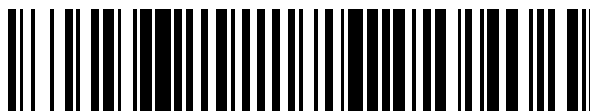


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 055**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 47/14 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2008 E 08797186 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2185143**

54 Título: **Formulación parenteral antimicrobiana**

30 Prioridad:

09.08.2007 US 836241

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

26.04.2013

73 Titular/es:

**TAIGEN BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
7F 138 SHIN MING ROAD NEIHU DISTRICT
TAIPEI 114, TW**

72 Inventor/es:

**LEE, LIH-HUEI;
WU, PO-YI;
SUN, ERKUAN y
KING, CHI-HSIN RICHARD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 402 055 T3

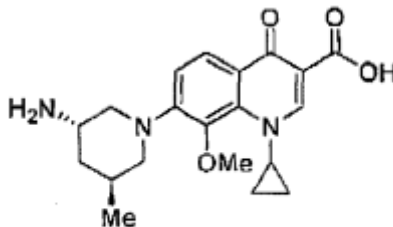
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Formulación parenteral antimicrobiana.

La inyección parenteral de un fármaco antimicrobiano es una de las formas más eficaces de tratar infecciones, en especial aquellas con *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Streptococcus pneumoniae* multi-resistente.

En un aspecto, la presente invención presenta una formulación parenteral antimicrobiana (por ejemplo, formulación intravenosa), que contiene un compuesto de fórmula I que se muestra a continuación:



fórmula 1,

en su forma de sal de D,L-malato, agua y un agente isotónico a una concentración de un 0,2 % a un 13 % en p/v. El compuesto y el agente isotónico se disuelven en el agua para formar una formulación parenteral.

El compuesto incluye sus sales. Las sales, por ejemplo, se pueden formar entre un grupo amino cargado positivamente en el compuesto y un anión. Un carboxilato cargado negativamente en el compuesto puede formar una sal con un catión. Los cationes adecuados incluyen, ion sodio, ion potasio, ion magnesio, ion calcio y un catión amonio tal como el ion tetrametilamonio. El compuesto de fórmula I se desvela en el documento de patente US 6329391 en forma de un agente antimicrobiano. Además del compuesto, que tiene centros asimétricos, se puede encontrar en forma de racematos, mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas.

Un agente isotónico, tal como no electrolitos y electrolitos, ajusta una relación de presión osmótica. Véase la Patente de los Estados Unidos de América N° 6.015.810. Los ejemplos incluyen glicerina, lactosa, manitol, dextrosa, cloruro sódico, sulfato sódico y sorbitol.

En la formulación de la presente invención, el compuesto puede tener una concentración de 0,2 a 45 mM y el agente isotónico puede tener una concentración de un 0,2 % a un 13 % en p/v, en particular, de un 0,2 % a un 1,3 % en p/v.

La concentración del agente isotónico ("% en p/v") se calcula como la relación entre el peso (g) del agente isotónico y el volumen (litro) de la formulación.

La formulación de la presente invención puede contener adicionalmente un tampón, un agente estabilizante o un antioxidante.

Un ejemplo para la formulación de la presente invención es uno que contiene la sal de malato del compuesto a la concentración de 0,2 a 45 mM, cloruro sódico a la concentración de un 0,9 % en p/v, un agente estabilizante a una concentración de un 0,1-1,0 % en p/v y un tampón a una concentración de un 0,01-5 % en p/v. Como otro ejemplo, la formulación contiene la sal de malato del compuesto de 0,2 a 45 mM, dextrosa a la concentración de un 1-7 % en p/v, un agente estabilizante a una concentración de un 0,1-1,0 % en p/v y un tampón a una concentración de un 0,01-5 % en p/v.

Al igual que las del agente isotónico, las concentraciones del agente estabilizante, el tampón y el antioxidante también se calculan como la relación entre el peso del reactivo y el volumen de la formulación.

En otro aspecto, la presente invención presenta una formulación para tratar una enfermedad infecciosa por administración mediante inyección parenteral a un sujeto de una cantidad eficaz de la formulación que se ha descrito anteriormente. La enfermedad infecciosa se puede producir por infección con bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, bacterias anaeróbicas, *S. aureus* resistente a la meticilina o *S. pneumoniae* multi-resistente. Los ejemplos de la enfermedad infecciosa incluyen, infección del tracto urinario, prostatitis, infección respiratoria, osteomielitis, gonorrea, tuberculosis por mycobacterium, complejo mycobacterium avium, exacerbaciones de la bronquitis crónica, neumonías, sinusitis, diarrea infecciosa, helicobacter pilori, infección de la piel, infección ginecológica e infección abdominal.

También se encuentra dentro del alcance de la presente invención el uso de la formulación que se ha descrito anteriormente mediante inyección parenteral para tratar una enfermedad infecciosa.

Descripción detallada de la invención

El compuesto de fórmula I usado para ensayar la presente invención se puede sintetizar mediante procedimientos convencionales. Véase el Ejemplo 1 a continuación.

5 El compuesto sintetizado de este modo se puede purificar adicionalmente por cromatografía en columna ultrarrápida, cromatografía líquida de alto rendimiento, cristalización o cualquier otro procedimiento adecuado.

10 Para preparar la formulación parenteral de la presente invención, se puede mezclar simplemente el compuesto de fórmula I, un agente isotónico y agua con la relación deseada en cualquier secuencia. Por ejemplo, se puede mezclar una cantidad predeterminada del compuesto con solución salina (una solución acuosa que contiene cloruro sódico, un agente isotónico) a una concentración predeterminada. La mezcla se puede conseguir sacudiendo, agitando o en vórtice y se controla para reconstituir el ingrediente o los ingredientes sólidos en agua sin producir una espumación intensa. En cualquier etapa de la preparación, se puede aplicar esterilización, por ejemplo, en un autoclave.

15 La formulación de la presente invención puede contener adicionalmente uno o más aditivos, tales como un tampón, un agente estabilizante y un antioxidante. Los ejemplos de un tampón incluyen, acetato, citrato, tartrato, lactato, succinato, malato y fosfato. Los ejemplos del agente estabilizante incluyen, histidina, lisina, glicina, sacarosa, fructosa, trehalosa y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de un antioxidante incluyen bisulfito sódico, hidroxí anisol butilado, cisteína, ácido gálico, glutamato monosódico, tioglicolato sódico y ácido ascórbico.

20 Los aditivos se pueden incluir en la formulación en cualquier etapa de su preparación. La concentración adecuada de un aditivo en la formulación para transmitir el efecto pretendido, como lo reconoce alguien experto en la materia, se puede ensayar usando procedimientos convencionales.

25 La formulación de la presente invención se puede usar de forma inmediata después de la preparación o se puede almacenar para su uso posterior. Para su uso inmediato, se puede proporcionar un kit que tiene un vial que contiene el compuesto de fórmula I y otro vial que contiene un agente isotónico o una solución acuosa que contiene un agente isotónico. Como alternativa, se puede proporcionar un kit que tiene un vial que contiene el compuesto de fórmula I y otro vial que contiene una solución acuosa de un agente isotónico (por ejemplo, solución salina). El kit también puede contener uno o más aditivos, tales como un agente estabilizante, un tampón o un antioxidante. Poco antes de la administración, se pueden mezclar las sustancias proporcionadas en el kit para preparar la formulación.

30 Se puede usar la formulación de la presente invención para tratar una enfermedad infecciosa mediante la administración por inyección por vía parenteral o por infusión a un sujeto que necesita el tratamiento de una cantidad eficaz de la formulación.

35 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se define como la administración de una cantidad eficaz de la formulación a un sujeto, que tiene una enfermedad infecciosa, un síntoma de la infección, una enfermedad o un trastorno secundario a la infección o una predisposición hacia la infección, con el fin de curar, ayudar, aliviar, remediar o mejorar la enfermedad infecciosa, el síntoma de la infección, la enfermedad o el trastorno secundario a la infección o la predisposición hacia la infección.

El término "una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de la formulación que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado.

40 El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. Entre ellas, es preferente la inyección intravenosa o la infusión.

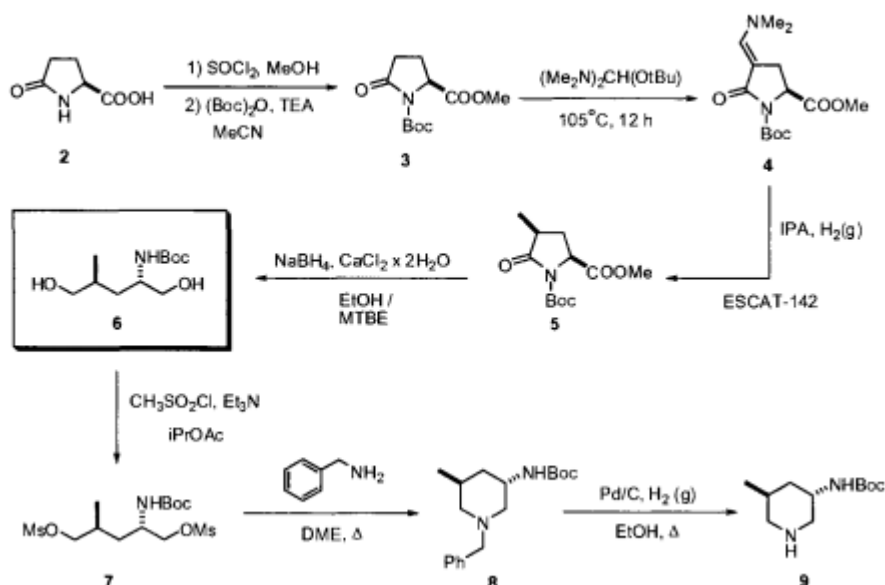
Sin elaboración adicional, se cree que la descripción anterior ha permitido de forma adecuada la presente invención. Los siguientes ejemplos, por lo tanto, se deben interpretar como meramente ilustrativos.

Ejemplo 1

45 La sal de malato del ácido (3S,5S)-7-[3-amino-5-metil-piperidinil]-1-ciclopropil-1,4-dihidro-8-metoxi-4-oxo-3-quinolinacarboxílico (Compuesto 1) se sintetizó como sigue a continuación:

(A) Síntesis del éster de *terc*-butilo del ácido (3S,5S)-(5-Metil-piperidin-3-il)-carbámico (Compuesto 9):

Esquema 1



Un reactor de 50 l se cargó con el Compuesto 2 (5,50 kg, 42,60 moles), metanol (27 l) y se enfrió a $10\text{--}15^\circ\text{C}$. Se añadió cloruro de tionilo (10,11 kg, 2,0 equiv.) mediante un embudo de adición durante un periodo de 65 min, con enfriamiento externo para mantener la temperatura por debajo de 30°C . La solución resultante se agitó a 25°C durante 1,0 hora, después de lo que se retiró el metanol a presión reducida. El residuo oleoso se destiló azeotrópicamente con acetato de etilo ($3 \times 2,5$ l) para retirar el metanol residual, se disolvió en acetato de etilo (27,4 l), se cargó en un reactor de 50 l y se neutralizó por adición lenta de trietilamina (3,6 kg) por debajo de 30°C . La suspensión resultante se filtró para retirar el hidrocloreto de trietilamina.

El filtrado se cargó a un reactor de 50 l, junto con DMAP (0,53 kg). Se añadió dicarbonato de di-*terc*-butilo (8,43 kg) mediante un embudo de adición calentado con agua caliente, durante un periodo de 30 min a una temperatura de $20\text{--}30^\circ\text{C}$. La reacción se completó después de 1 hora tal como se determinó por análisis de TLC. La fase orgánica se lavó con HCl 1 N enfriado con hielo ($2 \times 7,5$ l), solución saturada de bicarbonato sódico ($1 \times 7,5$ l), se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró. Después de retirar el acetato de etilo a presión reducida, se obtuvo una suspensión cristalina, se trituroó con MTBE (10,0 l), y se filtró para dar el Compuesto 3 en forma de un sólido de color blanco (5,45 kg, 52,4 %).

Anal. Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_5$: C, 54,3; H, 7,04; N, 5,76. Encontrado: C, 54,5; H, 6,96; N, 5,80. HRMS (ESI^+) Esperado para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_5$, $[\text{M}+\text{H}]$ 244,1185. Encontrado 244,1174; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 4,54 (dd, J = 3,1, 9,5 Hz, 1H), 3,7 (s, 3H), 2,58-2,50 (m, 1H), 2,41 (ddd, 1H, J = 17,6, 9,5, 3,7), 2,30-2,23 (m, 1H), 1,98-1,93 (m, 1H), 1,40 (s, 9H); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,70 MHz) δ 173,3, 171,9, 149,2, 83,5, 58,8, 52,5, 31,1, 27,9, 21,5; Pf $70,2^\circ\text{C}$.

Un reactor de 50 l se cargó con el Compuesto 3 (7,25 kg, 28,8 moles), DME (6,31 kg), y Reactivo de Brederick (7,7 kg, 44,2 moles). La solución se agitó y se calentó a $75^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ durante tres horas. La reacción se enfrió a 0°C durante más de una hora, tiempo durante el cual se formó un precipitado. La mezcla se mantuvo a 0°C durante una hora, se filtró y se secó en un horno de vacío durante al menos 30 horas a $30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ para dar el compuesto 4 en forma de un sólido cristalino de color blanco (6,93 kg, 77,9 %).

Anal. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 56,4; H, 7,43; N, 9,39. Encontrado C, 56,4; H, 7,32; N, 9,48; HRMS (ESI^+) Esperado para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$, $[\text{M}+\text{H}]$ 299,1607. Encontrado 299,1613; RMN ^1H (CDCl_3 , 499,8 MHz) δ = 7,11 (s, 1H), 4,54 (dd, 1H, J = 10,8, 3,6), 3,74 (s, 3H), 3,28-3,19 (m, 1H), 3,00 (s, 6H), 2,97-2,85 (m, 1H), 1,48 (s, 9H); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125,7 MHz) δ = 172,6, 169,5, 150,5, 146,5, 90,8, 82,2, 56,0, 52,3, 42,0, 28,1, 26,3, PF $127,9^\circ\text{C}$.

Un reactor Pfaudler de 37,9 litros se cargó con ESCAT 142 (Engelhard Corp. N.J, Estados Unidos de América), paladio en polvo al 5 % sobre carbono (húmedo al 50 %, 0,58 kg en peso en húmedo), Compuesto 4 (1,89 kg, 6,33 moles) e isopropanol (22,4 Kg). Después de agitación en atmósfera de hidrógeno a 310,3 kPa a 45°C durante 18 h, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho de Celite (0,51 kg). El filtrado se evaporó a presión reducida para dar un aceite espeso, que se solidificó después de un periodo de reposo para dar el Compuesto 5 (1,69 kg, 100 %) en forma de una mezcla diastereomérica a 93:7.

Una muestra de la mezcla del producto se purificó por HPLC preparativa para dar material para los datos analíticos. Anal. Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_5$: C, 56,0; H, 7,44; N, 5,44. Encontrado C, 55,8; H, 7,31; N, 5,44; MS (ESI^+)

Esperado para $C_{12}H_{19}NO_5$, [M+H] 258,1342. Encontrado 258,1321; RMN 1H ($CDCl_3$, 499,8 MHz) δ = 4,44 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 2,60-2,48 (m, 2H), 1,59-1,54 (m, 1H), 1,43 (s, 9H), 1,20 (d, J = 6,8 Hz, 3H); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125,7 MHz) δ = 175,7, 172,1, 149,5, 83,6, 57,4, 52,5, 37,5, 29,8, 27,9, 16,2. Pf 89,9 °C.

Un reactor de 50 l se cargó con el Compuesto 5 (3,02 kg, 11,7 moles), etanol absoluto (8,22 kg) y MTBE (14,81 kg). Se añadió borohidruro sódico (1,36 kg, 35,9 moles) en porciones pequeñas a 0 °C $\pm$ 5 °C. Se observó una pequeña cantidad de efervescencia. La mezcla de reacción se calentó a 10 °C $\pm$ 5 °C y se añadió dihidrato de cloruro de calcio (2,65 kg) en porciones a 10 °C $\pm$ 5 °C durante más de una hora. La reacción se dejó calentar a 20 °C $\pm$ 5 °C durante más de una hora y se agitó durante un periodo adicional de 12 horas a 20 °C $\pm$ 5 °C. Después de enfriar la reacción a -5 °C $\pm$ 5 °C, se añadió lentamente HCl 2 N (26,9 kg) enfriando con hielo a 0 °C $\pm$ 5 °C. Se detuvo la agitación. La fase acuosa inferior se retiró. El reactor se cargó con bicarbonato sódico acuoso saturado (15,6 kg) durante más de cinco minutos en agitación. La agitación se detuvo de nuevo y se retiró la fase acuosa inferior. El reactor se cargó con sulfato de magnesio (2,5 kg) y se agitó durante al menos 10 minutos. La mezcla se filtró a través de un filtro de tipo nutsch y se concentró a presión reducida para dar el Compuesto 6 (1,80 kg, 66 %).

Anal. Calculado para $C_{11}H_{23}NO_4$: C, 56,6 H, 9,94; N, 6,00. Encontrado C, 56,0; H, 9,68; N, 5,96; HRMS (ESI⁺) Esperado para $C_{11}H_{24}NO_4$, [M+H] 234,1705. Encontrado 234,1703; RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) δ = 6,34 (d, J = 8,9 Hz, 1H, NH), 4,51 (t, J = 5,8, 5,3 Hz, 1H, NHCHCH₂OH), 4,34 (t, J = 5,3, 5,3 Hz, 1H, CH₃CHCH₂OH), 3,46-3,45, (m, 1H, NHCH), 3,28 (dd, J = 10,6, 5,3 Hz, NHCHCH₂OH), 3,21 (dd, J = 10,2, 5,8 Hz, 1H, CH₃CHCH₂OH), 3,16 (dd, J = 10,2, 6,2 Hz, 1H, NHCH-CH₂OH), 3,12 (dd, J = 10,6, 7,1 Hz, 1H, CH₃CHCH₂OH), 1,53-1,50 (m, 1H, CH₃CHCH₂OH), 1,35 (s, 9H, O(CH₃)₃), 1,30 (ddd, J = 13,9, 10,2, 3,7 Hz, 1H, NHCHCHCH), 1,14 (ddd, J = 13,6, 10,2, 3,4 Hz, 1H, NHCHCHCH), 0,80 (d, J = 6,6 Hz, 3H, CH₃); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125,7 MHz) δ 156,1, 77,9, 50,8, 65,1, 67,6, 65,1, 35,6, 32,8, 29,0, 17,1. Pf 92,1 °C.

Un reactor de 50 l se cargó con una solución del Compuesto 6 (5,1 kg) en acetato de isopropilo (19,7 kg). La reacción se enfrió a 15 °C $\pm$ 5 °C y se añadió trietilamina (7,8 kg) a esa temperatura. El reactor se enfrió adicionalmente a 0 °C $\pm$ 5 °C y se añadió cloruro de metanosulfonilo (MsCl) (6,6 kg). La reacción se agitó durante unas pocas horas y se controló para la finalización por HPLC o por TLC. La reacción se inactivó con una solución acuosa saturada de bicarbonato. La fase orgánica se aisló y se lavó sucesivamente con solución de trietilamina acuosa al 10 %, solución acuosa de HCl fría, solución acuosa saturada fría de bicarbonato y finalmente solución acuosa saturada de salmuera. La fase orgánica se secó, se filtró y se concentró al vacío por debajo de 55 °C $\pm$ 5 °C para dar el compuesto 7 en forma de un sólido/suspensión líquida, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Después de su carga con 9,1 kg de bencilamina pura, un reactor de 50 l se calentó a 55 °C, temperatura a la que se añadió una solución del compuesto 7 (8,2 kg) en 1,2-dimetoxietano (14,1 kg). Después de la adición, la reacción se agitó a 60 °C $\pm$ 5 °C durante varias horas y se controló para la finalización por TLC o por HPLC. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se diluyó con 11,7 kg de una solución de acetato de etilo al 15 % (v/v)/hexanos y se trató, mientras que se agitaba, con 18,7 kg de una solución acuosa de carbonato potásico al 20 % (en peso). Se obtuvo una mezcla trifásica después de un periodo de reposo. Se recogió la fase orgánica superior. La fase media aislada se extrajo dos veces de nuevo con porciones de 11,7 kg una solución de acetato de etilo al 15 % (v/v)/hexanos. Las fases orgánicas combinadas se concentraron al vacío para dar un residuo oleoso. El residuo después se purificó por cromatografía para dar el Compuesto 8 en forma de un aceite.

Un recipiente a presión de 40 l se cargó con 0,6 kg de paladio sobre carbono sólido, húmedo al 50 % (E101, 10 % en peso) con flujo de nitrógeno. Después se añadió al reactor una solución del Compuesto 8 (3,2 kg) en 13,7 kg de etanol absoluto en atmósfera de nitrógeno. El reactor se purgó con nitrógeno y después se presurizó con hidrógeno a 310,3 kPa. La reacción después se calentó a 45 °C. Se controló por TLC o por LC. Después de la finalización, la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se ventiló y se purgó con nitrógeno. La mezcla se filtró a través de un lecho de Celite y el sólido se lavó con 2,8 kg de etanol absoluto. El filtrado se concentró al vacío para dar el Compuesto 9 en forma de un sólido de tipo cera.

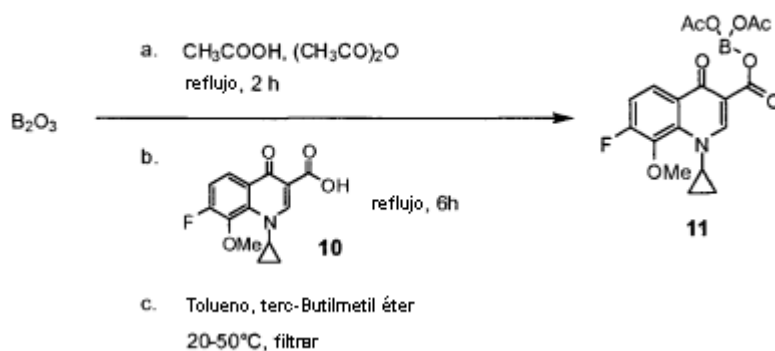
R_f por TLC (Sílice F₂₅₄, acetato de etilo a 70:30 en v/v-hexanos, tinción con $KMnO_4$) = 0,12; RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5,31 (s a, 1H), 3,80-3,68 (m, 1H), 2,92 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 2,77 (AB quart, J_{AB} = 12,0 Hz, ν = 50,2 Hz, 2H), 2,19 (t, J = 10,7 Hz, 1H), 1,82-1,68 (m, 2H), 1,54 (s a, 1H), 1,43 (s, 9H), 1,25-1,15 (m, 1H), 0,83 (d, J = 6,6 Hz, 3H); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 155,3, 78,9, 54,3, 50,8, 45,3, 37,9, 28,4, 27,1, 19,2; MS (ESI⁺) m/z 215 (M+H), 429 (2M+H).

(B) Síntesis del ácido 1-Ciclopropil-7-fluoro-8-metoxi-4-oxo-1,4-dihidro-quinolina-3-carboxílico (Compuesto 10):

El Compuesto 10 se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en la Patente de los Estados Unidos de América N° 6.329.391.

(C) Síntesis de quelato de éster de borano del ácido 1-Ciclopropil-7-fluoro-8-metoxi-4-oxo-1,4-dihidro-quinolina-3-carboxílico (Compuesto 11):

Esquema 2



Un reactor se cargó con óxido de boro (2,0 kg, 29 moles), ácido acético glacial (8,1 l, 142 moles) y anhídrido acético (16,2 l, 171 moles). La mezcla resultante se calentó a reflujo al menos 2 horas y después se enfrió a 40 °C, temperatura a la que se añadió el compuesto de ácido de 7-fluoroquinolona **10** (14,2 kg, 51 moles). La mezcla se calentó a reflujo durante al menos 6 horas y después se enfrió a aproximadamente 90 °C. Se añadió tolueno (45 l) a la reacción. A 50 °C, se añadió *tert*-butilmetil éter (19 l) para la aparición de precipitación. Después, la mezcla se enfrió a 20 °C y se filtró para aislar la precipitación. El sólido aislado se lavó después con *tert*-butilmetil éter (26 l) antes de su secado en un horno de vacío a 40 °C (6,7 kPa) para dar el Compuesto **11** con un rendimiento de un 86,4 %.

- 5
- 10 Raman (cm^{-1}): 3084,7, 3022,3, 2930,8, 1709,2, 1620,8, 1548,5, 1468,0, 1397,7, 1368,3, 1338,5, 1201,5, 955,3, 653,9, 580,7, 552,8, 384,0, 305,8. RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 9,22 (s, 1H), 8,38-8,33 (m, 1H), 7,54 (t, $J = 9,8$ Hz, 1H), 4,38-4,35 (m, 1H), 4,13 (s, 3H), 2,04 (s, 6H), 1,42-1,38 (m, 2H), 1,34-1,29 (m, 2H). TLC (Whatman MKC18F Sílice, 60 Å, 200 μm), Fase Móvil: CH_3CN a 1:1 (v/v): NaCl 0,5 N (ac.), visualización por UV (254/366 nm); $R_f = 0,4-0,5$.
- 15 (D) Síntesis de la sal de malato del ácido (3S,5S)-7-[3-amino-5-metil-piperidinil]-1-ciclopropil-1,4-dihidro-8-metoxi-4-oxo-3-quinolinacarboxílico (Compuesto 1)

RMN (D_2O 300 MHz) δ (ppm): 8,54 (s, 1H), 7,37 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,05 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 4,23-4,18 (m, 1H), 4,10-3,89 (m, 1H), 3,66 (s a, 1H), 3,58 (s, 3H), 3,45 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 3,34 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 3,16 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), 2,65 (dd, $J = 16,1$, 4,1 Hz, 1H), 2,64-2,53 (m, 1H), 2,46 (dd, $J = 16,1$, 8,0 Hz, 1H), 2,06 (s a, 1H), 1,87 (d, $J = 14,4$ Hz, 1H), 1,58-1,45 (m, 1H), 1,15-0,95 (m, 2H), 0,91 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H), 0,85-0,78 (m, 2H).

- 5 El Compuesto 1 se disolvió en acetonitrilo/agua/ácido fórmico (12:88:0,2). La solución resultante se analizó por gradiente en HPLC de fase inversa con detección de UV a 292 nm. La separación se consiguió usando un gradiente de elución (véase la tabla) con una fase móvil que contenía acetonitrilo, agua y ácido fórmico en una columna C8 (Waters Symmetry Shield RP 8, 5 μm , 4,6 x 150 mm) a un caudal de 1,5 ml/min y a 30 °C. Las composiciones de la fase móvil con el tiempo se muestran en la tabla que sigue a continuación:

10

Tiempo (min)	Solución de Fase Móvil	Solución de Fase Móvil
	A (ácido fórmico al 0,2 % en agua) (%)	B (0,2 % ácido fórmico al 0,2 % en acetonitrilo) (%)
0	88	12
9,0	88	12
22,0	30	70
22,5	30	70
22,6	88	12
30,0	88	12

Ejemplo 2

Se prepararon y se estudiaron formulaciones de dextrosa y de cloruro sódico:

1. Formulación en una solución de dextrosa al 5 %

- 15 El Compuesto 1 se disolvió en una solución estéril acuosa de dextrosa al 5 % (5 mg/ml). La solución se filtró y transfirió a botellas de polipropileno de 100 ml. Las botellas se taparon, se sellaron, se esterilizaron a 110 °C durante 35 min y se almacenaron en un horno a 60 °C. La solución de las botellas se analizó los días 0, 5 y 10. Los resultados, que se muestran a continuación, indican que, para la solución de dextrosa al 5 % del compuesto 1, el contenido activo disminuyó, el valor del pH aumentó, el color de la solución cambió y se formó un precipitado de color marrón.

20

Días a 60 °C	0 días		5 días	10 días
	Antes de la Esterilización	Después de la Esterilización		
pH	3,89	3,88	4,03	4,08
Apariencia	Solución de color amarillo transparente	Solución de color amarillo transparente	Solución de color amarillo oscuro	Precipitado de color marrón
Contenido comparativo del Compuesto 1 (%)	100,4	97,8	96,0	94,2

2. Formulación en una solución salina al 0,9 %

- 25 El Compuesto 1 se disolvió en solución salina al 0,9 % (5 mg/ml). La solución se filtró y se transfirió a botellas de polipropileno de 100 ml. Las botellas se taparon, se sellaron, se esterilizaron a 110 °C durante 35 min y se almacenaron en un horno a 60 °C. La solución de las botellas se analizó los días 0, 5 y 10. Los resultados, que se muestran a continuación, indican que la formulación fue más estable de forma inesperada. Más específicamente, el aspecto y el valor del pH permanecieron igual a 60 °C durante 10 días. El contenido del compuesto 1 aumentó ligeramente con el tiempo debido a la evaporación de agua a través de las paredes de plástico de las botellas. La impureza total sólo aumentó ligeramente después de 10 días.

Tiempo a 60 °C	0 días	5 días	10 días
Valor de pH	3,90	3,88	3,88
Aspecto	Solución de color amarillo transparente	Solución de color amarillo transparente	Solución de color amarillo transparente
Contenido comparativo del Compuesto 1 (%)	102,6	103,2	104,0
Impureza Total (%)	0,378	0,375	0,410

Las soluciones del Compuesto **1** en solución salina al 0,9 % se prepararon a las concentraciones 0,1, 1, 3, 4, 5, 6, 10 y 15 mg/ml. Estas soluciones se filtraron y se cargaron en botellas de polipropileno de 100 ml. Las botellas se taparon, se sellaron y se esterilizaron a 110 °C durante 35 min. Las botellas con las concentraciones de 1, 3, 5, 10 mg/ml se usaron para un estudio de toxicología de GLP en ratas y en perros.

Ejemplo 3

Se estudiaron los efectos del carbón vegetal, valores del pH y contenidos de hierro en la formulación:

1. Efecto del carbón vegetal

Se disolvieron 13,85 g del Compuesto **1** y 18 g de NaCl en agua estéril. El volumen final de la solución se llevó hasta 2000 ml por adición de agua estéril adicional con agitación para obtener una solución que contenía 5 mg/ml del Compuesto **1**. La solución se dividió en cuatro porciones de 500 ml. A cada una de las cuatro porciones se añadieron un 0 %, un 0,02 %, un 0,05 % y un 0,5 % (g/ml) de carbón vegetal activado. Las mezclas resultantes se llevaron a ebullición con agitación durante 25 min y se filtraron a través de un filtro de papel de 0,45 micrómetros. El filtrado se añadió a una serie de botellas de polipropileno de 100 ml, que se taparon, se sellaron y se esterilizaron a 110 °C durante 35 min. Se analizó el contenido del Compuesto **1** y el pH para cada una de las cuatro botellas y se mostró a continuación. Se escogió para el procedimiento de la formulación un 0,05 % (g/ml) de carbón vegetal activado.

Entrada	Valor del pH	Contenido comparativo del Compuesto 1 (%)	Carbón vegetal activado añadido
1	3,96	109,0	0
2	3,88	108,8	0,02 %
3	3,88	109,2	0,05 %
4	3,80	63,9	0,5 %

2. Efecto del pH

Se prepararon 2000 ml de solución del Compuesto **1** en solución salina al 0,9 % de la misma forma como se ha descrito anteriormente. La solución se dividió de la misma manera en 6 porciones. Los valores de pH para las 6 porciones se ajustaron a 2,43, 3,00, 3,76, 4,51, 6,01 y 7,13 por adición de ácido clorhídrico o de hidróxido sódico diluidos. Se analizaron el aspecto y el contenido de las soluciones y se mostraron a continuación. Los resultados muestran que el Compuesto **1** a 5 mg/ml en una solución salina precipitó a pH 6,6.

Entrada	Contenido comparativo del Compuesto 1 (%)	Valor del pH	Aspecto
1	96,68	2,17	Solución de color amarillo transparente
2	94,87	3,00	Solución de color amarillo transparente
3	103,62	3,76 (sin ácido/base añadidos)	Solución de color amarillo transparente

(continuación)

Entrada	Contenido comparativo del Compuesto 1 (%)	Valor del pH	Aspecto
4	101,14	4,50	Solución de color amarillo transparente
5	99,63	6,01	Solución de color amarillo transparente
6	N/D	6,60	Precipitado de color blanco

3. Efecto del Contenido de Hierro

- 5 Se prepararon 1000 ml de solución del Compuesto 1 en solución salina al 0,9 % de la misma forma como se ha descrito anteriormente. La solución se dividió de la misma manera en 2 porciones. A una porción se añadieron 0,25 g de carbón vegetal activado y a la otra se añadieron 0,25 g de carbón vegetal activado y 0,1 g de polvo de hierro. Cada una de las mezclas resultantes se agitó y se filtró a una botella de polipropileno de 100 ml. Las botellas cargadas se taparon, se sellaron y se esterilizaron a 110 °C durante 35 min. El pH y el aspecto de cada una de las soluciones se muestran a continuación. En base a los resultados, el procedimiento para una formulación parenteral debería evitar el contacto con el hierro.

Entrada	Aditivo	pH	Aspecto
1	Polvo de hierro	3,77	Marrón Rojizo
2	Sin polvo de hierro	3,78	Amarillo claro

10 4. Efecto de la Temperatura y Tiempo durante la Esterilización

- 15 Se preparó una solución de 3000 ml de solución del Compuesto 1 en solución salina al 0,9 % de la misma forma como se ha descrito anteriormente. A la solución se añadieron 1,5 g de carbón vegetal activado (0,05 % g/ml). La mezcla se agitó durante 15 min y se filtró. El filtrado se añadió a una serie de botellas de polipropileno de 100 ml. Las botellas cargadas se taparon, se sellaron y se dividieron en cuatro grupos (7 botellas/grupo). La esterilización de las muestras se llevó a cabo a 115 °C/35 min, 110 °C/35 min, 105 °C/35 min. Los contenidos y los niveles de impurezas del Compuesto 1 así como el pH de cada grupo (incluyendo un grupo de control) se midieron y se muestran a continuación. En base al estudio, la esterilización de la formulación parenteral se escoge a 110 °C durante 35 min.

Entrada (Grupo)	Temperatura Estéril	Valor del pH	Contenido (%)	Impureza Total (%)
1	115 °C	3,85	95,98	0,509
2	110 °C	3,86	95,86	0,240
3	105 °C	3,86	96,44	0,198
4	N/D	3,86	95,20	0,167

20 5. Efecto de la Temperatura Más Baja (-15 °C)

Se almacenaron botellas que contenían 5 mg/ml del Compuesto 1 en solución salina 0,9 % en un congelador a -15 °C. Las muestras se analizaron los días 0, 5 y 10. Los resultados, que se muestran a continuación, indican que el aspecto, el contenido del compuesto, el pH y la impureza total se mantuvieron igual a -15 °C durante 10 días.

Tiempo a - 15 °C	0 día	5 días	10 días
Aspecto	Solución de color amarillo transparente	Solución de color amarillo transparente	Solución de color amarillo transparente
Contenido	102,6	102,8	103,5
Valor del pH	3,90	3,89	3,89
Impureza Total (%)	0,378	0,370	0,373

6. Efecto de la Luz en la Formulación

Se colocaron botellas que contenían una solución del Compuesto 1 (5 mg/ml en base a la base libre) en solución salina al 0,9 % en una caja de luz a 4500 Lx +/- 500 Lx. Las muestras se analizaron los días 0, 5 y 10. Los resultados, que se muestran a continuación, indican que no hubo cambios con la luz intensa.

Tiempo con Luz Intensa	0 día	5 días	10 días
Aspecto	Solución de color amarillo transparente	Solución de color amarillo transparente	Solución de color amarillo transparente
Absorción de UV	De acuerdo con el Patrón	De acuerdo con el Patrón	De acuerdo con el Patrón
Materia Particulada	De acuerdo con el Patrón	De acuerdo con el Patrón	De acuerdo con el Patrón
Valor del pH	3,90	3,89	3,89

Ejemplo 4

Se preparó una solución del Compuesto 1 (5 mg/ml en base a la base libre) en solución salina al 0,9 %, se filtró y se transfirió a botellas de polipropileno de 100 ml. Las botellas se taparon, se sellaron, se esterizaron a 110 °C durante 35 min y se almacenaron a 40 °C y con una humedad relativa de un 20 % (HR) durante 6 meses y a 25 °C y con una HR de un 60 % durante 12 meses y se ensayó como se muestra en la tabla que sigue a continuación.

	Intervalos (Meses)						
Condición	0	1	2	3	6	9	12
25 °C/un 60 % de HR	X	X	X	X	X		
40 °C/un 20 % de HR	X			X	X	X	X

En cada punto de muestreo (marcado como "X" en la tabla anterior), las muestras se evaluaron por su aspecto, color, transparencia, pH, absorción de UV, ensayo e impureza. No se observaron cambios significativos.

Ejemplo 5

Se estudiaron las actividades del Compuesto 1 in vitro e in vivo como sigue a continuación:

1. Actividad antibacteriana in vitro

Varias especies bacterianas, tales como las bacterias Gram positivas (por ejemplo, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*), bacterias Gram negativas (por ejemplo, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Proteus* y

Bacteriodes), patógenos anaeróbicos y atípicos se aislaron a partir de muestras clínicas. Se determinó la actividad antibacteriana del compuesto de Fórmula I frente a estas especies bacterianas usando ensayos de dilución en agar que se describen en el Comité Nacional de los Estados Unidos de América para Laboratorio Clínico, M7-A6, 2003 y M11-A5, 2001.

- 5 Los resultados muestran que el Compuesto 1, tenía actividad antibacteriana potente, de amplio espectro, que incluía actividad frente a patógenos Gram positivos, Gram negativos, anaeróbicos y atípicos. La sal fue especialmente activa frente a staphylococci y streptococci, incluyendo a *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *S. pneumoniae* multi-resistente. Frente a *S. aureus* sensible a la ciprofloxacina y susceptible a meticilina (MSSA) y MRSA, la concentración inhibitoria mínima para un 90 % (MIC₉₀) de los aislados ensayados fue 0,06 µg/ml. La MIC₉₀ fue 0,5 µg/ml frente a MSSA resistente a la ciprofloxacina y 1 µg/ml frente a MRSA resistente a la ciprofloxacina. Frente a *S. pneumoniae* susceptible, resistente a la penicilina y resistente a macrólidos, la MIC₉₀ fue 0,12 µg /ml. En este estudio, los valores de la MIC frente a todos los staphylococci y streptococci fue ≤ 2 µg/ml y ≤ 1 µg/ml, respectivamente. Considerando todos los organismos Gram positivos, el Compuesto 1 fue de 4 a 8 veces más potente que la levofloxacina y de 2 a 4 veces más potente que la gatifloxacina.
- 10
- 15 Entre todos los organismos Gram negativos, el Compuesto 1 fue activo frente a *Moraxella catarrhalis* (MIC₉₀ = 0,03 µg/ml), *Haemophilus influenzae* (MIC₉₀ = 0,12 µg/ml), y *Neisseria gonorrhoeae* (MIC₉₀ = 0,06 µg/ml). El compuesto fue activo frente a la mayoría de los organismos entéricos, con MIC₉₀ = 0,12 µg/ml para *E. coli*, MIC₉₀ = 1 µg/ml para *Klebsiella pneumoniae* y MIC₉₀ = 0,5 µg/ml para *Proteus mirabilis*. También fue activo frente a muchos aislados de *Pseudomonas aeruginosa* así como frente a patógenos anaeróbicos y a las especies *Clostridium difficile* y *Bacteroides*.
- 20

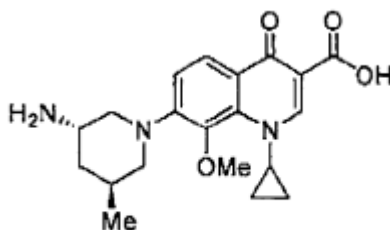
2. Eficacia In Vivo

- La eficacia antibacteriana in vivo del Compuesto 1 se evaluó en un modelo de ratón. Los ratones se anestesiaron y se infectaron por vía intranasal con una cantidad letal de *S. pneumoniae* Stp 6301. A las doce, dieciocho y veinticuatro horas después de la infección, se administró de forma subcutánea una composición que contenía el Compuesto 1 o moxifloxacina (como un control positivo), ácido láctico al 0,7 % y dextrosa al 3 % a los ratones a una dosis total de 50, 25, 12,5 o 6,25 mg/kg. Se sacrificaron la mitad de los ratones tratados cuatro horas después del último tratamiento con el Compuesto 1 o con moxifloxacina y se recogieron su sangre y sus tejidos pulmonares. Después se determinaron el número de bacterias viables en la sangre y en los tejidos pulmonares. Los tejidos pulmonares también se sometieron a una evaluación histopatológica. La otra mitad de los ratones se controlaron durante 6 días y se registró el número de ratones supervivientes.
- 25
- 30

- Los resultados muestran que el Compuesto 1 redujo de forma significativa las bacterias viables en el pulmón y en la sangre a todos los niveles de dosificación ensayados, en comparación con los controles tratados con el vehículo. Además, el antibiótico proporcionó protección completa para la infección letal (supervivencia de un 100 %) a todos los niveles de dosificación ensayados. A los mismos niveles de dosificación, el Compuesto 1 fue más eficaz que la moxifloxacina en este modelo de infección pulmonar.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n parenteral antimicrobiana para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa, que contiene:
el compuesto de f3rmula 1:



F3rmula I

- 5 agua, y
un agente isot3nico a una concentraci3n de un 0,2 % a un 13 % en p/v, en la que el compuesto est3 en su forma de sal de D.L-malato y tanto el compuesto como el agente isot3nico est3n disueltos en el agua.
2. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que la enfermedad infecciosa es infecci3n del tracto urinario, prostatitis, infecci3n respiratoria, osteomielitis, gonorrea, tuberculosis por mycobacterium, complejo mycobacterium avium, exacerbaciones de la bronquitis cr3nica, neum3nias, sinusitis, diarrea infecciosa, helicobacter pilori, infecci3n de la piel, infecci3n ginecol3gica o infecci3n abdominal.
3. La formulaci3n de la reivindicaci3n I, en la que la enfermedad infecciosa es infecci3n con bacterias Gram negativas o Gram positivas o con bacterias anaer3bicas o con *S. aureus* resistente a la meticilina o con *S. pneumoniae* multi-resistente.
- 15 4. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que el agente isot3nico es cloruro s3dico.
5. La formulaci3n de la reivindicaci3n 4, en la que la concentraci3n de cloruro s3dico en la formulaci3n es de un 0,2 a un 1,3 % en p/v y la concentraci3n del compuesto en la formulaci3n es de 0,2 a 45 mM.
6. La formulaci3n de la reivindicaci3n 5, en la que la formulaci3n se administra mediante inyecci3n intravenosa o infusi3n.
- 20 7. La formulaci3n de la reivindicaci3n 6, en la que la concentraci3n de cloruro s3dico en la formulaci3n es de un 0,9 % en p/v.
8. La formulaci3n de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulaci3n comprende adicionalmente un agente estabilizante, siendo el agente estabilizante seleccionado entre el grupo que consiste en histidina, lisina, glicina, sacarosa, fructosa, trehalosa y una mezcla de las mismas.
- 25 9. La formulaci3n de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulaci3n comprende adicionalmente un tamp3n, siendo el tamp3n seleccionado entre el grupo que consiste en acetato, citrato, tartrato, lactato, succinato, malato o fosfato.
10. La formulaci3n de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulaci3n comprende adicionalmente un antioxidante, siendo el antioxidante seleccionado entre el grupo que consiste en bisulfito s3dico, hidroxil anisil butilado, ciste3na, 3cido gent3sico, glutamato monos3dico, tioglicolato s3dico y 3cido asc3rbico.
- 30 11. La formulaci3n de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el agente isot3nico se selecciona entre el grupo que consiste en glicerina, lactosa, manitol, dextrosa, sulfato s3dico y sorbitol.
12. La formulaci3n de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el agente isot3nico es dextrosa y su concentraci3n en la formulaci3n es de un 1-7 % en p/v.
- 35 13. La formulaci3n de la reivindicaci3n 12, en la que la formulaci3n comprende adicionalmente un agente estabilizante a una concentraci3n de un 0,1-1,0 % en p/v y un tamp3n a una concentraci3n de un 0,01-5 % en p/v.
14. La formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que el agente isot3nico es cloruro s3dico y su concentraci3n en la formulaci3n es de un 0,2-1,3 % en p/v.