difficile* en el ambiente.

Aunque la invención se ha mostrado y descrito especialmente con referencia a una serie de formas de realización, los expertos en la materia entenderán que pueden hacerse cambios en la forma y en los detalles a las diversas formas de realización descritas en el presente documento, y que las diversas formas de realización descritas en el presente documento no pretenden actuar como limitaciones en el ámbito de las reivindicaciones.

Lista de secuencias

< 110> Replidyne, Inc. Guiles, Joseph
 < 120> Compuestos tienopiridona sustituidos con actividad antibacteriana
 < 130> RDYN.M.25
 < 140> 11/853,314
 < 141> 11/09/2007
 < 150> 60/826,945
 < 151> 09/26/2006
 < 150> 60/826,940
 < 151> 26/09/2006
 < 150> 60/826,954
 < 151> 09/26/2006
 < 150> 60/826,957
 < 151> 09/26/2006
 < 160> 2
 < 170> PatentIn versión 3.4
 < 210> 1

ES 2 392 897 T3

< 211> 33
< 212> ADN
< 213> Artificial

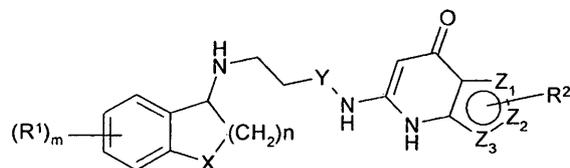
5 < 220>
< 223> Cebador
< 400> 1
ctgcagagct agcaaaccga gttttatgt aac 33

10 < 210> 2
< 211> 33
< 212> ADN
< 213> Artificial
< 220>
< 223> Cebador
< 400> 2

15 ctttctaagc ttctactaac gaacctcgga tcc 33

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):

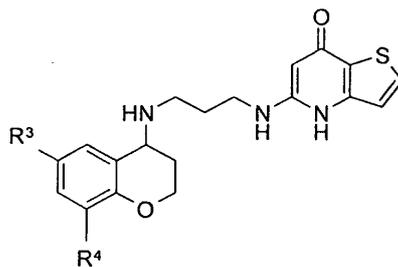


(I)

en la que:

- 5 R^1 está seleccionado de entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C_{1-6}) (opcionalmente sustituido por halo, hidroxilo, amino, mono a perfluoro alquilo (C_{1-3}), carboxi, o alcoxicarbonilo (C_{1-6})), cicloalquilo (C_{3-7}), alcoxi (C_{1-6}), amino, mono- o dialquilamino (C_{1-6}), acilamino, carboxi, alcoxicarbonilo (C_{1-6}), carboxi alcoxi (C_{1-6}), alquiltio (C_{1-6}), alquilsulfínilo (C_{1-6}), alquilsulfonilo (C_{1-6}), sulfamoílo, mono- y dialquilsulfamoílo (C_{1-6}), carbamoílo, mono- y dialquilcarbamoílo (C_{1-6}), y heterociclilo;
- 10 Y es un grupo de engarce que tiene de uno a seis grupos metileno en una cadena lineal y en el que uno o más grupos metileno pueden tener uno o más sustituyentes alquilo (C_{1-6}), alcoxi (C_{1-6}) o alquilidenilo (C_{1-6});
- 15 R^2 está seleccionado de entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C_{1-6}) (opcionalmente sustituido por halo, hidroxilo, amino, mono a perfluoro alquilo (C_{1-3}), carboxi, o alcoxicarbonilo (C_{1-6})), cicloalquilo (C_{3-7}), alcoxi (C_{1-6}), amino, mono- o dialquilamino (C_{1-6}), acilamino, carboxi, alcoxicarbonilo (C_{1-6}), carboxi alcoxi (C_{1-6}), alquiltio (C_{1-6}), alquilsulfínilo (C_{1-6}), alquilsulfonilo (C_{1-6}), sulfamoílo, mono- y dialquilsulfamoílo (C_{1-6}), carbamoílo, mono- y dialquilcarbamoílo (C_{1-6}), y heterociclilo;
- cuando Z_1 es S, Z_2 y Z_3 son CH; cuando Z_2 es S, Z_1 y Z_3 son CH; cuando Z_3 es S, Z_1 y Z_2 son CH;
- X es NH, S, SO, SO_2 , O o CH_2 ;
- 20 n es uno, dos o tres; y
- m es 0 o un número entero de 1 a 4.

2. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene una fórmula (II):

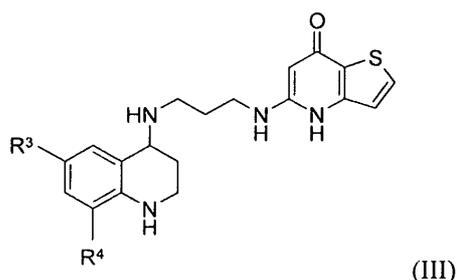


(II)

en la que:

- 25 R^3 y R^4 pueden ser el mismo sustituyente o uno diferente y están seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C_{1-6}) (opcionalmente sustituido por halo, hidroxilo, amino, mono a perfluoro alquilo (C_{1-3}), carboxi, o alcoxicarbonilo (C_{1-6})), cicloalquilo (C_{3-7}), alcoxi (C_{1-6}), amino, mono- o dialquilamino (C_{1-6}), acilamino, carboxi, alcoxicarbonilo (C_{1-6}), carboxi alquiloxi (C_{1-6}), alquiltio (C_{1-6}), alquilsulfínilo (C_{1-6}), alquilsulfonilo (C_{1-6}), sulfamoílo, mono- y dialquilsulfamoílo (C_{1-6}), carbamoílo, mono- y dialquilcarbamoílo (C_{1-6}), y heterociclilo.
- 30

3. Un compuesto según la reivindicación 1 que tiene una fórmula (III):



en la que:

- 5 R³ y R⁴ pueden ser el mismo sustituyente o uno diferente y están seleccionados de entre halo, ciano, hidroxilo, alquilo (C₁₋₆) (opcionalmente sustituido por halo, hidroxilo, amino, mono a perfluoro alquilo (C₁₋₃), carboxi, o alcóxicarbonilo (C₁₋₆)), cicloalquilo (C₃₋₇), alcoxi (C₁₋₆), amino, mono- o dialquilamino (C₁₋₆), acilamino, carboxi, alcóxicarbonilo (C₁₋₆), carboxi alquilo (C₁₋₆), alquiltio (C₁₋₆), alquilsulfinilo (C₁₋₆), alquilsulfonilo (C₁₋₆), sulfamoilo, mono- y dialquilsulfamoilo (C₁₋₆), carbamoilo, mono- y dialquilcarbamoilo (C₁₋₆), y heterociclilo.
4. Una sal del compuesto según la reivindicación 1.
- 10 5. La sal según la reivindicación 4 en la que la sal es una sal farmacéuticamente aceptable.
6. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, seleccionado de entre:
- 15 5-[3-(6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;
 5-[3-(6,8-dibromo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;
 5-[3-(8-bromo-6-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;
 5-[3-(6-cloro-8-yodo-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;
 5-[3-(6-bromo-8-cloro-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;
 5-[3-(6-bromo-8-cloro-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;
 5-[3-(8-bromo-6-cloro-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona;
 5-[3-(8-bromo-6-metilsulfanil-croman-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona; y
 20 5-[3-(6-bromo-8-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-quinolin-4-ilamino)-propilamino]-4H-tieno[3,2-b]piridin-7-ona .
7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad antibacteriana eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Un compuesto de fórmula (I) según se define en la reivindicación 1 para su uso para el tratamiento de infecciones bacterianas.
- 25 9. Uso de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de infecciones bacterianas.