

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 946**

51 Int. Cl.:

C07D 417/12 (2006.01)

C07D 417/10 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

C07D 277/54 (2006.01)

C07D 277/58 (2006.01)

C07D 333/42 (2006.01)

C07D 409/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2010 E 10753952 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2408770**

54 Título: **Benzotiofeno-nitrotiazolida y otros antimicrobianos de amplio espectro**

30 Prioridad:

20.03.2009 US 161796 P

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

13.02.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION
(100.0%)
250 West Main Street, Suite 300
Charlottesville, VA 22902, US**

72 Inventor/es:

**HOFFMAN, PAUL S.;
GUERRANT, RICHARD L.;
MACDONALD, TIMOTHY L. y
BALLARD, JR., THOMAS ERIC**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 528 946 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

Benzotiofeno-nitrotiazolida y otros antimicrobianos de amplio espectro

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud tiene derecho a la prioridad de conformidad con 35 USC 119 (e) de la solicitud de patente provisional nº 61/161.796, presentada el 20 de marzo, 2009.

Declaración relativa a la investigación o desarrollo patrocinados por el gobierno federal

Esta invención se hizo en parte con el apoyo del gobierno de Estados Unidos con la subvención nº U01 A1075520 otorgada por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno de Estados Unidos tiene algunos derechos en la invención.

10 **Antecedentes**

La nitazoxanida (NTZ; 2-(acetiloxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida) es un fármaco antiparasitario aprobado por la FDA para el tratamiento de infecciones por *Giardia* y *Cryptosporidium* en adultos y niños. Es un antiparasitario y antidiarreico de amplio espectro. La eficacia de la NTZ está limitada por su poca solubilidad y unión fuerte e inactivación por proteínas del suero.

15 Los estafilococos negativos a la coagulasa (CoNS) han surgido como importantes patógenos intrahospitalarios oportunistas que son la causa principal de las infecciones asociadas con catéteres y dispositivos permanentes. La capacidad de los CoNS, incluyendo la especie arquetípica *Staphylococcus epidermidis*, para producir enfermedad depende de su capacidad para adherirse a las superficies de polímero donde forman aglomeraciones celulares de multicapas, gruesas, conocidas como biopelículas. Los componentes principales de las biopelículas de *S.*
20 *epidermidis* incluyen la poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PNAG, también conocida como PIA por polisacárido de adhesión intracelular) sintetizada por los productos de los genes *ica*, y proteínas de superficie tales como la proteína asociada a la acumulación Aap. La biopelícula contribuye a la persistencia limitando la eficacia de antibióticos y respuestas inmunitarias del hospedante. Las infecciones de la circulación sanguínea y el tracto urinario están clasificadas como la 2ª y 3ª causa respectivamente de muertes asociadas con la asistencia sanitaria en EE.UU. en
25 2002. Se insertan más de 5 millones de catéteres venosos centrales anualmente en EE.UU. y de las más de 200.000 infecciones de la circulación sanguínea adquiridas en la asistencia sanitaria que se producen anualmente, la mayoría se deben a catéter venoso central. Estas infecciones conducen a una mayor morbilidad, mortalidad, duración de las hospitalizaciones, y costes totales de la asistencia sanitaria.

30 Se han ensayado muchos fármacos y compuestos como inhibidores de biopelículas y algunos se han usado para revestir catéteres (p. ej., plata, minociclina, rifampina, platino, nitrofurantoína, clorhexidina y sulfadiazina). Algunos ensayos aleatorizados han mostrado los beneficios de usar catéteres impregnados con antibiótico(s) en pacientes hospitalizados para reducir la colonización y las infecciones de la circulación sanguínea relacionadas con catéter (CRBSI) e incluyen: catéteres impregnados con clorhexidina-sulfadiazina de plata comparado con catéteres no impregnados; catéteres revestidos con rifampina-minociclina comparado con catéteres no revestidos; y catéteres
35 impregnados con rifampina-minociclina comparado con catéteres con clorhexidina-sulfadiazina de plata.

La nitazoxanida (NTZ) es un producto terapéutico de 5-nitrotiazol que se usa para tratar una amplia variedad de infecciones bacterias parasitarias y anaerobias y está aprobada por la FDA para el tratamiento de infecciones por *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis* en adultos y niños. El fármaco también muestra eficacia contra infecciones por *Clostridium difficile*. Estudios mecanísticos han mostrado que la NTZ es un potente inhibidor de la
40 piruvato-ferredoxina oxidoreductasa y por lo tanto es activa contra todos los organismos (bacterias anaerobias y parásitos) que expresan esta enzima. Estudios mecanísticos pusieron de manifiesto que la forma aniónica del fármaco es biológicamente activa y se ha propuesto un mecanismo de abstracción de protón. Dicho mecanismo genérico puede explicar la amplia variedad de dianas biológicas descritas para este fármaco.

45 Estudios mecanísticos han mostrado que la NTZ es un potente inhibidor de PFOR interfiriendo con la función del cofactor pirofosfato de tiamina. La forma aniónica del fármaco abstrae un protón del complejo de TPP activado y de esta forma bloquea la catálisis del piruvato a acetil-CoA y CO₂. La forma protonada de la NTZ es biológicamente inactiva. La especie estafilocócica usa la piruvato deshidrogenasa y no PFOR para catalizar la descarboxilación oxidativa del piruvato. Sin embargo, la reactividad química de la NTZ puede no estar limitada a la diana PFOR ya que se ha mostrado que el fármaco inhibe nitrorreductasas, proteína disulfuro isomerasas y otras dianas.

50 Las cepas de *Escherichia coli* enteroagregativas (EAEC) han surgido como una causa común de diarrea persistente y malnutrición entre niños y personas infectadas por VIH. Durante la infección, las EAEC típicamente se adhieren a la mucosa intestinal por adhesinas fimbriales que producen un patrón agregativo característico.

55 Las enfermedades diarreicas infecciosas son la segunda mayor causa global de morbilidad y mortalidad, y los episodios repetidos o prolongados de diarrea pueden retrasar el crecimiento de los niños infectados y deteriorar la cognición. La Organización Mundial de la Salud ha calculado que este retraso del crecimiento afecta a

aproximadamente 147 millones de niños en el mundo en desarrollo, donde cada niño menor de 5 años sufre una media de tres episodios diarreicos por año. Debido a la carga de morbilidad de la enfermedad diarreica, en especial durante la infancia temprana, se espera que terapias más eficaces ahorren muchos años de vida ajustados por discapacidad.

- 5 EAEC, identificada y descrita por primera vez como una *E. coli* diarreogénica en 1987, ha surgido como una causa principal de la diarrea aguda y persistente (≥ 14 días) entre niños, pacientes de SIDA, y viajeros internacionales en países en desarrollo e industrializados. En todo el mundo, EAEC da cuenta de 8-32% de los casos de diarrea aguda entre bebés y niños y de 20-30% de casos de diarrea persistentes. Los individuos contraen la infección lo más a menudo por vía fecal-oral consumiendo alimentos y agua contaminados o por una mala higiene.
- 10 La presentación clínica de la infección por EAEC a menudo consiste en diarrea acuosa, a veces con paso de sangre y moco, pero algunas infecciones son asintomáticas. Este fenómeno es probable que se deba a diferencias tanto en la susceptibilidad del hospedante como la heterogeneidad de la cepa. Los pacientes a menudo experimentan inflamación intestinal marcada por niveles elevados de lactoferrina fecal, y la infección por EAEC puede perpetuar la malnutrición infantil.
- 15 La patogénesis por EAEC es compleja y no se entiende del todo, en parte debido a la heterogeneidad de las cepas. En general, la patogénesis por EAEC implica 3 etapas: 1) adherencia a la mucosa intestinal, mediada por fimbrias de adherencia agregativa (AAF); 2) formación de biopelícula sobre la superficie de enterocitos del hospedante; y 3) liberación de toxinas de EAEC, provocación de una respuesta inflamatoria, secreción intestinal, y toxicidad de la mucosa, que da como resultado vesiculación de microvellosidades y extrusión de células epiteliales.
- 20 Se han implicado varios factores en la adherencia de la mucosa y formación de biopelícula. El más importante y mejor estudiado es el regulador transcripcional principal AggR, cuyo gen se encuentra en un plásmido pAA de 60-65 MDa en muchas, pero no en todas, las cepas de EAEC. AggR es activado en respuesta a señales ambientales tales como sodio bajo, oxígeno, pH y nutrientes y controla la expresión de varios plásmidos codificados por genes implicados en la biogénesis fimbrial, en particular *aafA* (nº de acceso en GenBank AF012835), que codifica una subunidad estructural mayor de la variante AAF/II, expresada por la cepa patógena 042. Las fimbrias AAF/II se han descrito como haces de filamentos, en disposición semirrígida, de 5 nm de diámetro (7), y se cree que median la adherencia a la mucosa colónica y a las superficies de poliestireno y vidrio. El AggR también controla la expresión de otros genes fimbriales (p. ej., AFI, AAF/III) que son antigénicamente diferentes, algunos de los cuales pueden aglutinar eritrocitos o tener otros fenotipos productores de biopelículas.
- 25 Después de la adherencia, EAEC produce una biopelícula de mucosa que promueve la colonización y resiste la penetración de antimicrobianos. La biopelícula de la cepa 042 consiste en agregados gruesos de bacterias intercalados con espacios vacíos, similar a otras biopelículas bacterianas y característicos de la biopelícula pesada que forma sobre el epitelio durante la infección. La formación de biopelícula es mediada por fimbrias AAF cuya expresión implica dos genes cromosómicos, *fis* y *yafK*, que son activados por AggR. Sin embargo, los marcadores genéticos que caracterizan las cepas productoras de biopelícula y la importancia clínica de la formación de biopelículas durante la infección, siguen sin estar claros.
- 30
- 35

En *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, 44(9), páginas 2254-2258, se describe el uso de un modelo de hámster de enfermedad intestinal por *Clostridium difficile* inducida por antibiótico para evaluar la NZT.

- 40 En *Pharmaceutical Chemistry*, 1992, 14(1), páginas 209-211 se describe una serie de compuestos que, además de 5-nitrotiazol, contiene sistemas carbo y heterocíclicos, alifáticos, para el propósito de encontrar nuevas sustancias antimicrobianas, y estudiaban su actividad in vitro contra algunos organismos.

- 45 En *Journal of Medicinal Chemistry*, 1971, 14(1), páginas 10-16 se describe la preparación de una variedad de derivados de 2-amino-5-nitrotiazol y 2-hidrazino-5-nitrotiazol como potenciales esquistosomicidas. Se encontró que la falta de actividad general frente a una amplia variedad de tipos estructurales enfatizaba la especificidad que concierne a la 1-(5-nitro-2-tiazolil)-2-imidazolidinona altamente activa.

En *J. Pharmacol.*, 1955, 7, páginas 112-114 se describen las propiedades antiprotozoarias de nitrotiazoles, en particular de 2-acilamido-5-nitrotiazoles, para el tratamiento de la vaginitis debida a tricomonas.

- 50 La publicación internacional WO 2007/125109 describe el uso de derivados de N-(2-tiazolil)-amida de una fórmula específica para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad en la que está implicada la sintasa quinasa 3, en especial enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, o diabetes mellitus no dependiente de insulina.

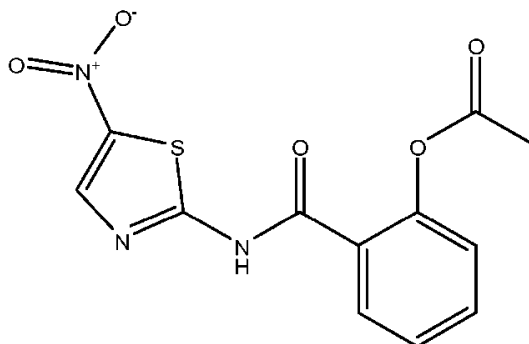
Hay una necesidad en la técnica desde hace tiempo de agentes antimicrobianos nuevos y mejorados. La presente invención satisface estas necesidades.

Resumen de la invención

- 55 Se describe en la presente memoria que la forma aniónica de la NTZ es la forma biológicamente activa y la mayor

parte del fármaco es inactivo por debajo de pH 6. Se llevaron a cabo experimentos para explorar la posibilidad de que modificaciones del fármaco actual pudieran superar estas deficiencias. Se describen en la presente memoria usos inesperados de la NTZ y compuestos relacionados y también compuestos nuevos y usos de los compuestos. Se describen diferentes aspectos y realizaciones de la invención con más detalle a continuación.

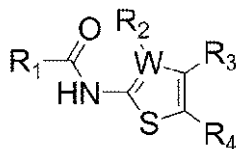
- 5 La fórmula molecular de la NTZ es $C_{12}H_9N_3O_5S$ y el peso molecular es 307,3. La NTZ tiene la siguiente estructura:



2-(acetiloxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida.

La presente invención proporciona nuevos derivados y análogos de NTZ y usos para estos compuestos.

En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I):

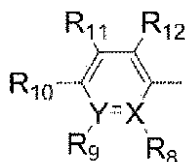


(I)

10

en donde:

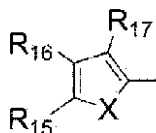
R_1 es



en donde:

- 15 X e Y se selecciona cada uno de C y N, y cuando X es N, R_8 está ausente y cuando Y es N, R_9 está ausente;

o R_1 es



en donde:

X se selecciona de O, S, NH y NCH_3 ;

- 20 $R_8 - R_{12}$ y $R_{15} - R_{17}$ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, aminoácido " $-Z(CH_2)_nNR_{13}R_{14}$ ",

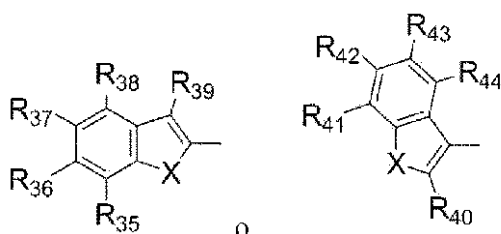
R_{13} y R_{14} se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno,

alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido, en donde los grupos de R₁₃ y R₁₄ están opcionalmente sustituidos como se describe más adelante;

Z se selecciona de CH₂, O, S, N;

5 n se selecciona de 1 a 6;

o R₁ es



en donde:

10 R₃₅ - R₃₉, R₄₀ - R₄₄ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido;

X se selecciona de O y S;

(en donde los grupos R₈ - R₁₂, R₁₅ - R₁₇, R₃₅ - R₃₉, R₄₀ - R₄₄ pueden estar opcionalmente sustituidos como se ha descrito antes)

15 R₃ es H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido (cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes);

20 R₂ está ausente cuando W es N, o cuando W es C, R₂ es H, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, nitro, cadena lateral de aminoácido, aminoácido, carbonilo, carboxi (cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes);

R₄ es nitro;

W se selecciona de C, N;

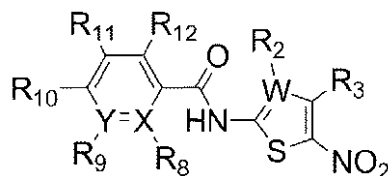
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

25 En un aspecto, la sustitución opcional puede incluir la sustitución opcional con 1, 2, 3 o 4 grupos, donde los grupos sustituyentes son independientemente H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido.

En un aspecto, W es N y R₂ está ausente en el compuesto de fórmula (I).

En un aspecto, W es C y R₂ es nitro en el compuesto de fórmula (I).

30 En una realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (II):



(II)

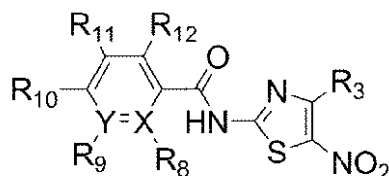
en donde:

R₂, R₃ y R₈ - R₁₂ son como ya se han definido antes (cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes); y

W se selecciona de C y N; y

X e Y se selecciona cada uno de C y N, y cuando X es N, R₈ está ausente y cuando Y es N, R₉ está ausente;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, un compuesto de fórmula II tiene una estructura de un compuesto de fórmula (II)(a):



(II)(a)

5

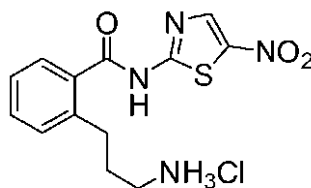
en donde:

R₃ y R₈ - R₁₂ son como ya se han definido antes (cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes);

X e Y se selecciona cada uno de CH y N, y cuando X es N, R₈ está ausente y cuando Y es N, R₉ está ausente;

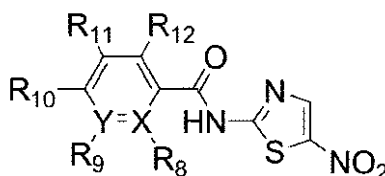
10 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, un compuesto de la invención tiene una estructura:



VPC162134

En un aspecto, un compuesto de la invención comprende una estructura de fórmula (II)(b):



(II)(b)

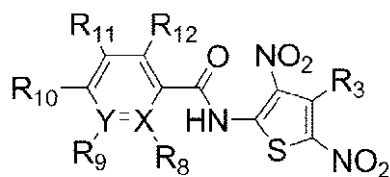
15 en donde:

R₈ - R₁₂ son como ya se han definido antes (cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes);

X e Y se selecciona cada uno de C y N, y cuando X es N, R₈ está ausente y cuando Y es N, R₉ está ausente;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (II)(c):



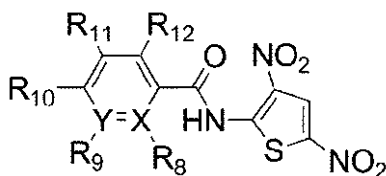
(II)(c)

en donde:

R₃ y R₈ - R₁₂ son como se han definido antes (cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes);

- 5 X e Y se selecciona cada uno de CH y N, y cuando X es N, R₈ está ausente y cuando Y es N, R₉ está ausente; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la invención proporciona un compuesto de fórmula (II)(d):



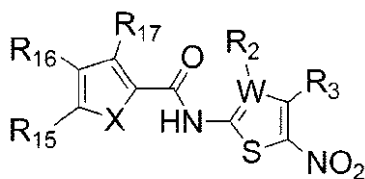
(II)(d)

en donde:

- 10 R₈ - R₁₂ son como se han definido antes (cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes);

X e Y se selecciona cada uno de CH y N, y cuando X es N, R₈ está ausente y cuando Y es N, R₉ está ausente; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III):



(III)

15

en donde:

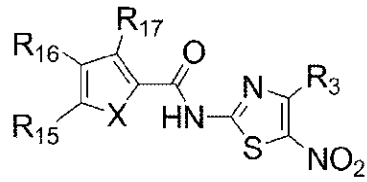
R₂, R₃ y R₁₅ - R₁₇ son como se han definido antes (cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes);

W se selecciona de C y N;

- 20 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, un compuesto de fórmula (III) tiene una estructura de un compuesto de fórmula (III)(a):



(III)(a)

en donde:

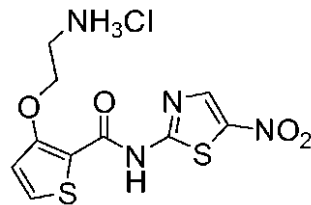
R₃ y R₁₅ - R₁₇ son como ya se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes;

5 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

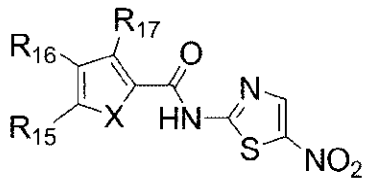
En otro aspecto, R₃ puede ser H.

En un aspecto, un compuesto de la invención tiene la estructura:



VPC162125

10 En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(b):



(III)(b)

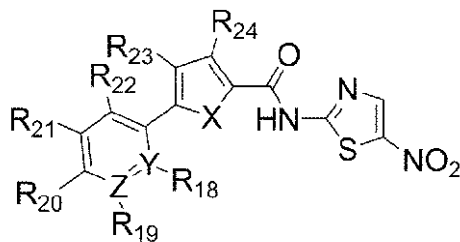
en donde:

R₁₅ - R₁₇ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido;

X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

15 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(c):



(III)(c)

en donde:

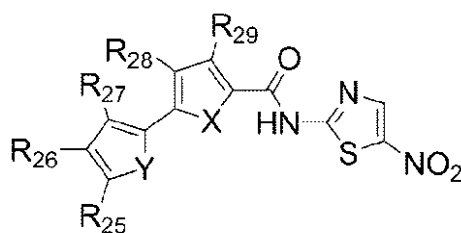
R₁₈ - R₂₄ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en: H, halógeno, acilo, alquilo, alqueniilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes;

5 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

Y y Z se selecciona cada uno independientemente de C y N, y cuando Y es N, R₁₈ está ausente y cuando Z es N, R₁₉ está ausente;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(d):



(III)(d)

10

en donde:

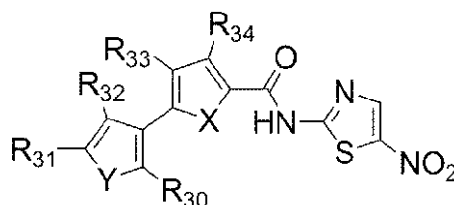
R₂₅ - R₂₉ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en: H, halógeno, acilo, alquilo, alqueniilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

15

X e Y se selecciona cada uno independientemente de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(e):



(III)(e)

20 en donde:

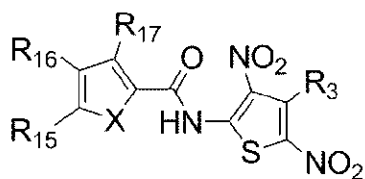
R₃₀ - R₃₄ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en: H, halógeno, acilo, alquilo, alqueniilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

25

X e Y se selecciona cada uno independientemente de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(f):



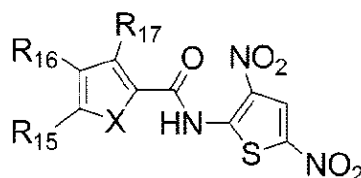
(III)(f)

en donde:

R₃ y R₁₅ - R₁₇ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes;

- 5 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(g):



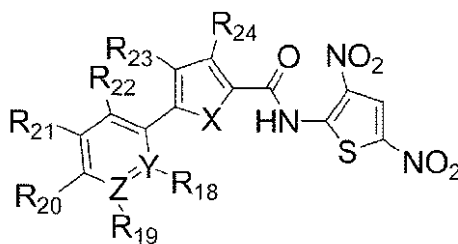
(III)(g)

en donde:

- 10 R₁₅ - R₁₇ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes;

X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(h):



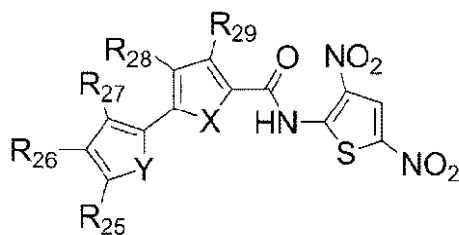
(III)(h)

- 15 en donde:

R₁₈ - R₂₄ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en: H, halógeno, acilo, alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes;

- 20 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃; y
Y y Z se selecciona cada uno de C y N, y cuando Y es N, R₁₈ está ausente y cuando Z es N, R₁₉ está ausente;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(i):



(III)(i)

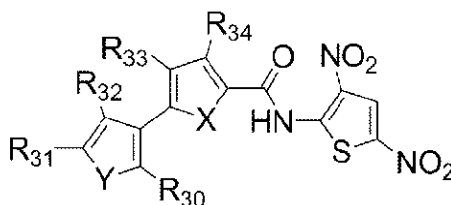
en donde:

5 R_{25} - R_{29} se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en: H, halógeno, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

X e Y se selecciona cada uno independientemente de O, S, NH y NCH_3 ;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (III)(j):



(III)(j)

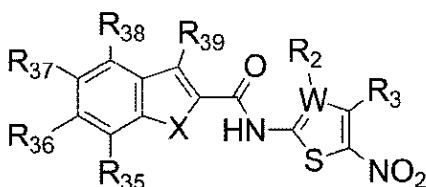
en donde:

10 R_{30} - R_{34} se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en: H, halógeno, acilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

X e Y se selecciona cada uno independientemente de O, S, NH y NCH_3 ;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula (IV):



(IV)

20 en donde:

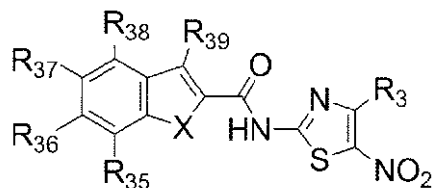
R_2 , R_3 y R_{35} - R_{39} son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes;

W se selecciona de C y N, de modo que cuando W es N, R_2 está ausente; y

X se selecciona de O, S, NH y NCH_3 ;

25 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, un compuesto de fórmula IV comprende un compuesto de fórmula (IV)(a):



(IV)(a)

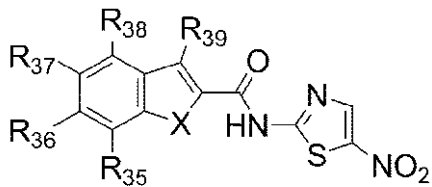
en donde:

5 R₃ y R₃₅ - R₃₉ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

X se selecciona de O, S, NH y NCH₃,

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (IV)(b):



(IV)(b)

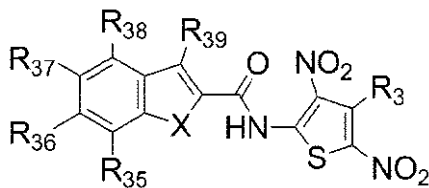
10 en donde:

R₃₅ - R₃₉ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (IV)(c):



(IV)(c)

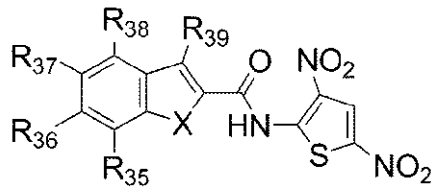
en donde:

R₃ y R₃₅ - R₃₉ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

20 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la invención proporciona un compuesto de fórmula (IV)(d):



(IV)(d)

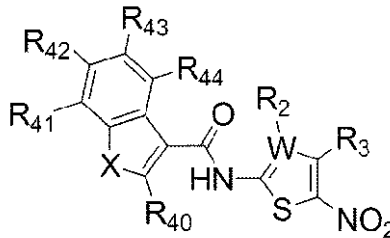
en donde:

R₃₅ - R₃₉ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

5 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización, se proporciona un compuesto de fórmula (V):



(V)

en donde:

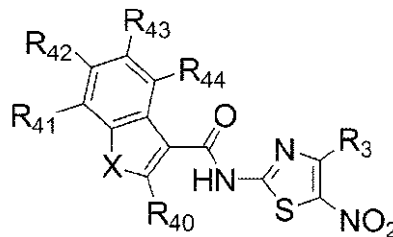
10 R₂, R₃ y R₄₀ - R₄₄ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes, y

W se selecciona de C y N, en donde cuando W es N, R₂ está ausente; y

X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 En un aspecto, un compuesto de fórmula V comprende un compuesto de fórmula (V)(a):



(V)(a)

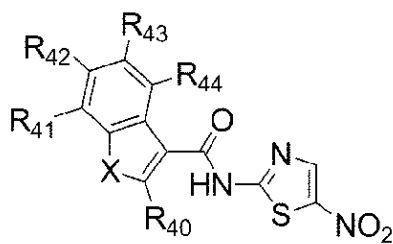
en donde:

R₃ y R₄₀ - R₄₄ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

20 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (V)(b):



(V)(b)

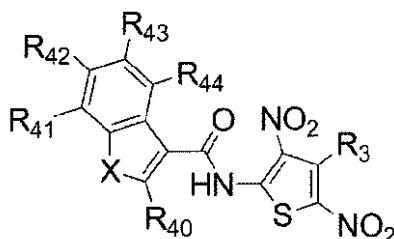
en donde:

R₄₀ - R₄₄ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

5 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (V)(c):



(V)(c)

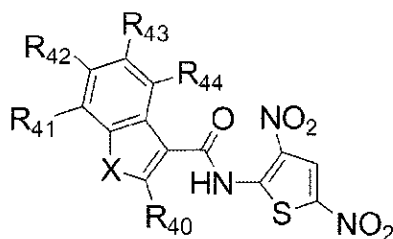
en donde:

10 R₃ y R₄₀ - R₄₄ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula (V)(d):



(V)(d)

15

en donde:

R₄₀ - R₄₄ son como se han definido antes, en donde cada grupo puede estar opcionalmente sustituido como se ha descrito antes; y

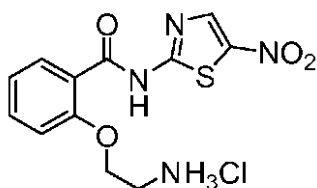
X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

20 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

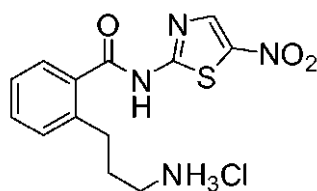
Para todos los compuestos de la invención, en un aspecto, la sustitución opcional de los grupos citados para los grupos R de esa fórmula es sustitución opcional con 1, 2, 3 o 4 grupos donde los grupos sustituyentes son

independientemente H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido.

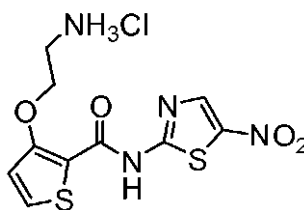
- 5 En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones que incluyen, pero no se limitan a análogos antranílicos de 2-amino-5-nitrotiazol, análogos de piridina de 2-amino-5-nitrotiazol, análogos de indol de 2-amino-5-nitrotiazol, análogos de haluro de 2-amino-5-nitrotiazol, análogos monosustituídos de 2-amino-5-nitrotiazol, análogos disustituídos de 2-amino-5-nitrotiazol, análogos de furano de 2-amino-5-nitrotiazol, análogos de tiofeno de 2-amino-5-nitrotiazol, análogos de 2-amino-4-cloro-5-nitrotiazol, y análogos de 2-amino-3,5-dinitrotiofeno, y derivados y análogos de los mismos.
- 10 En un aspecto, los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a los siguientes compuestos de ejemplo, como se describe además en los ejemplos:



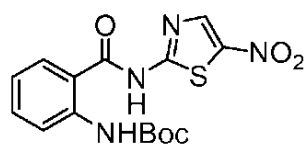
VPC161219



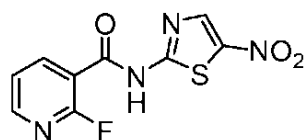
VPC162134



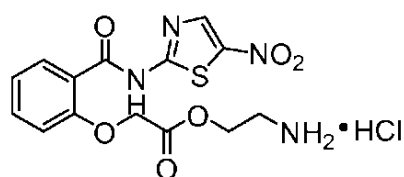
VPC162125



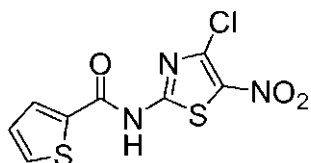
VPC162047



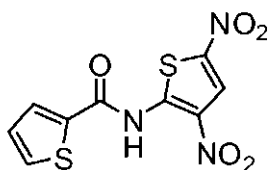
VPC16a1052



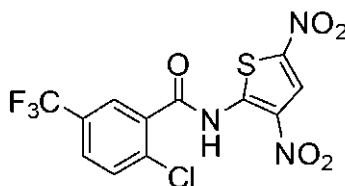
VPC162082



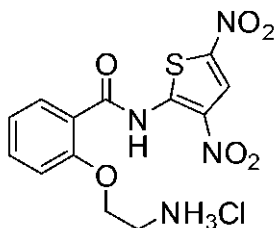
VPC162089



VPC16b1093



VPC16b2026



VPC162031

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), (II)(a), (III)(a), (III)(c), (III)(d) o (III)(e) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En otro aspecto más, la invención proporciona una composición farmacéutica como se ha definido antes, para usar para prevenir o tratar una infección microbiana, tal como una infección bacteriana, en particular de bacterias anaerobias, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus epidermidis* o *S. aureus*.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un kit para administrar un compuesto de fórmula (I), (II)(a), (III)(a), (III)(c), (III)(d) o (III)(e), comprendiendo dicho kit al menos un compuesto de cualquiera de las fórmulas (I), (II)(a), (III)(a), (III)(c), (III)(d) o (III)(e), opcionalmente suministrado como una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, un aplicador y un material de instrucciones para el uso del mismo.

En otro aspecto más, la invención proporciona una composición que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en NTZ, TIZ, AMIX y un compuesto de cualquiera de las fórmulas (I), (II)(a), (III)(a), (III)(c), (III)(d) o (III)(e), para usar en la prevención o tratamiento de una infección vírica.

15 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de la formación de biopelícula bacteriana, en donde dicho inhibidor de la formación de biopelícula se selecciona del grupo de compuestos que consiste en NTZ, TIZ, AMIX y un compuesto de cualquiera de las fórmulas (I), (II)(a), (III)(a), (III)(c), (III)(d) o (III)(e), para usar en la inhibición de la biopelícula bacteriana.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en NTZ, TIZ y AMIX, un compuesto de cualquiera de las fórmulas (I), (II)(a), (III)(a), (III)(c), (III)(d) o (III)(e), y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en la prevención o tratamiento de la hepatitis, tal como la hepatitis C, disentería amebiana o infección parasitaria anaerobia.

En un aspecto adicional más, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I) para usar en la prevención o tratamiento de *M. tuberculosis*.

Se describen además composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto descrito en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas son útiles, por ejemplo, para prevenir o tratar infecciones descritas en la presente memoria, administrando una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la invención.

- 5 Los compuestos descritos en la presente memoria son útiles para dirigirse a microorganismos distintos de los descritos en los ejemplos. Esto abarca todos los organismos para los que son eficaces los compuestos de nitroiazolida de la invención. En un aspecto, están abarcados todos los microorganismos que contienen PFOR (piruvato-ferredoxina oxidoreductasa) y KFOR (2-cetoglutarato oxidoreductasa) y enzimas relacionadas. En otro aspecto, los compuestos descritos en la presente memoria son útiles contra todas las especies anaerobias de bacterias incluyendo, pero no limitado a *Bacteroides* y *Clostridium*, ilustradas por *B. fragilis*, y *C. difficile* y *C. perfringens*.

Los compuestos descritos en la presente memoria también son útiles contra Epsilonproteobacterias, incluyendo todos los géneros y especies. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*.

- 15 Los compuestos descritos en la presente memoria también son útiles contra parásitos anaerobios que expresan PFOR incluyendo, pero no limitado a *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.

- 20 Los compuestos descritos en la presente memoria tienen además indicaciones pilicidas. Los compuestos descritos en la presente memoria pueden inhibir el ensamblado de fimbrias (pili) que usan la ruta de chaperona-usher de ensamblado que incluye pili AafA de cepas de *E. Coli* EAEC y cepas de UPEC uropatógenas que producen fimbrias de tipo I. En otro aspecto, los presentes compuestos son útiles contra *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, y otros miembros de las enterobacterias.

En otro aspecto más, los presentes compuestos son útiles contra bacterias Gram positivas, tal como por inhibición de la producción de biopelícula e inhibición de la adherencia a una superficie. En un aspecto, las bacterias son *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*.

- 25 En un aspecto adicional, los compuestos descritos en la presente memoria son bactericidas contra bacterias Gram positivas y micobacterias, incluyendo *M. tuberculosis*.

Se describe en la presente memoria que la amixina, un derivado de la nitazoxanida biodisponible, ha demostrado actividad antivírica contra la hepatitis C, lo que predice la eficacia para la hepatitis B e influenza A y B.

En un aspecto, los agentes antimicrobianos descritos en la presente memoria que inhiben el ensamblado o la función de filamentos fimbriales son útiles para prevenir o tratar una infección.

- 30 En un aspecto, un compuesto descrito en la presente memoria inhibe la formación de biopelícula. En un aspecto, los compuestos descritos en la presente memoria son útiles para inhibir la formación de biopelículas sobre superficies. En un aspecto, la superficie está en o sobre una entidad tal como un animal. En otro aspecto, la superficie es, por ejemplo, una superficie de catéter. En un aspecto, un compuesto descrito en la presente memoria inhibe la adherencia a una superficie. En un aspecto, la superficie es la de un catéter y un compuesto descrito en la presente memoria inhibe la adherencia bacteriana al catéter.

En un aspecto, los microbios son estafilocócicos. En otro aspecto, los microbios son EAEC. En un aspecto, los compuestos descritos en la presente memoria son útiles para inhibir la formación de biopelícula por bacterias que ya se han unido a una superficie.

- 40 En otro aspecto, NTZ, TIZ, AMIX y otros compuestos descritos en la presente memoria, inhiben el crecimiento microbiano en condiciones aerobias. En otro aspecto, NTZ, TIZ, AMIX y otros compuestos descritos en la presente memoria, inhiben el crecimiento microbiano y pueden afectar a la expresión o función de Aap en la promoción de agregación. En un aspecto, el microbio es una bacteria estafilocócica. En un aspecto, el estafilococo es *S. epidermidis*.

- 45 En un aspecto, NTZ inhibe la hemaglutinación microbiana de eritrocitos por los pili AafA de EAEC. En un aspecto, NTZ inhibe la hemaglutinación bloqueando el ensamblado de las fimbrias AafA. Por lo tanto, están abarcados los métodos para inhibir la formación de biopelículas de EAEC por inhibición del ensamblado de filamentos. Además, esta descripción proporciona también composiciones y métodos para usar como un antidiarreico.

En un aspecto, las bacterias susceptibles a los compuestos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a *S. epidermidis*, *C. difficile*, *H. pylori*, *C. jejuni*, MRSA, *E. coli*, y especies *Mycobacterium*.

- 50 La presente descripción también es útil para la prevención y tratamiento de infecciones, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto útil descrito en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden administrar o usar con otros fármacos y agentes antimicrobianos.

La presente descripción proporciona kits. Los kits de la descripción comprenden al menos un compuesto descrito en la presente memoria y un material de instrucciones para el uso de los mismos, y opcionalmente un aplicador.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1. Inhibición por NTZ del crecimiento aeróbico de *S. epidermidis*. Las bacterias se cultivaron en medio TSB con agitación a 37°C, sin NTZ ♦, en presencia de NTZ 10 mg/ml (■) y 25 mg/ml ▲).
- 10 Figura 2. Inhibición de biopelícula por NTZ. Se cultivaron cepas de *Staphylococcus* en presencia de diferentes concentraciones de NTZ en placas de poliestireno de 96 pocillos y se sometieron a tinción con cristal violeta después de 24 h como se describe en el texto. Las cepas usadas positivas para la biopelícula son *S. epidermidis* 9142 (●), *S. haemolyticus* 33208 (■) y las cepas negativas para la biopelícula son *S. hominis* 13532 (▲) y *S. epidermidis* CAV1005 (♦). La CI_{50} para las cepas productoras de biopelícula era 2,5 µg/ml.
- 15 Figura 3 (A y B). Cribado de la actividad antibiopelícula. A. Se ensayó en aislados clínicos confirmados como *S. epidermidis* la producción de biopelícula y la inhibición de biopelícula dependiente de la concentración por NTZ a las concentraciones indicadas, con DMSO que servía como un control adicional. Las cepas ICS1 e ICS5 eran positivas para la biopelícula. B. Inhibición dependiente de la concentración de la producción de biopelícula de cepas de *S. epidermidis* 9142, cepa mutante *icaA* 5179 y cepa revertiente 5179-R1 que produce una proteína Aap truncada. Los datos presentados representan la media y desviación típica de tres repeticiones.
- 20 Figura 4 (A y B). Efecto de NTZ en la adherencia al catéter. A. Se incubaron trozos de poliuretano de 1 centímetro cuadrado con las concentraciones indicadas de NTZ y la cepa de *S. epidermidis* 9142 y se contaron las bacterias adherentes a las 24 h. B. La inhibición dependiente de la concentración de NTZ de la adherencia primaria de la cepa 9142 a superficies de plástico se contó con microscopio usando el software ImagePro. Se presentan la media y desviación típica de múltiples repeticiones.
- 25 Figura 5. Dispersión de biopelícula por NTZ. Se cultivaron bacterias de la cepa de *S. epidermidis* 9142 en condiciones de producción de biopelícula durante 4 h y después de lavado, medio de nueva aportación y las concentraciones indicadas de NTZ añadidas durante 16 h adicionales, y se determinó la acumulación de biopelícula con cristal violeta. NTZ inhibía la formación adicional de biopelícula de una forma dependiente de la concentración, pero no dispersaba la biopelícula existente.
- 30 Figura 6. Efecto de zinc en la acción antibiopelícula de NTZ. Se añadieron cloruro de zinc, cloruro de calcio y cloruro de magnesio (véase la leyenda) a TSB que contenía una concentración fija de NTZ (12,5 µg/ml) a las concentraciones indicadas hasta 10 µM. El cloruro de zinc, pero no otros metales invirtieron el efecto inhibitorio de biopelícula de la NTZ con 50% de inversión con ~5 µM. Los datos presentados son por triplicado, y se indica la media y la desviación típica.
- 35 Figura 7. Actividad antibiopelícula comparativa de NTZ y AMIX. Inhibición dependiente de la concentración de la producción de biopelícula por la cepa de *S. epidermidis* 9142 por NTZ (●) y AMIX soluble en agua (■). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se presenta la media y la desviación típica.
- 40 Figura 8. Efecto de zinc (20 µM) en la inversión de la inhibición del crecimiento (CMI) por NTZ y AMIX. El ensayo de microdilución estándar con la cepa de *S. epidermidis* 9142 se preparó con diluciones seriadas de NTZ o AMIX y las mismas diluciones con concentración fija de $ZnCl_2$ 20 µM: NTZ + Zn^{2+} y AMIX + Zn^{2+} (véase la leyenda encerrada). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se presenta la media y la desviación típica.
- 45 Figura 9. Crecimiento bacteriano en medio MinA-G. A. Se cultivaron la cepa de EAEC AAFA/I 042 y B. la cepa de EAEC AAFA/II 17-2 en cultivo líquido complementado con NTZ con las concentraciones indicadas en la leyenda.
- Figura 10. Composición del medio en la producción de biopelícula. La acumulación de biopelícula se determinó en medio DMEM y LB (± glucosa al 0,4%) y medio MinA-G (± glucosa al 1%) con la cepa de EAEC 042 en presencia o ausencia de NTZ 25 µg/ml. La acumulación de biopelícula se cuantificó por ensayo con cristal violeta. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.
- 50 Figura 11. Inhibición dependiente de la dosis de la formación de biopelícula. Cepa de EAEC 042 en medio MinA-G complementado con las concentraciones indicadas de NTZ. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.
- Figura 12 (A y B). Inhibición del ensamblado de pilina por la NTZ. La pilina se recogió de las células enteras después de mezcla vorticial y centrifugación, seguido de precipitación con TCA como se describe en el texto. Tinción con Ponceau (A) e inmunotransferencia (B) de SDS-PAGE de extractos preparados a partir de bacterias cultivadas estáticamente en MinA-G, Min A-G + NTZ (20 µg/ml) y de medio LB.
- Figura 13. qRT-PCR de *aggR*, *aafA*, y *rpoS*. Se preparó el ARN total a partir de la cepa de EAEC 042 cultivada en medio MinA-G a las concentraciones de NTZ indicadas. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se clasifica el número de veces relativo de expresión para *aggR* igual a 1 en ausencia de fármaco.
- Figura 14 (A y B). Expresión de fusiones de indicadores. A. Actividad de β-galactosidasa de la fusión *aggR-lacZ* en

respuesta a diferentes concentraciones de NTZ. B. Actividad de PhoA de fusiones *aafA-phoA* en respuesta a diferentes concentraciones de NTZ.

Figura 15. Esquema para derivados alifáticos de 2-amino-nitrotiazol.

Figura 16 (A, B y C). Esquema para análogos de amina alifáticos de 2-amino-5-nitrotiazol.

5 Figura 17. Esquema para análogos de aminoácidos de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 18. Esquema para análogos de antranílicos de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 19. Esquema para análogos de piridina de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 20. Esquema para análogos de indol de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 21. Esquema para análogos de ácido carboxílico de 2-amino-5-nitrotiazol.

10 Figura 22. Esquema para análogos de tipo dímero de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 23. Esquema para análogos de haluro de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 24. Esquema para análogos monosustituidos de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 25. Esquema para análogos disustituidos de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 26 (A, B, C y D). Esquema para análogos de furano de 2-amino-5-nitrotiazol.

15 Figura 27 (A y B). Esquema para análogos de tiofeno de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 28. Esquema para isómeros de amida de 2-amino-5-nitrotiazol.

Figura 29. Esquema para análogos de aminoácidos de 2-amino-4-cloro-5-nitrotiazol.

Figura 30 (A, B y C). Esquema para análogos de 2-amino-3,5-dinitrotiofeno.

20 Para las figuras 15-30, los esquemas que generan compuestos principales están destacados en recuadros en negrita, es decir, las figuras 15, 16, 19, 25, 26, 27, 29 y 30. Los esquemas para la generación de análogos y derivados se proporcionan además en las tablas 3-18.

Figura 31 (A y B). Comparación de la amixina con la nitazoxanida en la inhibición de la multiplicación del virus de la hepatitis C en un modelo de replicón. A. El ensayo es una PCR cuantitativa en tiempo real del ARN vírico y la inhibición dependiente de la dosis de fármacos de la multiplicación vírica. B. Los valores de CI_{50} para la inhibición de la multiplicación vírica se presentan en forma de dos experimentos independientes que muestran que la amixina es superior a la NTZ por el modelo de replicón.

Figura 32 (A y B). Comparación de la amixina con otros fármacos antiparásitos para la eficacia en el tratamiento de la disentería amebiana en un modelo de infección de ratón. A (comprende 8 paneles, figuras 32-A1 a 32-A8). Comparación de diferentes fármacos en los recuentos celulares de *E. histolytica* que muestra que la amixina es superior a la nitazoxanida basado en la CMI. Los 8 paneles proporcionan los resultados para timidazol, amixina219, metronidazol, nitazoxanida, pamoato de pirvinio, yodoquinol, emetina y cloroquina (figuras 32-A1 a 32-A8). B (comprende 2 paneles, 32B1 y 32B2). Una comparación de las tasas de prevención para los diferentes fármacos administrados por vía oral (figura 32B1) o parenteral (figura 32B2) por adelantado, e indicando la equivalencia entre la amixina y NTZ en este ensayo. ** $pval=0,001$ (test exacto de Fisher) frente a PBS; * $pval=0,02$ (test exacto de Fisher) frente a PBS; † $pval=0,02$ (test exacto de Fisher) frente a metronidazol.

Descripción detallada

Abreviaturas y acrónimos

AAF - fimbrias de adherencia agregativa

Aap - proteína asociada a la acumulación

40 AMIX - amixina (TIZ-etilamina; compuesto VPC161219)

CRBSI - infecciones de la circulación sanguínea relacionadas con catéter

CoNS - estafilococos negativos para coagulasa

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

HA - Hemaglutinación

ICS - cepas que causan infección

KFOR - 2-cetoglutarato oxidorreductasa

CMI - concentración mínima inhibidora

5 MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

NTZ- nitazoxanida

PFOR - piruvato-ferredoxina oxidorreductasa

RFLP - polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

TIZ - tizoxanida

10 TSB o TSA - caldo o agar Trypticase y soja

Definiciones

15 En la descripción y reivindicaciones de la invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas más adelante. Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el significado entendido normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden ser útiles en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen más adelante los métodos y materiales preferidos. La terminología específica de importancia particular para la descripción de la presente invención se describe más adelante.

20 Los artículos “un” y “una” se usan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

25 El término “aproximadamente”, como se usa en la presente memoria, significa de forma aproximada, en la región de, en líneas generales, o alrededor de. Cuando el término “aproximadamente” se usa junto con un intervalo numérico, modifica el intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. Por ejemplo, en un aspecto, el término “aproximadamente” se usa en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor expuesto en una variación de 20%.

30 Las expresiones “compuesto terapéuticamente activo adicional” o “agente terapéutico adicional”, como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere al uso o administración de un compuesto para un uso terapéutico adicional para una lesión, enfermedad o trastorno particular que se va a tratar. Dicho compuesto, por ejemplo, podría incluir uno usado para tratar una enfermedad o trastorno no relacionado, o una enfermedad o trastorno que puede no ser sensible al tratamiento principal para la lesión, enfermedad o trastorno que se está tratando.

Como se usa en la presente memoria, los términos “administración de” y/o “administrar” un compuesto, debe entenderse que significa proporcionar un compuesto de la invención o un profármaco de un compuesto de la invención a un sujeto que necesite tratamiento.

35 Como se usa en la presente memoria, un “agonista” es una composición de la materia que, cuando se administra a un mamífero tal como un ser humano, potencia o extiende una actividad biológica atribuible al nivel o presencia de un compuesto diana o molécula de interés en el sujeto.

Como se usa en la presente memoria, “aliviar una enfermedad o síntoma de trastorno”, significa reducir la gravedad del síntoma o la frecuencia con la que un sujeto sufre dicho síntoma, o ambos.

40 El término “amebiasis”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la enfermedad causada por *E. histolytica*. El término “amebiasis” se usa de forma intercambiable con el término “amibiasis”. Los síntomas a menudo son bastante suaves y pueden incluir deposiciones sueltas, dolor de estómago y calambres estomacales. La disentería amebiana es una forma grave de amebiasis asociada con el dolor de estómago, heces con sangre y fiebre. Raramente *E. histolytica* invade el hígado y forma un absceso. Incluso menos comúnmente se extiende a otras partes del cuerpo tales como pulmones o cerebro.

45 Como se usa en la presente memoria, un “análogo” o “es análogo” de un compuesto químico es un compuesto que, a modo de ejemplo, se parece a otro en estructura pero no es necesariamente un isómero (p. ej. 5-fluorouracilo es un análogo de timina).

50 Un “antagonista” es una composición de la materia que cuando se administra a un mamífero, tal como un ser humano, inhibe la actividad biológica atribuible al nivel o presencia de un compuesto o molécula de interés en el

sujeto.

5 La expresión “agentes antimicrobianos”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto natural, sintético o semisintético o composición o mezcla de los mismos, que es seguro para uso humano o animal cuando se pone en práctica en los métodos de la invención, y es eficaz para matar o inhibir sustancialmente el crecimiento de microbios. “Antimicrobiano” como se usa en la presente memoria, incluye antibacterianos, antifúngicos y agentes antivíricos.

10 Un “compuesto”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de sustancia o agente que normalmente se considera un fármaco, o un candidato para usar como un fármaco, así como combinaciones y mezclas de los anteriores. Cuando se hace referencia a un compuesto de la invención, y salvo que se especifique otra cosa, el término “compuesto” se pretende que abarque no solo la entidad molecular especificada, sino también sus análogos farmacológicamente activos, farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero no limitado a sales, polimorfos, ésteres, amidas, profármacos, aductos, conjugados, metabolitos activos, y similares, donde dichas modificaciones de la entidad molecular sean adecuadas.

15 La expresión “vehículo de suministro” se refiere a cualquier clase de dispositivo o material que se puede usar para suministrar compuestos in vivo o se puede añadir a una composición que comprende compuestos administrados a una planta o animal. Esto incluye, pero no se limita a dispositivos implantables, agregados de células, materiales de matriz, geles, etc.

20 Como se usa en la presente memoria, un “derivado” de un compuesto se refiere a un compuesto químico que se puede producir a partir de otro compuesto de estructura similar en una o más etapas, como en la sustitución de H por un grupo alquilo, acilo o amino.

25 Como se usa en la presente memoria, una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad suficiente para producir un efecto seleccionado, tal como aliviar síntomas de una enfermedad o trastorno. En el contexto de administrar compuestos en forma de una combinación, tal como múltiples compuestos, la cantidad de cada compuesto, cuando se administra en combinación con otro u otros compuestos, puede ser diferente de cuando ese compuesto se administra solo. Por lo tanto, una cantidad eficaz de una combinación de compuestos se refiere colectivamente a la combinación como un todo, aunque las cantidades reales de cada compuesto pueden variar. La expresión “más eficaz” significa que el efecto seleccionado se alivia en mayor medida mediante un tratamiento con respecto al segundo tratamiento con el que se compara.

30 Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las expresiones “por ejemplo”, “tal como”, “que incluye” y similares, tienen el propósito de introducir ejemplos que aclaran todavía más la materia objeto más general. Salvo que se especifique de otra forma, estos ejemplos se proporcionan solo como una ayuda para entender la invención, y no se pretende que sean limitantes de ninguna forma.

Los términos “fórmula” y “estructura” se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

35 Como se usa en la presente memoria, una molécula “funcional” es una molécula en una forma en la que presenta una propiedad o actividad por la que se caracteriza. Una enzima funcional, por ejemplo, es una que presenta la actividad catalítica característica por la que se caracteriza la enzima.

Como se usa en la presente memoria, “homología” se usa de forma sinónima a “identidad”.

40 El término “inhibir”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un compuesto de la invención para reducir o impedir una función descrita, tal como que tiene actividad inhibidora del canal de sodio. Preferiblemente, la inhibición es en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 25%, incluso más preferiblemente en al menos 50%, y los más preferiblemente, la función es inhibida en al menos 75%. Los términos “inhibir”, “reducir” y “bloquear” se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

45 Como se usa en la presente memoria, “inyectar o aplicar” incluye la administración de un compuesto de la invención por una serie de vías y medios incluyendo, pero no limitado a medios tópico, oral, bucal, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmico, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópico, sublingual, vaginal, oftálmico, pulmonar, o rectal.

50 Como se usa en la presente memoria, un “material de instrucciones” incluye una publicación, una grabación, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se puede usar para comunicar la utilidad del péptido descrito en la presente memoria en el kit para llevar a cabo el alivio de las diferentes enfermedades o trastornos citados en la presente memoria. Opcional o alternativamente, el material de instrucciones puede describir uno o más métodos de alivio de las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material de instrucciones del kit descrito en la presente memoria puede, por ejemplo, estar pegado a un envase que contiene el compuesto identificado descrito en la presente memoria o ser transportado junto con un envase que contiene el compuesto identificado. Alternativamente, el material de instrucciones se puede transportar por separado del envase con la intención de que el material de instrucciones y el compuesto se usen conjuntamente por el receptor.

55

El término “modular” como se usa en la presente memoria, se refiere a cambiar el nivel de una actividad, función o proceso. El término “modula” abarca tanto inhibir como estimular una actividad, función o proceso.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como disolución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diferentes tipos de agentes humectantes. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de EE.UU. o citados en la Farmacopea de EE.UU. para usar en animales, incluyendo seres humanos.

El término “pilicida” como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas pequeñas inhibitoras de la biogénesis de filamentos.

10 El término “prevenir” como se usa en la presente memoria, significa impedir que suceda algo, o tomar medidas anticipadas contra algo que es posible o probable que suceda. En el contexto de la medicina “prevención” en general se refiere a la acción tomada para disminuir la posibilidad de tener una enfermedad o afección.

15 Un tratamiento “preventivo” o “profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos, o presenta solo signos muy tempranos, de una enfermedad o trastorno. Un tratamiento profiláctico o preventivo se administra con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada con el desarrollo de la enfermedad o trastorno.

20 “Cebador” se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridar específicamente con un molde de polinucleótido designado y proporcionar un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario. Dicha síntesis tiene lugar cuando el cebador polinucleótido se pone en condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, un molde polinucleótido complementario y un agente para polimerización tal como una ADN polimerasa. Un cebador típicamente es monocatenario, pero puede ser bicatenario. Los cebadores son típicamente ácidos desoxirribonucleicos, pero una amplia variedad de cebadores sintéticos y naturales son útiles para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario del molde para el que está diseñado que hibride con el fin de servir como sitio de inicio de la síntesis, pero no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. En tal caso, la hibridación específica del cebador con el molde depende de las condiciones restrictivas de hibridación. Los cebadores se pueden marcar con, por ejemplo, restos cromogénicos, radioactivos o fluorescentes y usar como restos detectables.

30 Un “profármaco” se refiere a un agente que se convierte en el fármaco original in vivo. Los profármacos a menudo son útiles porque, en algunos casos, pueden ser más fáciles de administrar que el fármaco original. Por ejemplo, pueden ser biodisponibles por administración oral, mientras que el original no. El profármaco también puede tener mejor solubilidad en composiciones farmacéuticas frente al fármaco original, o puede demostrar mejor sabor o ser más fácil de formular.

35 Como se usa en la presente memoria, el término “purificado” y términos similares, se refieren a un enriquecimiento de una molécula o compuesto respecto a otros componentes normalmente asociados con la molécula o compuesto en un entorno natural. El término “purificado” no indica necesariamente que se ha logrado la pureza completa de la molécula particular durante el procedimiento. Un compuesto “altamente purificado”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que es más de 90% puro.

El término “regula” se refiere a estimular o inhibir una función o actividad de interés.

40 Un “sujeto” de diagnóstico o tratamiento es un mamífero, incluyendo un ser humano, así como otros organismos de interés.

El término “síntoma”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier fenómeno mórbido o desvío de la normalidad en la estructura, función o sensación, experimentada por el paciente e indicativo de enfermedad. En cambio, un “signo” es una prueba objetiva de enfermedad. Por ejemplo, una nariz que sangra es un signo. Es evidente para el paciente, médico, enfermera u otros observadores.

45 Como se usa en la presente memoria, el término “tratar” incluye la profilaxis del trastorno o afección específico, o alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específicos y/o prevención o eliminación de dichos síntomas. Un tratamiento “profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o presenta solo signos tempranos de la enfermedad con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada con la enfermedad.

50 Un tratamiento “terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos de patología, con el propósito de disminuir o eliminar esos signos.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al cual se administra el compuesto.

Como se usa en la presente memoria, el término “tratar” incluye la profilaxis de la enfermedad, trastorno o afección

específico, o el alivio de los síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección específico y/o prevenir o eliminar dichos síntomas.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "herida" se refiere al desgarro, corte o rotura físicos de un tejido o capa celular. Una herida puede producirse por cualquier traumatismo físico, incluyendo un procedimiento quirúrgico o como resultado de una enfermedad, trastorno o afección.

Definiciones químicas

Como se usa en la presente memoria, el término "halógeno" o "halogeno-" incluye bromo, cloro, fluoro y yodo.

El término "halogenoalquilo" como se usa en la presente memoria, se refiere a un radical alquilo que lleva al menos un sustituyente halógeno, por ejemplo, clorometilo, fluoroetilo o trifluorometilo y similares.

10 La expresión "alquilo C₁-C_n" en donde n es un número entero, como se usa en la presente memoria, representa un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene de una al número especificado de átomos de carbono. Típicamente, los grupos alquilo C₁-C₆ incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, y similares.

15 La expresión "alqueno C₂-C_n" en donde n es un número entero, como se usa en la presente memoria, representa un grupo insaturado olefínico ramificado o lineal que tiene de 2 al número especificado de átomos de carbono y al menos un doble enlace. Los ejemplos de dichos grupos incluyen, pero no se limitan a 1-propeno, 2-propeno, 1,3-butadieno, 1-butenilo, hexeno, penteno, y similares.

20 La expresión "alquino C₂-C_n" en donde n es un número entero, se refiere a un grupo insaturado ramificado o lineal que tiene de 2 al número especificado de átomos de carbono y al menos un triple enlace. Los ejemplos de dichos grupos incluyen, pero no se limita a 1-propino, 2-propino, 1-butino, 2-butino, 1-pentino, y similares.

La expresión "cicloalquilo C₃-C_n" en donde n=8, representa ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

25 Como se usa en la presente memoria, la expresión "opcionalmente sustituido" típicamente se refiere a de 0 a 4 sustituyentes, en donde los sustituyentes se seleccionan cada uno de forma independiente. Cada uno de los sustituyentes independientemente seleccionados puede ser igual o diferente de los otros sustituyentes. Por ejemplo, los sustituyentes de un grupo R de una fórmula pueden estar opcionalmente sustituidos (p. ej., de 1 a 4 veces) con H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxo, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido, independientemente seleccionados.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillos carbocíclico mono o bicíclico, opcionalmente sustituido, que tiene uno o dos anillos aromáticos incluyendo, pero no limitado a fenilo, bencilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo, y similares. Un arilo opcionalmente sustituido incluye compuestos arilo que tienen de 0 a 4 sustituyentes y un arilo sustituido incluye compuestos arilo que tienen uno o más sustituyentes. La expresión (alquil C₅-C₈)arilo se refiere a cualquier grupo arilo que está unido al resto original por el grupo alquilo.

35 "Heterociclo" se refiere a cualquier anillo heterocíclico estable de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 miembros, (salvo que se indique que el número de miembros es otro), monocíclico, bicíclico o tricíclico, que es saturado o parcialmente insaturado, y que consta de átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos independientemente seleccionados del grupo que consiste en N, O y S. Si el heterociclo se define por el número de átomos de carbono, entonces 1, 2, 3 o 4 de los átomos de carbono listados están sustituidos por un heteroátomo. Si el heterocíclico es bicíclico o tricíclico, entonces al menos uno de los dos o tres anillos debe contener un heteroátomo, aunque ambos o los tres pueden contener uno o más heteroátomos. El grupo N puede ser N, NH o N-sustituyente, dependiendo del anillo elegido y si se citan sustituyentes. Los heteroátomos nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados (p. ej., S, S(O), S(O)₂, y N-O). El heterociclo puede estar unido a su grupo colgante por cualquier heteroátomo o átomo de carbono que da como resultado una estructura estable. Los heterociclos descritos en la presente memoria pueden estar sustituidos en el átomo de carbono o en un átomo de nitrógeno, si el compuesto resultante es estable.

40 "Heteroarilo" se refiere a cualquier anillo heterocíclico estable de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 miembros, (salvo que se indique que el número de miembros es otro), monocíclico, bicíclico o tricíclico, que es aromático, y que consiste en átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos independientemente seleccionados del grupo que consiste en N, O y S. Si el heteroarilo se define por el número de átomos de carbono, entonces 1, 2, 3 o 4 de los átomos de carbono listados están sustituidos por un heteroátomo. Si el grupo heteroarilo es bicíclico o tricíclico, entonces al menos uno de los dos o tres anillos debe contener un heteroátomo, aunque ambos o los tres pueden contener uno o más heteroátomos. Si el grupo heteroarilo es bicíclico o tricíclico, entonces solo uno de los anillos debe ser aromático. El grupo N puede ser N, NH o N-sustituyente, dependiendo del anillo elegido y de si se citan sustituyentes. Los heteroátomos nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados (p. ej., S, S(O), S(O)₂, y N-O). El anillo de heteroarilo puede estar unido a su grupo colgante por cualquier heteroátomo o átomo de carbono que de como

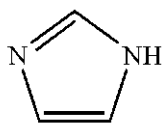
resultado una estructura estable. Los anillos de heteroarilo descritos en la presente memoria pueden estar sustituidos en el átomo de carbono o en un átomo de nitrógeno, si el compuesto resultante es estable.

5 El término "heteroátomo" significa, por ejemplo, oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio (incluyendo cualquier forma oxidada de nitrógeno, azufre, fósforo o silicio; la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico, o un nitrógeno sustituible de un anillo heterocíclico).

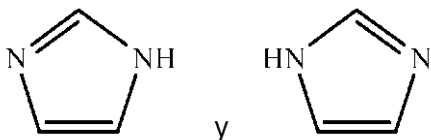
El término "bicíclico" representa un anillo de carbonos bicíclico estable con puente o condensado, de 7 a 12 miembros, insaturado o saturado. El anillo bicíclico puede estar unido a cualquier átomo de carbono que proporcione una estructura estable. El término incluye, pero no se limita a naftilo, dicitohexilo, dicitohexenilo, y similares.

10 Los compuestos de la presente invención contienen uno o más centros asimétricos en la molécula. De acuerdo con la presente invención, una estructura que no designa la estereoquímica debe entenderse que abarca todos los diferentes isómeros ópticos, así como mezclas racémicas de los mismos.

Los compuestos de la presente invención pueden existir como formas tautómeras y la invención incluye tanto mezclas como tautómeros individuales separados. Por ejemplo, la siguiente estructura:



15 se entiende que representa una mezcla de estructuras:



20 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que retienen la eficacia biológica y propiedades de los compuestos de la presente invención y que no son indeseables biológicamente o de otra forma. En muchos casos, los compuestos de la presente invención pueden formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

Los compuestos de la presente invención que tienen uno o más átomos de carbono asimétricos pueden existir como enantiómeros ópticamente puros, o diastereoisómeros ópticamente puros, así como mezclas de enantiómeros, mezclas de diastereoisómeros y mezclas racémicas de dichos estereoisómeros. La presente invención incluye en su alcance todos dichos isómeros y mezclas de los mismos.

25 Realizaciones

Como se describe en la presente memoria, las composiciones descritas en la presente memoria comprenden, como un agente activo, compuestos que tienen la estructura de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente memoria en una forma farmacéuticamente aceptable. Si se desea, las composiciones pueden comprender además uno o más agentes activos adicionales. Cuando sea adecuado, cualquiera de los agentes activos se puede 30 administrar en forma del compuesto por sí mismo, y/o en forma de una sal, polimorfo, éster, amida, derivado o similar, con la condición de que la sal, polimorfo, éster, amida o derivado sea farmacológicamente adecuado. Cuando sea adecuado, las sales, ésteres, amidas y otros derivados de los agentes activos se pueden preparar usando procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la técnica de la química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, por J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 4^a Ed. 35 (New York: Wiley-Interscience, 1992). Para cualquiera de los agentes activos que puedan existir en formas enantiómeras, el agente activo se puede incorporar en las presentes composiciones como el racemato o en forma enantioméricamente enriquecida.

40 Los valores proporcionados en la presente memoria para radicales, sustituyentes e intervalos, son solo para ilustrar; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de los intervalos definidos para los radicales y sustituyentes. Los compuestos descritos incluyen compuestos de las fórmulas específicas citadas en la presente memoria, que tienen cualquier combinación de los valores de ejemplo, valores preferidos y valores más preferidos descritos en la presente memoria.

45 Los procedimientos para preparar compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente memoria o para preparar compuestos intermedios útiles para preparar compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente memoria, se proporcionan como realizaciones adicionales. También se proporcionan como realizaciones adicionales compuestos intermedios útiles para preparar compuestos de fórmula I.

- En los casos donde los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales de ácido o base, puede ser adecuado el uso de compuestos como sales. Los ejemplos de sales aceptables son sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, y α -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, incluyendo sales de hidrócloruro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.
- Las sales aceptables se pueden obtener usando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado, proporcionando un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden hacer sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.
- Los procedimientos para preparar compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente memoria se proporcionan como realizaciones adicionales y se ilustran mediante los siguientes procedimientos en los que el significado de los radicales genéricos son como se han dado antes salvo que se especifique otra cosa.
- En los casos donde los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales de ácido o base estables no tóxicas, la administración de los compuestos como sales puede ser adecuada. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, cetoglutarato, y glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, incluyendo sales de hidrócloruro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.
- Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener usando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado, proporcionando un anión fisiológicamente aceptable. También se pueden hacer sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.
- Los compuestos de cualquiera de las fórmulas de la invención se pueden formular como composiciones farmacéuticas y administrar a un hospedante mamífero, tal como un paciente humano en una variedad de formas adaptadas a la vía de administración elegida, es decir, vía oral o parenteral, por vía intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.
- Se observará que los compuestos de la invención se pueden administrar usando diferentes clases de sistemas y medios de suministro. Además, los compuestos de la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes y compuestos terapéuticos, y se pueden usar con otros tipos de tratamiento.
- Por lo tanto, los presentes compuestos se pueden administrar de forma sistémica, p. ej., por vía oral, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. Pueden estar encerrados en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede combinar con uno o más excipientes y usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas para chupar, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variar y puede ser convenientemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 60% en peso de una forma farmacéutica unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá un nivel de dosificación eficaz.
- Los comprimidos, pastillas para chupar, píldoras, cápsulas, y similares también pueden contener los siguientes: aglutinantes tales como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo, o se puede añadir un agente de sabor tal como menta, aceite de gaulteria o sabor de cereza. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Pueden estar presentes varios otros materiales como revestimientos o para modificar de otra manera la forma física de la forma farmacéutica unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden revestir con gelatina, cera, laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como un agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y agente de sabor tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado para preparar cualquier forma farmacéutica unitaria debe ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxica en las cantidades usadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y dispositivos de liberación sostenida.
- El compuesto activo también se puede administrar por vía intravenosa o intraperitoneal por infusión o inyección. Las soluciones del compuesto activo o sus sales, se pueden preparar en agua, opcionalmente mezclada con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, las preparaciones

contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

5 Las formas farmacéuticas adecuadas para inyección e infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo, que están adaptadas para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables o infusibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma farmacéutica final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El excipiente o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos, y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por la formación de liposomas, manteniendo el tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede realizar mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede realizar mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados antes, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para preparar soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y de liofilización, que dan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones previamente esterilizadas por filtración.

Para la administración tópica, los presentes compuestos se pueden aplicar en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, en general será deseable administrarlos a la piel en forma de composiciones o formulaciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser un sólido o un líquido.

25 Los vehículos sólidos útiles incluyen sólidos finalmente divididos, tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los vehículos líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles, mezclas de agua-alcohol/glicol, en las que los presentes compuestos se pueden disolver o dispersar en niveles eficaces, opcionalmente con la ayuda de tensioactivos no tóxicos. Los adyuvantes tales como fragancias y agentes antimicrobianos adicionales se pueden añadir para optimizar las propiedades para un uso dado. Las composiciones líquidas resultantes se pueden aplicar como almohadillas absorbentes, usadas para impregnar vendajes y otros apósitos, o pulverizar sobre la zona afectada usando pulverizadores de aerosol o tipo bomba.

También se pueden usar espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales y ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados, con vehículos líquidos para formar pastas extensibles, geles, pomadas, jabones y similares, para aplicar directamente en la piel del usuario.

35 Los ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que se pueden usar para suministrar los compuestos de fórmula I en la piel, son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Jacquet et al. (patente de EE.UU. n° 4.608.392), Geria (patente de EE.UU. n° 4.992.478), Smith et al. (patente de EE.UU. n° 4.559.157) y Wortzman (patente de EE.UU. n° 4.820.508).

40 Las dosificaciones útiles de los compuestos de fórmula I se pueden determinar comparando su actividad in vitro y la actividad in vivo en modelos animales. Los métodos para extrapolar las dosificaciones eficaces en ratones y otros animales, a seres humanos son conocidos en la técnica, véase la patente de EE.UU. n° 4.938.949.

En general, la concentración del o de los compuestos de fórmula I en una composición líquida tal como una loción, será de aproximadamente 0,1-25% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,5-10% en peso. La concentración en una composición semisólida o sólida tal como un gel o un polvo será de aproximadamente 0,1-5% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,5-2,5% en peso.

45 La cantidad del compuesto, o una de sus sales activas o derivado, necesaria para el tratamiento, variará no solo con la sal particular seleccionada, sino también con la vía de administración, la naturaleza del estado que se va a tratar y la edad y afección del paciente, y finalmente será a discreción del médico o especialista clínico que atiende.

50 Sin embargo, en general, una dosis adecuada estará en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg, p. ej., de aproximadamente 10 a aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal al día, tal como de 3 a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal del receptor al día, preferiblemente en el intervalo de 6 a 90 mg/kg/día, lo más preferiblemente en el intervalo de 15 a 60 mg/kg/día.

El compuesto se administra convenientemente en forma farmacéutica unitaria; por ejemplo, que contiene de 5 a 1000 mg, convenientemente de 10 a 750 mg, lo más convenientemente de 50 a 500 mg del principio activo por forma farmacéutica unitaria.

55 De forma ideal, cuando el principio activo tiene que entrar en la circulación y tiene que suministrarse por la sangre, el principio activo en una realización, debe administrarse para lograr concentraciones plasmáticas máximas del

- compuesto activo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 75 μM , preferiblemente, aproximadamente de 1 a 50 μM , lo más preferiblemente, aproximadamente de 2 a aproximadamente 30 μM . Esto se puede lograr, por ejemplo, por inyección intravenosa de una solución del 0,05 al 50% del principio activo, opcionalmente en solución salina, o administrado por vía oral como un bolo que contiene aproximadamente 1-100 mg del principio activo. Se pueden mantener niveles en la sangre convenientes por infusión continua para proporcionar aproximadamente 0,01-5,0 mg/kg/h o por infusiones intermitentes que contienen aproximadamente 0,4-15 mg/kg del o de los principios activos.
- La dosis deseada por se puede presentar convenientemente en una sola dosis o como dosis divididas administradas a intervalos adecuados, por ejemplo, como 2, 3, 4 o más subdosis al día. Las propias subdosis se pueden dividir más, por ejemplo, en un número discreto de administraciones separadas holgadamente; tal como múltiples inhalaciones de un insuflador o por aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.
- En otra realización, una formulación descrita en la presente memoria se puede impregnar en un material de apósito (o estar contenida o comprendida por el material de apósito de otra forma). El material de apósito es una tela farmacéuticamente aceptable. Puede ser, por ejemplo, gasa o cualquier otro tipo de tela o material médico que se puede usar para cubrir una herida y/o mantener un agente terapéutico o composición en contacto con un paciente.
- La composición descrita en la presente memoria puede comprender además aditivos terapéuticos adicionales, solos o en combinación (p. ej., 2, 3 o 4 aditivos adicionales). Los ejemplos de aditivos adicionales incluyen, pero no se limitan a: (a) antimicrobianos, (b) esteroides (p. ej., hidrocortisona, triamcinolona); (c) medicamentos para el dolor (p. ej., aspirina, un AINE y un anestésico local); (d) agentes antiinflamatorios; y (e) combinaciones de los mismos.
- Las proteínas de matriz no sintéticas como el colágeno, glicosaminoglucanos y ácido hialurónico, que son digeridas enzimáticamente en el cuerpo, son útiles para el suministro (véanse las patentes de EE.UU. nº 4.394.320; 4.472.840; 5.366.509; 5.606.019; 5.645.591; y 5.683.459) y son adecuadas para usar con la presente invención. Se pueden usar otros medios y dispositivos implantables para el suministro de los compuestos de la invención in vivo. Estos incluyen, pero no se limitan a esponjas, tales como las de Integra, geles de fibrina, armazones formados con microesferas sinterizadas de copolímeros de poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLAGA) y nanofibras formadas de colágeno natural, así como otras proteínas. Los compuestos de la presente invención se pueden combinar además con factores de crecimiento, factores nutrientes, productos farmacéuticos, compuestos que contienen calcio, agentes antiinflamatorios, agentes microbianos, o cualquier otra sustancia capaz de acelerar o facilitar el crecimiento, estabilidad y remodelado óseo o tisular.
- Las composiciones descritas en la presente memoria también se pueden combinar con cargas o partículas inorgánicas. Por ejemplo, para usar en injertos implantables, las cargas o partículas inorgánicas se pueden seleccionar de hidroxiapatito, fosfato tricálcico, vidrio cerámico, fosfato cálcico amorfo, partículas o polvos cerámicos porosos, malla de titanio o aleación de titanio, o titanio o aleación de titanio en partículas.
- Los ejemplos de otros agentes antimicrobianos que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a isoniazida, etambutol, pirazinamida, estreptomina, clofazimina, rifabutina, fluoroquinolonas, ofloxacina, esparfloxacina, rifampina, azitromicina, claritromicina, dapsona, tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, doxiciclina, ampicilina, anfotericina B, ketoconazol, fluconazol, pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, lincomicina, pentamidina, atovacuona, paromomicina, diclaraziril, aciclovir, trifluorouridina, foscarnet, penicilina, gentamicina, ganciclovir, iatroconazol, miconazol, piritona de Zn, y sales de plata, tales como cloruro, bromuro, yoduro, y peryodato.
- En una realización, los compuestos de la invención se pueden encapsular primero en microcápsulas, microesferas, micropartículas, microfibras, fibras de refuerzo y similares, para facilitar la mezcla y conseguir la liberación controlada, prolongada, retardada y/o sostenida y combinada con otros agentes o fármacos. La encapsulación de agentes biológicamente activos también puede proteger al agente contra la degradación durante la formación del material compuesto de la invención.
- En otra realización de la invención, el compuesto se libera de forma controlable en un sujeto cuando la composición de la invención se implanta en un sujeto, debido a la biorresorción basada en la escala de tiempo que resulta del remodelado celular. En un aspecto, la composición se puede usar para reemplazar una zona de discontinuidad en el tejido. La zona de discontinuidad puede ser el resultado de un traumatismo, una enfermedad, trastorno o afección, cirugía, lesión, etc.
- Como se usa en la presente memoria, un "material de instrucciones" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que se puede usar para comunicar la utilidad de la composición de la invención para su uso indicado. El material de instrucciones del kit de la invención puede estar, por ejemplo, pegado en un envase que contiene la composición o ser transportado junto con un envase que contiene la composición. Alternativamente, el material de instrucciones se puede transportar por separado del envase con la intención de que el material de instrucciones y la composición sean usados conjuntamente por el receptor.
- El método descrito en la presente memoria incluye un kit que comprende un compuesto identificado en la invención y un material de instrucciones que describe la administración del compuesto o una composición que comprende el compuesto a una célula o un sujeto en cualquier objetivo de interés, tal como una superficie. Se debe considerar que

esto incluye otras realizaciones de los kits que son conocidas por los expertos en la técnica, tal como un kit que comprende un disolvente (preferiblemente estéril) adecuado para disolver o suspender la composición descrita en la presente memoria, antes de administrar el compuesto a una célula o un sujeto. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

- 5 Según la presente invención, como se ha descrito antes o se describe en los ejemplos más adelante, se pueden usar técnicas químicas, celulares, histoquímicas, bioquímicas, de biología molecular, microbiología, y técnicas in vivo que son conocidas por los expertos en la técnica. Dichas técnicas se explican con detalle en la bibliografía.

Sin descripción adicional, se cree que un experto en la técnica usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, puede hacer y usar los compuestos de la presente invención.

- 10 La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos y realizaciones. Sin más descripción, se cree que el experto en la técnica, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, puede hacer y usar la presente invención y poner en práctica los métodos descritos. Por lo tanto, los siguientes ejemplos de trabajo se proporcionan sólo con el propósito de ilustrar y señalar específicamente las realizaciones preferidas de la presente invención, y no deben considerarse limitantes de ninguna manera del resto de la descripción. Por lo tanto, debe considerarse que los ejemplos abarcan todas y cada una de las variaciones que resultan evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en la presente memoria, que están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se pueden encontrar en la técnica otras técnicas útiles que se pueden poner en práctica con la presente invención, tal como Rossignol et al. (publicación internacional WO2007081974).

20 Ejemplos

Los resultados descritos a continuación demuestran que la nitazoxanida se hizo para ser soluble en agua y al mismo tiempo mejoró mucho su pK_a . En los ensayos enzimáticos directos, el nuevo compuesto es más inhibitor que la NTZ.

- 25 También se demuestran nuevos compuestos principales que se han sintetizado. Algunos de estos nuevos compuestos principales son de la clase de benzotiofeno-nitrotiazolida con acción antimicrobiana demostrada contra miembros de este grupo de patógenos.

Ejemplo 1 - Biopelículas: La nitazoxanida inhibe la formación de película por *Staphylococcus epidermidis*

- 30 Una de las comunicaciones iniciales sobre el espectro de acción de la NTZ indicaba que el fármaco era activo para *Staphylococcus aureus* solo en condiciones anaerobias (6). En el presente estudio los autores de la invención exploraron la naturaleza inhibitora de NTZ contra cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Estos estudios muestran que NTZ es inhibitora del crecimiento aerobio de especies estafilocócicas que incluyen cepas de MRSA de *S. aureus* (CMI 8-16 $\mu\text{g/ml}$), pero con niveles por debajo de la CMI bloquea la formación de biopelícula de *S. epidermidis*. La inhibición de la producción de biopelícula por NTZ se puede invertir por adición de cloruro de zinc 10 μM al medio. Debido a que la acumulación de *S. epidermidis* en superficies y la agregación en líquido es mediada por proteínas asociadas a la acumulación (Aap) dependientes de Zn^{2+} a través de las repeticiones del dominio de dimerización G5 (cremallera de zinc) (4), es probable que la NTZ afecte a la expresión o función de esta proteína.

Materiales y métodos

- 35 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento. Las cepas bacterianas usadas en este estudio se listan en la tabla 1. Salvo que se especifique otra cosa, las cepas se cultivaron en caldo o agar de Trypticase-soja (TSB o TSA, respectivamente, a 37°C) con agitación para los cultivos líquidos. Todas las cepas se almacenaron a -80°C en glicerol al 15%.

- 45 Identificación de aislados de *S. epidermidis* de las infecciones de la circulación sanguínea relacionadas con catéteres. Las cepas que producen infección (ICS) de *S. epidermidis* se obtuvieron de individuos con un catéter intravenoso de largo plazo y una CRBSI, definida por más de un cultivo de sangre y un cultivo simultáneo de la punta de catéter con CoNS. Se revisaron los registros médicos para estos pacientes para confirmar que el paciente presentaba manifestaciones clínicas de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, la ausencia de otro foco de infección y la resolución de SIRS en el plazo de 48 h de la retirada del catéter.

- 50 La identificación de las especies se llevó a cabo por uno de dos métodos: o bien usando el sistema API *Staph* (BioMerieux, Durham, N.C.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o mediante ensayo genético. Este último se llevó a cabo por una combinación de dos métodos: identificación por PCR del gen específico de *S. epidermidis* *serp0107* (16) y análisis por PCR del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen *tuf* de *Staphylococcus* (15). Se preparó ADN genómico suspendiendo una colonia bacteriana individual en 20 μl de tampón de lisis que contenía SDS al 0,25% y NaOH 0,05 N, incubando a 95°C durante 5 min, y después añadiendo 180 μl de dH_2O estéril. Después de centrifugación durante 1 min a 16.100 xg para sedimentar los residuos, el líquido sobrenadante se usó como ADN molde para la PCR. Las muestras se mantuvieron a -20°C para

almacenamiento a largo plazo. Las PCR se llevaron a cabo con un ciclador térmico Mastercycler Gradient (Eppendorf, Westbury, N.Y.). La amplificación por PCR de *serp0107* se llevó a cabo como se ha descrito previamente (16) usando los cebadores listados en la tabla 1. La presencia de un solo producto de 581 pb en la electroforesis en gel de agarosa al 1% estaba de acuerdo con una identificación de especie de *S. epidermidis*. Para confirmar la identificación, se llevó a cabo el análisis de RFLP del producto de la PCR del gen *tuf* de *Staphylococcus*, usando el método descrito por Kontos y colaboradores (15). Brevemente, la amplificación por PCR del gen *tuf* dio un amplicón de 370 pb que se confirmó por electroforesis en gel en un gel de agarosa al 2% (15). El producto se extrajo usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN, Valencia, Calif.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se sometió a la digestión con las enzimas de restricción BstZ171, BseNI, y MseI. El o los fragmentos resultantes se resolvieron por electroforesis a través de un gel de agarosa al 3% que contenía bromuro de etidio a 50 V durante 45 min y se visualizó con luz UV.

La digestión del amplicón del gen *tuf* de *S. epidermidis* produce dos fragmentos usando BstZ171 (243 y 127 pb), 3 fragmentos usando BseNI (246, 86 y 38 pb), y sin restricción usando MseI (un solo producto de 370 pb). La presencia de estos fragmentos identificaba positivamente la cepa de *S. epidermidis*. Tanto para la amplificación de *serp0107* como para el análisis por RFLP de *tuf*, las cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 y 9142 servían como controles positivos, mientras que *Staphylococcus haemolyticus* F16942, *S. aureus* 8325, y agua sola, servían como controles negativos. Las cepas ICS de *S. epidermidis* se identificaron cuando (a) el caso cumplía la definición clínica de una CRBSI, (b) los aislados del cultivo de sangre y catéter simultáneos eran ambos identificados positivamente como *S. epidermidis*, y (c) los aislados de la sangre y el catéter tenían patrones de susceptibilidad a antibióticos congruentes. El protocolo del estudio fue aprobado por el panel de revisión institucional de la University of Virginia Health System.

Determinación de la CMI. El ensayo de la concentración mínima inhibidora de NTZ se hizo en placas de poliestireno de microvaloración de 96 pocillos de fondo redondo, estériles (Corning Inc., Corning, N.Y.) por microdilución. También se ensayaron la tizoxanida TIZ (forma desacetilada de NTZ), desnitro-NTZ (TIZ sin el grupo 5-nitro) y amoxanida AMIX (TIZ-etilamina). Las bacterias se cultivaron durante la noche y se suspendieron en TSB de nueva aportación hasta una DO_{600} de 0,01 y se dispensaron 100 μ l en los pocillos, conteniendo el primer pocillo 200 μ l. Se añadieron NTZ y otros antibióticos (control con DMSO) al pocillo uno y se hicieron diluciones seriadas desde 32 μ g/ml. Todos los compuestos se ensayaron por triplicado y las placas se leyeron visualmente o con un lector de placas (Molecular Devices) a las 8, 12 y 24 h. La CMI se determinó como en el primer pocillo en el que no observó crecimiento bacteriano visible respecto a los controles. Los efectos del fármaco en el crecimiento aerobio se determinaron en matraces de 125 ml que contenían 25 ml de medio TSB y después de inoculación (detallada antes), los matraces se pusieron en un agitador giroscópico (200 rpm) a 37°C. Las concentraciones finales de NTZ eran 0, 10 y 25 μ g/ml y se retiraron muestras en intervalos de cada hora y se determinó la absorbancia a 600 nm.

Determinaciones de biopelícula. Las cepas estafilocócicas se cultivaron durante la noche en TSB a 37°C con agitación, se diluyeron en medio de nueva aportación hasta una DO_{600} de 0,01 y se dispensaron 200 μ l en placas de microvaloración de poliestireno, de 96 pocillos de fondo plano, estériles (Costar 3596, Corning Inc.). Se ensayaron la NTZ, TIZ y desnitro-NTZ en diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15, 20 y 25 μ g/ml) con DMSO como control como se describe para el ensayo de la CMI. Cada compuesto y dilución se ensayaron por triplicado. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C en un incubador humidificado, sin agitación y se determinaron tanto el crecimiento como la acumulación de biopelícula a las 16 h.

Después de registrar la turbidez, el medio de cultivo se aspiró y los pocillos se lavaron 3 veces con agua destilada, se secaron sobre toallas de papel secante, y se fijaron con etanol al 75% durante 10 min.

Para visualizar el material de biopelícula se añadió cristal violeta al 0,5% a cada pocillo y después de 5 min se retiró y los pocillos se lavaron 3 veces con agua destilada. Las placas se leyeron usando un lector de microplaca a una longitud de onda de 570 nm. Después se extrajo el colorante por adición de 200 μ l de etanol al 95%, y la absorbancia se leyó de nuevo a 570 nm. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se determinaron la media y la desviación típica. En general, el cristal violeta solubilizado en etanol era más fiable y se informa siempre de estas determinaciones.

Modelo de adherencia al catéter. Se usó un cultivo de una noche de *S. epidermidis* 9142 para inocular medio TSB de nueva aportación hasta una DO_{600} final de 0,01, en un volumen de 3 ml en tubos de 15 ml con tapón de rosca. Láminas estériles de poliuretano se dividieron en trozos de 1 cm cuadrado y se pusieron en tubos que contenían diferentes concentraciones de NTZ o controles que contenían DMSO. Los tubos se incubaron durante 24 h con agitación. Cada parte de catéter se lavó 3 veces con PBS estéril, se suspendió en 4 ml de PBS estéril y se trató con ultrasonidos durante 10 min en un baño de agua con ultrasonidos. Se diluyeron 10 μ l del fluido tratado con ultrasonidos en PBS de nueva aportación y se cultivaron en placa sobre placas TSA y se incubaron a 37°C durante la noche. Se contaron las bacterias (placas por triplicado) y se determinaron la media y la desviación típica y se dieron como UFC/ml. Los efectos de viabilidad se corrigieron cultivando en placa los líquidos sobrenadantes del experimento de 3 ml para los recuentos de bacterias totales.

Efecto de NTZ en la dispersión de biopelícula. El efecto de NTZ en la acumulación de biopelícula o dispersión de biopelículas existentes se determinó en placas de microvaloración en las que se dejó crecer *S. epidermidis* 9142

durante 8 h antes del tratamiento con fármaco. En este experimento se inocularon placas de fondo plano por duplicado con 200 μ l de una suspensión bacteriana en TSB de nueva aportación hasta una DO_{600} de 0,01 y se incubaron estáticamente a 37°C. Tres filas de cada placa no contenían fármaco, mientras que las siguientes filas contenían NTZ (2,5, 5, 10 y 15 μ g/ml). A las 8 h, se reveló una placa para la determinación de biopelícula como se ha descrito antes, mientras que el medio en la placa duplicada se aspiró y se sustituyó por TSB de nueva aportación, conteniendo ahora las primeras 3 filas NTZ 5, 10 y 15 μ g/ml y para el resto de los pocillos, la misma concentración de NTZ. Estas placas se revelaron a las 24 h y se comparó la cantidad relativa de biopelícula para cada conjunto.

Ensayo de adherencia directa. Para determinar si la NTZ inhibía directamente la adherencia de las bacterias a plástico, se añadió una suspensión de DO_{600} de 0,01 de la cepa de *S. epidermidis* 9142 en medio TSB complementado con glucosa al 0,5%, a placas de microvaloración de poliestireno de 6 pocillos (Nulcon, Nunc AIS. Dinamarca). Después de una hora de incubación a 37°C, las placas se lavaron con 5x 5 ml de PBS para separar las bacterias no adherentes y las bacterias adherentes se visualizaron con microscopio con un Zeiss Axiovert 200. El número de bacterias adherentes por campo se determinó usando el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Betesda, Md.) y se compararon la media y la desviación típica para 3 pocillos y se compararon múltiples campos entre suspensiones tratadas con NTZ y no tratadas, y el experimento se repitió 3 veces.

Efecto del zinc en la acción de la NTZ. Para evaluar si el $ZnCl_2$ podía superar la acción inhibitoria de NTZ en la producción de biopelículas, se establecieron ensayos de biopelícula convencionales con una concentración de NTZ de 12,5 μ g/ml, que es suficiente para eliminar la formación de biopelícula por la cepa de *S. epidermidis* 9142 ($\sim 2 \times CI_{50}$). Se hicieron diluciones seriadas de una solución de $ZnCl_2$ 10 μ M en pocillos que contenían NTZ (por triplicado) y se evaluó la producción de biopelícula a las 24 h con cristal violeta. Como control se añadió $ZnCl_2$ a bacterias no tratadas. Los controles adicionales incluían el ensayo de $CaCl_2$ y $MgCl_2$ 10 μ M en el mismo formato. El efecto inhibitorio de EDTA en la producción de biopelícula y su reversibilidad por Zn^{2+} también se evaluó como se ha descrito para la NTZ. El efecto del Zn^{2+} en la CMI de NTZ y AMIX se evaluó por microdilución en TSB a una concentración fija de Zn^{2+} de 20 μ M (por triplicado).

Ensayo espectrofotométrico de quelación. Para ensayar la unión directa del Zn^{2+} por la NTZ en solución, los autores de la invención ensayaron un intervalo de concentraciones tanto para NTZ como TIZ e hicieron un barrido espectrofotométrico de las soluciones usando OLIS Cary-14 (OLIS Instruments Co., Bogart Ga.). Los espectros absolutos se registraron en un intervalo de UV/Vis de 220 nm a 700 nm. Los desplazamientos espectrales en el intervalo de 418 nm serían atribuibles a cambios en la resonancia dentro del anillo de tiazol que se producirían si el Zn^{2+} se coordinara con la NTZ (9).

RMN 1H . Los experimentos de quelación también se llevaron a cabo usando NTZ y TIZ en DMSO- d_6 (0,5 ml) con $ZnCl_2$ usando un espectrómetro de 300 MHz Varian MercuryPlus. Específicamente, se investigaron tres proporciones de NTZ a Zn^{2+} (1:1, 1:2, 2:1) donde la NTZ se mantuvo constante (4 mg, 13 μ mol) mientras que se varió el $ZnCl_2$ (1,8 mg, 13 μ mol o 3,5 mg, 26 μ mol) o NTZ (8 mg, 26 μ mol) con $ZnCl_2$ (1,8 mg, 13 μ mol). También se investigaron 3 proporciones de TIZ a Zn^{2+} (1:1, 1:2, 2:1) donde la TIZ se mantuvo constante (4 mg, 15 μ mol) mientras que se varió el $ZnCl_2$ (2,1 mg, 15 μ mol o 4,1 mg, 30 μ mol) o TIZ (8 mg, 30 μ mol) con $ZnCl_2$ (2,1 mg, 15 μ mol). Después se obtuvieron los espectros de RMN de 1H tras mezclar durante 5 min, 24 h, 48 h y 72 h a temperatura ambiente. Cualquier suceso de quelación se pondría de manifiesto por desplazamiento o ensanchamiento de los protones del tiazol y benceno así como la pérdida del protón de amida.

Tabla 1. Cepas y cebadores usados en este estudio

Cepa o cebador	Genotipo/fenotipo ^a	Referencia o fuente
Cepas		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
9142	Cepa productora de PIA natural	(19)
CAV1005	Aislado clínico de endocarditis de válvula natural	(35)
5179	Aislado de infección por derivación CSF; cepa negativa para biopelícula y PNAG; <i>icaA</i> ::IS257	(30)
5179-R1	Revertiente 5179 que produce una biopelícula proteínica que depende de la isoforma de 140 kDa de Aap; PNAG negativa; <i>icaA</i> ::IS257	(30)
ICS1	CRBSI	Este estudio
ICS2	CRBSI	Este estudio
ICS3	CRBSI	Este estudio
ICS4	CRBSI	Este estudio
ICSS1	CRBSI	Este estudio
<i>Staphylococcus aureus</i>		
NCTC 8325	Cepa de referencia	(12)
<i>Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus</i>		
F13532	Aislado de cultivo de sangre	(2)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		
S33208	Aislado de cultivo de sangre	Este estudio
Cebador (5' → 3')		
<i>serp0107</i>		
Serp0107F		(16)
Serp0107R		(16)
<i>tuf</i>		
TStaG422		(21)
TStag765		(21)

^aCRBSI, infección de la circulación sanguínea relacionada con catéter; I, inosina.

Resultados

- 5 Ensayo de CMI de cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. El efecto inhibitorio de NTZ en cepas estafilocócicas se investigó primero determinando la CMI. Los presentes estudios muestran de forma inesperada que la mayoría de las cepas ensayadas eran susceptibles a NTZ y TIZ con un intervalo de CMI de 8-16 µg/ml, indicando que estas cepas en general son más susceptibles a este fármaco de lo que se había descrito previamente (6). A diferencia de los estudios previos donde el fármaco solo era activo en condiciones anaerobias (6), la NTZ inhibía el crecimiento de *S. epidermidis* en cultivo líquido con aireación enérgica de una forma dependiente de la dosis con inhibición significativa con 25 µg/ml (véase la figura 1). Con concentraciones de fármaco menores (10 µg/ml), había poco efecto en las velocidades de crecimiento exponencial. En condiciones de crecimiento estáticas (microaerobias), se eliminó completamente la acumulación de biopelícula en el fondo de los matraces con 15 µg/ml de NTZ, aunque la
- 10

turbidez bacteriana final no cambiaba frente a los controles sin fármaco (no se presentan los datos).

La NTZ inhibe la producción de biopelícula a niveles inferiores a la CMI. Para explorar los efectos del fármaco por debajo de la CMI en la acumulación de biopelícula, los autores de la invención cribaron varias especies de CoNS según la producción de biopelícula. Como se ve en la figura 2, la NTZ inhibió la producción de biopelícula por la cepa de *S. epidermidis* 9142 de una forma dependiente de la dosis, determinado por tinción con cristal violeta. El crecimiento bacteriano no era afectado de forma apreciable con concentraciones de NTZ inferiores a 16 µg/ml. Se determinó que la CI₅₀ para la cepa 9142 y para la cepa 33208 de *S. haemolyticus* era 2,5 µg/ml (~8 µM). Aunque no se representa, la forma desacetilada de NTZ (TIZ) dio resultados equivalentes, mientras que la forma desnitró del fármaco no inhibía la producción de biopelícula y presentaba una CMI >32 µg/ml (datos no presentados).

Cribado de la actividad de NTZ contra cepas de *S. epidermidis*. Para determinar si la actividad antipelícula de NTZ por debajo de la CMI era más generalizada, los autores de la invención cribaron una serie de aislados clínicos de *S. epidermidis*, obtenidos de pacientes con CRBSI. La NTZ inhibía la formación de biopelícula de todos los aislados clínicos que producían biopelícula en ausencia del fármaco, de una forma dependiente de la dosis (figura 2A). Además, NTZ inhibía la formación de biopelícula por la cepa de *S. epidermidis* 5179-R1 (véase la figura 2B), que genera una biopelícula rica en proteínas, independiente de PNAG, que depende de la producción de un derivado proteolíticamente procesado derivado de la proteína Aap (30). Para todas las cepas ensayadas, la CI₅₀ estaba en el intervalo entre 2,5 y 5 µg/ml. Aunque estos resultados sugieren que las proteínas Ica pueden no ser el objetivo de la acción de NTZ, no se puede descartar inequívocamente esto, puesto que la cepa con mutante de *icaA* original 5179 era negativa para biopelícula y producía la proteína Aap (30).

La NTZ inhibe la adherencia bacteriana a catéteres. Varios estudios han indicado que la adherencia bacteriana y acumulación de biopelícula son actividades distintas pero interrelacionadas (7). Para ensayar si NTZ interfería con la adherencia, se puntuaron las cepas productoras de biopelícula de *S. epidermidis* según la adherencia a cuadrados de plástico obtenidos de material de catéter en presencia o ausencia de NTZ. Como se ve en la figura 3A, la NTZ inhibía la adherencia de la cepa de *S. epidermidis* 9142 de una forma dependiente de la dosis y dentro del intervalo de concentración de CI₅₀. Puesto que la adherencia a trozos de catéter se llevó a cabo a lo largo de un periodo de 24 h, después los autores de la invención examinaron la adherencia primaria después de 1 h de incubación con recuento directo con microscopio de las bacterias adherentes. Como puede verse en la figura 3B, la NTZ inhibía la adherencia primaria a plástico en 80% con 12,5 µg/ml. La aparente acción rápida de la NTZ puede sugerir un mecanismo por el cual el fármaco interfiere con la función de estructuras existentes en la superficie que median la adherencia primaria más que inhibir la producción de moléculas recién sintetizadas.

Para ensayar esta posibilidad se determinaron las eficacias de adherencia primarias para la cepa de *S. epidermidis* 9142 cultivada en caldo TSB durante la noche en presencia o ausencia de 15 µg/ml de NTZ en condiciones de crecimiento aerobias o estáticas. La turbidez final era equivalente para todos los cultivos, pero los cultivos estáticos + NTZ y los cultivos aerobios no contenían prueba visible de la acumulación de biopelícula. Después se ensayó en las suspensiones de PBS de estas bacterias la adherencia primaria a 4 y 37°C. Las bacterias cultivadas de forma aerobia eran mucho menos eficaces en la adherencia al plástico que las bacterias cultivadas estáticamente y en cada una de las condiciones; el crecimiento en presencia de NTZ no mostró efecto inhibitorio. Estos estudios sugieren que en condiciones permisivas para biopelícula, la NTZ no interfiere con la síntesis o función de las adhesinas de superficie. Sin embargo, parece que niveles por debajo de la CMI afectan a la capacidad de las bacterias cultivadas de forma aerobia para la transición a un fenotipo más adherente y capaz de biopelícula.

¿Afecta NTZ a la producción de biopelícula por bacterias colonizadas? Los autores de la invención después investigaron si la NTZ era inhibitoria de la producción de biopelícula por comunidades de *S. epidermidis* establecidas. Suponiendo que la NTZ es un inhibidor específico de adherencia, el fármaco no debería afectar a la deposición adicional de biopelícula de comunidades establecidas. Para ensayar esta hipótesis, se permitió que bacterias *S. epidermidis* establecieran biopelícula en ausencia de fármaco durante 4 h, y después de lavado para separar las bacterias no adherentes, se añadió NTZ (intervalo de concentraciones) en medio TSB de nueva aportación durante 12 h adicionales. Como puede verse en la figura 4, la biopelícula producida a las 4 h era de aproximadamente 0,5 unidades de absorbancia por el ensayo de cristal violeta, y al final del ensayo, la biopelícula acumulada había aumentado a 3 unidades de absorbancia en el pocillo no tratado con fármaco. Aunque la biopelícula también aumentó en los pocillos tratados con NTZ, hubo un efecto dependiente del fármaco en la acumulación de material de biopelícula adicional. Sin embargo, el tratamiento con fármaco no eliminó la biopelícula previamente formada, indicando que la NTZ no era dispersiva.

Inversión de la inhibición de NTZ por zinc. Las proteínas de superficie Aap de *S. epidermidis* y SasG de *S. aureus* median la adherencia a superficies y queladores de metales como el EDTA pueden inhibir la adherencia (13, 4). Estudios de Conrady et al (4) han mostrado que estas proteínas de superficie estafilocócicas contienen repeticiones del dominio G5 que median la acumulación asociativa de bacterias sobre superficies de una forma dependiente de Zn²⁺. Estos dominios unen Zn²⁺, que se supone que permiten interacciones de proteínas de cremallera de Zn²⁺ para entrelazar cintas de proteína en agregados bacterianos adherentes en superficies. Para ensayar si la NTZ afecta a la quelación de metales por los dominios G5 de proteínas Aap de *S. epidermidis*, se añadieron concentraciones crecientes de Zn²⁺ a los ensayos de biopelícula para ver si podía invertirse la inhibición de NTZ. Como puede verse en la figura 6, la adición de Zn²⁺ condujo a aumentos equivalentes en la acumulación de biopelícula; resultados que

eran similares si se usaba EDTA en lugar de NTZ (no se muestran los datos). Los efectos de Zn^{2+} eran específicos, ya que la adición de otros metales (calcio y magnesio) no invertían la inhibición. Mientras que parece que la NTZ logra el mismo fenotipo que el tratamiento con EDTA, no se podía distinguir entre NTZ actuando directamente como un quelador de Zn^{2+} o si NTZ se une a dominios G5.

5 Para ensayar si la NTZ desplazaba al Zn^{2+} , bacterias de cultivos de una noche en presencia de 15 $\mu\text{g/ml}$ de NTZ se lavaron y se trataron con un intervalo de concentraciones de Zn^{2+} en un ensayo de adherencia de adición-adición de nuevo. La adición de Zn^{2+} hasta 20 μM no mejoró la eficacia de la adherencia bacteriana al plástico, que ya era eficaz como se ha indicado antes. Debe indicarse aquí que la adherencia primaria de bacterias al plástico también puede implicar adhesinas que no requieren Zn^{2+} , de modo que un resultado negativo no excluye necesariamente la posibilidad de que la NTZ afecte a la función de Aap.

10 Quelación del Zn^{2+} por NTZ. Para abordar si el Zn^{2+} es quelado directamente por la NTZ, se hizo un barrido de complejos de coordinación de NTZ- Zn^{2+} putativos para ver cualquier cambio espectral que pudiera ser resultado de los cambios en la resonancia del anillo debido al ligando unido. Basándose en estudios de RMN, la forma aniónica de la NTZ existe en varios estados de resonancia que existen simultáneamente para el resto de amino-tiazol que contribuyen al máximo de absorción a 418 nm (9). Se predice que la coordinación del metal alteraría la resonancia y esto se pondría de manifiesto en un desplazamiento espectral. Los barridos espectrales realizados con diferentes concentraciones de NTZ y TIZ con Zn^{2+} no pusieron de manifiesto ningún cambio en el espectro de absorción (datos no presentados). Para explorar más las interacciones de NTZ y metal, se analizaron complejos putativos de NTZ y TIZ con Zn^{2+} por espectroscopía de RMN de ^1H en DMSO- d_6 . No era evidente la quelación con $ZnCl_2$ para ninguna de las relaciones ensayadas incluso después del tiempo de medición de 72 h. Todos los espectros permanecían idénticos y sin cambiar a lo largo del curso del experimento. La tizoxanida tampoco presentaba quelación con $ZnCl_2$ en las condiciones experimentales. Considerados juntos, estos estudios indicaban que estos fármacos no formaban quelato con el zinc en estas condiciones de ensayo.

25 Efectos de hidrofobicidad. La NTZ es hidrófoba y poco soluble en agua y su forma desacetilada (TIZ) está unida a proteínas plasmáticas en 97,5% (33). Por lo tanto, es posible que la acción del fármaco no sea específica y sea resultado de la unión a proteínas de superficie y anulación de su acción. Para ensayar esta posibilidad, se sintetizó un derivado de NTZ (AMIX) más soluble añadiendo un grupo R etilamina al anillo de benceno de la TIZ. El fármaco retenía bioactividad con una CMI de 16-32 $\mu\text{g/ml}$. Este derivado era soluble en 0,4 mg/ml en agua (NTZ < 32 $\mu\text{g/ml}$) y como puede verse en la figura 6 presentaba una CI_{50} ligeramente mayor que la NTZ (8 frente a 4 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). La diferencia de 2 veces en la inhibición de biopelícula era menor que la diferencia de 15 veces en la solubilidad y en ambos casos, el zinc invertía la inhibición. Considerados juntos, estos estudios sugieren que lo más probable es que la acción de la NTZ en el bloqueo de la adherencia primaria sea específica.

30 El Zn^{2+} no invierte la CMI de NTZ o AMIX. Para ensayar si la acción del Zn^{2+} en la anulación de biopelícula por la NTZ puede ser resultado de la inversión del efecto inhibitor del crecimiento, se repitieron los ensayos de CMI en presencia de una concentración fija de zinc (20 μM). Se llevaron a cabo dos experimentos independientes y se leyeron tanto a las 8 como a las 24 h después de inoculación.

35 Como puede verse en la figura 7, el Zn^{2+} no tenía efecto en la acción inhibitor de NTZ o AMIX a las 8 h. Se observó algo de avance del crecimiento a las 24 h en los pocillos de NTZ más Zn^{2+} sugiriendo efectos ligeramente beneficiosos, debidos quizás a la deposición de biopelícula en estas condiciones de ensayo. El crecimiento de *S. epidermidis* en presencia de NTZ previene la producción de biopelícula en el caldo. Estas bacterias no se agregan o acumulan en las superficies y se puede predecir que si la NTZ eliminaba el zinc de las proteínas Aap, entonces la adición de nuevo de zinc debería restablecer la acumulación sobre las superficies y agregación en líquido. La adición de nuevo de Zinc a estas bacterias no restablecía el fenotipo de biopelícula, sugiriendo que la proteína Aap debe estar ausente de la superficie de *S. epidermidis*. Por lo tanto es probable que la NTZ inhiba la expresión del gen de aap o altere el ensamblaje de la proteína en la superficie bacteriana. Igualmente, la NTZ también debe anular la expresión de genes *ica* que codifican el polisacárido PIA.

Discusión

Se describe en la presente memoria que el fármaco antiparasitario nitazoxanida y su metabolito activo la tizoxanida son inhibidores del crecimiento in vitro de diferentes especies estafilocócicas, incluyendo las cepas MRSA de *S. aureus* (CMI = 8-16 $\mu\text{g/ml}$). Esto contrasta con un descubrimiento anterior de Dubreuil et al. (6), que describieron que la tizoxanida no era activa, mientras que la NTZ era solo inhibitor del crecimiento de cepas de *S. aureus* en condiciones de crecimiento anaerobias. Se describe en la presente memoria el resultado inesperado de que la NTZ inhibía el crecimiento de la cepa de *S. epidermidis* 9142 en cultivos de caldo muy aireados con 25 $\mu\text{g/ml}$. Los autores de la presente invención también han encontrado que no hay diferencia en la acción inhibitor entre la NTZ y el metabolito activo TIZ por microdilución en cultivos con agitación o estáticos. Los presentes estudios demuestran además que en concentraciones inferiores a la CMI (2-8 $\mu\text{g/ml}$), NTZ y TIZ inhibían la producción de biopelícula en un ensayo de placa de microvaloración estático. Aunque la inhibición del crecimiento contribuye a la inhibición de biopelícula, en general los efectos se ponen de manifiesto con concentraciones de fármaco mayores de 16 $\mu\text{g/ml}$. La actividad antibiopelícula de la NTZ se podía invertir mediante zinc de 10 a 20 μM , pero no mediante concentraciones similares de Ca^{2+} o Mg^{2+} . Los datos descritos en la presente memoria sugieren que la NTZ

probablemente afecta a un solo objetivo esencial que con altas concentraciones de fármaco inhibe el crecimiento y con bajas concentraciones elimina la producción de biopelícula.

Los autores de la invención determinaron además que la NTZ inhibe la adherencia primaria de la cepa de *S. epidermidis* 9142 cultivada en condiciones aerobias a superficies en el espacio de 1 h de una forma dependiente de la concentración. Sin embargo, la NTZ no tenía efecto en la adherencia primaria por bacterias cultivadas en condiciones estáticas, incluso aunque se anulaba la producción de biopelícula. En el caso anterior, se especuló que las bacterias planctónicas cultivadas de forma aerobia no pueden producir adhesinas de forma apreciable como se indicaba por la eficacia mucho menor para la adherencia primaria. En estas condiciones, la NTZ afecta a la capacidad de esas bacterias a adherirse o producir biopelícula en condiciones microaerobias que promueven la biopelícula. Este último mecanismo puede ser invertido por el Zn^{2+} . En el caso de la biopelícula previamente formada como se ha indicado en el experimento de dispersión, la adición de NTZ anula la acumulación adicional de una forma dependiente de la dosis. Considerados juntos, los estudios de los autores de la invención sugieren que es probable que la NTZ afecte al proceso de acumulación que incluye la elaboración de PNAG (PIA).

Sin querer estar ligados por ninguna teoría particular, un candidato probable para la acción de la NTZ es la proteína de adhesión asociativa dependiente de zinc (Aap) que se ha estudiado ampliamente y se ha demostrado recientemente que media la adherencia primaria de *S. epidermidis* a superficies (4). Es importante que los monómeros de proteína Aap purificados se asociaban en agregados en presencia de Zn^{2+} y esta asociación era mediada por dominios G5 (4). La acción de la NTZ no parecía que fuera resultado de la quelación directa de zinc, como es el caso de la acción anti-biopelícula del EDTA y otros queladores de metales o por pH bajo (13, 4). Tanto la CI_{50} para la actividad antibiopelícula de NTZ ($\sim 8 \mu M$) como la CI_{50} para la inversión por el Zn^{2+} de esta inhibición ($5 \mu M$) apoyan un modelo de competición por la unión a dominios de cremallera de zinc G5 de proteínas Aap (4). Alternativamente, se podía obtener un fenotipo similar si la NTZ se unía no específicamente a proteínas de superficie, polisacáridos o ácidos teicoicos por interacciones hidrófobas o iónicas o incluso afectando a un regulador global (37). Para abordar las interacciones hidrófobas, se sintetizó una variante hidrófila de NTZ (AMIX) que era ~ 15 veces más soluble en agua que la NTZ, pero tenía una potencia antibiopelícula 2 veces menor. A pesar de la prueba circunstancial que apoya la Aap como el objetivo del fármaco, debe observarse a partir de estudios previos, que niveles inferiores a la CMI de NTZ también inhiben aparentemente la secreción de la citotoxina VacA por *H. pylori* por un mecanismo que no implica la inhibición de la síntesis de proteínas (36). Desgraciadamente, la mayor parte de las entidades químicas descritas como agentes antibiopelícula no son específicos y a menudo afectan tanto a las bacterias Gram positivas como negativas (10). Serán necesarios estudios mecanísticos adicionales con el fin de validar la Aap como la diana de NTZ.

Lo más probable es que el anión de NTZ sea la forma activa que inhibe el crecimiento y la producción de biopelícula de *S. epidermidis*, pero parece que no promueve la quelación de Zn^{2+} . Puesto que el pKa para NTZ es 6,2 (9), puede ser difícil probar el punto, puesto que condiciones ácidas también inhiben la formación de biopelícula, probablemente por la eliminación de Zn^{2+} de los dominios G5 de Aap (4). El grupo 5-nitro es necesario para producir la resonancia en el anillo de tiazol y, por lo tanto, el derivado desnitro no presenta actividad antibiopelícula. La idea de que NTZ puede afectar al ensamblado de las proteínas de superficie está apoyada por los descubrimientos recientes de que la NTZ elimina el ensamblado de las adhesinas fimbriales (AafA y tipo I) en *E. coli* (texto enviado a AAC).

Se ha visto que el revestimiento de catéteres con agentes antimicrobianos retrasa o previene la colonización microbiana y prolonga su vida útil (1, 3, 13, 20). En experimentos de catéteres simulados, se mostró que la NTZ bloqueaba la adherencia de bacterias a las superficies de catéteres, pero no presentaba actividad de dispersión contra el material de biopelícula existente. Sin embargo, la adición de fármaco a biopelículas establecidas prevenía la acumulación adicional, lo cual puede tener potencial para aplicaciones sistémicas. Aunque la NTZ tiene propiedades farmacofóricas malas, es probable que derivados menos hidrófobos, tales como AMIX, puedan demostrar ser más eficaces en el tratamiento de infecciones sistémicas. La AMIX es menos tóxica (que NTZ) para estafilococos por ensayo de la CMI y retiene la actividad antibiopelícula. Hay estudios en curso para evaluar el potencial anticolonización de esta clase de productos terapéuticos contra cepas de *S. epidermidis* y *S. aureus* y se continúan desarrollando derivados más potentes.

La adherencia primaria de microorganismos a superficies es una primera etapa esencial en el proceso de infección. El dirigirse a la función de estos determinantes de virulencia puede proporcionar una estrategia adicional para limitar o reducir la gravedad de infecciones. Los descubrimientos de los autores de la invención extienden las observaciones previas de Dubreuil et al., demostrando que la NTZ y TIZ son más potentes contra especies estafilocócicas incluyendo cepas MRSA en condiciones aerobias así como microaerobias de lo que se había considerado previamente (6). Además, niveles inferiores a la CMI de estos fármacos son inhibidores activos de la producción de biopelícula estafilocócica y acumulación sobre superficies. Aunque la capacidad para eliminar la acción inhibitoria de la NTZ por adición de concentraciones estequiométricas de sales de Zn^{2+} implica proteínas Aap como objetivos putativos, serán necesarios estudios mecanísticos adicionales para validar este objetivo.

Puesto que los dominios G5 se encuentran en otras proteínas de superficie, incluyendo SasG en *S. aureus* (5), quizás estos compuestos presentarán un efecto más amplio contra otros patógenos.

Bibliografía - Ejemplo 1 -

1. Aslam S., B. W. Trautner, V. Ramanathan, and R. O. Darouiche. 2007. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:1556-1558.
2. Begun, J., J. M. Gaiani, H. Rohde, D. Mack, S. B. Calderwood, F. M. Ausubel, and C. D. Sifri. 2007. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog.* 3:e57
3. Cerca, N., S. Martins, S. Sillankorva, K. K. Jefferson, G. B. Pier, R. Oliverira and J. Azeredo. 2005. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms.
4. Conrady DG, Brescia CC, Horii K, Weiss AA, Hassett DJ, Herr AB 2008. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:19456-1961.
5. Corrigan, R. M., D. Rigby, P. Handley, and T. J. Foster. 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiol.* 153:2435-2446.
6. Dubreuil, L., I. Houcke, Y. Mouton, J. F. Rossignol. 1996. In vitro evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 40:2266-2270.
7. Heilmann C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Gotz. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 20: 1083–1091.
8. Hemphill, A., J. Mueller, and M. Esposito. 2006. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolidine anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opin Pharmacother.* 7:953-964.
9. Hoffman, P. S., G. Sisson, M. A. Croxen, K. Welch, W. D. Harman, N. Cremades, and M. G. Morash. 2007. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the

- pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:868-876.
10. Huigens, R. W. III, S. A. Rogers, A. T. Steinhauer and C. Melander. 2009. Inhibition of *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with a class of TAGE-triazole conjugates. *Org. Biomol. Chem.* 7:794-802.
 11. Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington, G. Peters. 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* 65:519-524.
 12. Landolo, J. J. 2000. Genetic and physical map of the chromosome of *Staphylococcus aureus* 8325, p. 317-325. In V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. A. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*. ASM Press, Washington, D.C. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8677-8682.
 13. Juda, M., K. Paprota, D. Jałozza, A. Malm, P. Rybojad, K. Goździuk. 2008. EDTA as a potential agent preventing formation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on polychloride vinyl biomaterials. *Ann Agric Environ Med* 15:237-241.
 14. Klevens, R. M., J. R. Edwards, C. L. Richards Jr, T. C. Horan, R. P. Gaynes, D. A. Pollock, and D. M. Cardo. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Reports (NNIS)*, 122:160-166.
 15. Kontos, F., E. Pctinaki, I. Spiliopoulou, M. Maniati, and A. N. Maniatis. 2003. Evaluation of a novel method based on PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *tuf* gene for the identification of *Staphylococcus* species. *J Microbial Methods* 55:465-469.
 16. Liu, D., E. Swiatlo, F. W. Austin, and M. L. Lawrence. 2006. Use of a putative transcriptional regulator gene as target for specific identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Lett Appl Micro* 43:325-330.
 17. Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178:175-183.

18. Mack D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and R. Laufs 1994 Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* 62: 3244–3253.
19. Mack, D., N. Siemssen, and R. Laufs 1992 Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* 60: 2048–2057.
20. Maki, D. G. , S. M. Stolz, S. Wheeler, and L. A. Mermel. 1997. Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 127:257-266.
21. Martineau, F, F. J. Picard, D. Ke, S. Paradis, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron . 2001. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol.* 39:2541-2547.
22. McVay, C. S., and R. D. Rolfe. 2000. In vitro and in vivo activities of nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:2254-2258.
23. Mermel, L. A. 2000. Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med* 132:391-402.
24. Müller, J., D. Sidler, U. Nachbur, J. Wastling, T. Brunner, and A. Hemphill. 2008. Thiazolides inhibit growth and induce glutathione-S-transferase Pi (GSTP1)-dependent cell death in human colon cancer cells. *Int J Cancer.* 123:1797-1806.
25. Müller, J., J. Wastling, S. Sanderson, N. Müller, A. Hemphill. 2007. A novel *Giardia lamblia* nitroreductase, GINR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:1979-1986.
26. Musher, D. M., N. Logan, A. M. Bressler, D. P. Johnson, J. F. Rossignol. 2009. Nitazoxanide versus vancomycin in *Clostridium difficile* infection: A randomized, double-blind study. *Clin Infect Dis.* 48:41-46.

27. National Nosocomial Infections Surveillance. 2004. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control* 32:470-485.
28. Pankuch, G. A., and P. C. Appelbaum. 2006. Activities of tizoxanide and nitazoxanide compared to those of five other thiazolides and three other agents against anaerobic species. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:1112-1117.
29. Parsek MR and PK Singh. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Ann Rev Microbiol* (2003) 57:677-701.
30. Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, and D. Mack. 2005. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* 55:1883-1895.
31. Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, and D. Mack. 1999. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect. Immun.* 67:2656-2659.
32. Sisson, G., A. Goodwin, A. Raudonikienė, N. J. Hughes, A. K. Mukhopadhyay, D. E. Berg, and P. S. Hoffman. 2002. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:2116-23.
33. Stockis, A., X. Deroubaix, R. Lins, B. Jeanbaptiste, P. Calderon, and J. F. Rossignol. 1996. Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 34:349-351.
34. von Eiff, C., G. Peters, and C. Heilmann. 2002. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis.* 2:677-685.
35. Winchester, D. E., M. J. Lipinski, M. E. Cupp, and C. D. Sifri. 2008. *Am J Med.* 121:855-857.
36. Yamamoto, Y., A. Hakki, H. Friedman, S. Okubo, T. Shimamura, P. S. Hoffman, and J. F. Rossignol. 1999. Nitazoxanide, a nitrothiazolide antiparasitic drug,

is an anti-*Helicobacter pylori* agent with anti-vacuolating toxin activity. *Chemother.* 45:303-312.

37. Yang, L., M. T. Rybtke, T. H. Jakobsen, M. Hentzer, T. Bjarnsholt, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen. 2009. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2432-2443.

38. Vuong, C., and M. Otto. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 4:481-489.

Ejemplo 2 - biopelículas: La nitazoxanida inhibe la producción de biopelícula y la hemaglutinación por cepas de *Escherichia coli* enteroagregativas por bloqueo del ensamblado de fimbrias AafA

5 Los autores de la invención investigaron aquí si el fármaco antiparasitario y antidiarreico de amplio espectro nitazoxanida (NTZ) puede ser eficaz contra EAEC in vitro. Mientras que las cepas de *E. coli* eran resistentes a la NTZ en medio LB rico (CMI >64 µg/ml), el fármaco era ligeramente inhibidor en un medio mínimo complementado con glucosa (medio MinA-G, CMI ~32 µg/ml). La NTZ también inhibía la producción de biopelícula por la cepa EAEC 042 tanto en medio DMEM como MinA-G con una Cl_{50} ~12 µg/ml. La inmunofluorescencia e inmunotransferencia con anticuerpo contra AafA de la subunidad fimbrial mayor AAF/II, establecieron que los filamentos AAF/II se reducían espectacularmente en bacterias cultivadas en presencia de NTZ. La qRT-PCR comparativa y fusiones de genes indicadores (*aafA:phoA*) indicaban que la expresión de *aafA* no era afectada por la NTZ, mientras que los niveles de transcritos de *aggR* y la expresión de *aggR:lacZ* aumentaban ~10 y 2,5 veces, respectivamente frente a los controles no tratados. De forma más general, la NTZ inhibía la hemaglutinación (HA) de los glóbulos rojos por la cepa no productora de película JM221 que expresaba fimbrias AAF/I o de tipo I. Estos descubrimientos sugieren que la acción inhibidora de NTZ en la formación de biopelícula y en la HA se debe probablemente a la inhibición del ensamblado de fimbrias.

20 La nitazoxanida muestra un amplio espectro de actividad in vitro contra bacterias anaerobias incluyendo *Clostridium difficile* y miembros de la proteobacterias épsilon incluyendo *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni* (16, 38). En estos organismos, la NTZ es un potente inhibidor de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (16, 38). La naturaleza aniónica de la forma activa de la NTZ y su capacidad para abstraer protones de reacciones enzimáticas puede explicar una amplia variedad de reacciones que se han descrito para este compuesto terapéutico y puede explicar la mejora no específica de la diarrea crónica en seres humanos (43).

25 En estudios previos dirigidos a evaluar la frecuencia de mutaciones de NTZ para *E. coli* en un ensayo de tipo papilación (inversiones LacZ) en el que MinA era el medio basal, se observó que concentraciones de NTZ mayores de 15 µg/ml eran inhibitoras del crecimiento (38). En cambio, no se observó acción inhibidora en medio LB rico en nutrientes (CMI > 64 µg/ml), sugiriendo que NTZ afectaba a algunas rutas biosintéticas esenciales condicionalmente. Dados los informes puntuales de que NTZ es un fármaco antidiarreico no específico, se consideró la posibilidad de que el fármaco pudiera afectar a la competencia de patógenos entéricos, de forma muy similar a cómo la profilaxis con subsalicilato de bismuto protege de la diarrea del viajero (6). Los autores de la invención investigaron el efecto de NTZ en la cepa de EAEC 042 que se usa a menudo como un sistema modelo para el estudio de la producción de biopelícula.

35 Se describe en la presente memoria el resultado inesperado de que la NTZ inhibe la producción de biopelícula y la hemaglutinación con concentraciones de fármaco que no inhiben el crecimiento de forma apreciable. Además, los estudios ponen de manifiesto que la base para esta inhibición se debe a la inhibición de la formación de filamentos fimbriales y no a la regulación de la expresión del gen *aafA*. Por lo tanto, la NTZ, mediante el bloqueo del comportamiento agregativo de EAEC, puede tener eficacia en el tratamiento de enfermedades diarreicas entéricas.

Materiales y métodos

40 Cepas bacterianas y medio de cultivo. Las cepas de *E. coli* enteroagregativas 042, 17-2 y JM221 se obtuvieron de las colecciones del Centro para el desarrollo de Vacunas, Facultad de Medicina de la Universidad de Maryland. Las cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) o un medio MinA definido químicamente modificado (MinA-G) que contenía por litro: glucosa al 1%, $MgSO_4$ 1 mM, 1 g de $(NH_2)_2SO_4$, 4,5 g de KH_2PO_4 , 10,5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de citrato sódico.

45 Efecto de NTZ en el crecimiento y motilidad bacterianas. Se cultivaron cepas de EAEC durante la noche en medio MinA-G a 37°C con agitación y se usaron para inocular medio MinA-G de nueva aportación que contenía un intervalo de concentraciones de NTZ (0, 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml) a una DO_{600} inicial de 0,1. Se registró el crecimiento como la

absorbancia a 600 nm a intervalos de 30 min a lo largo de un periodo de 8 horas. El ensayo de la CMI de todas las cepas se hizo por microdilución en medio MinA-G (de 0 a 32 µg/ml). La motilidad se evaluó en agar blando LB (agar al 0,3%) que contenía de 0 a 25 µg/ml de NTZ. Se midió diariamente el diámetro de propagación hacia fuera y la inhibición se calculó como porcentaje del control.

- 5 Ensayo cuantitativo de biopelícula. Se usó un ensayo de biopelícula cuantitativo para determinar el efecto de la NTZ en la formación de biopelícula (41). La cepa 042 se cultivó durante la noche a 37°C con agitación y se inoculó 1:100 en 200 µl de medio de cultivo en placas de microvaloración de poliestireno, de fondo plano, de 96 pocillos Costar, que contenían concentraciones adecuadas de NTZ. Las placas se incubaron estáticamente a 37°C en un incubador humidificado. A las 24 h, se midió el crecimiento bacteriano por transferencia de partes alícuotas de 100 µl a otra placa de microvaloración para determinar la turbidez o por dilución de partes alícuotas de 100 µl 1:100 en 9,9 ml de PBS para los recuentos cuantitativos de las placas en medio LB. Los recuentos bacterianos por triplicado se dan como ufc/ml. La biopelícula se observó después de tinción con cristal violeta al 0,5% (41) y la absorbancia se leyó a 570 nm usando un lector de microplaca (Molecular Dynamics). Todos los experimentos fueron por triplicado y se dan como media y desviación típica.
- 10
- 15 Los ensayos se llevaron a cabo inicialmente con y sin NTZ 25 µg/ml usando 5 medios de crecimiento diferentes: DMEM, DMEM con glucosa al 0,4%, LB, LB con glucosa al 0,4% y el medio químicamente definido de los autores de la invención que contiene glucosa al 1%. *E. coli* DH5α servía como un control negativo para la formación de biopelícula. Los ensayos se llevaron a cabo después con concentraciones crecientes de NTZ (0, 5, 10, 15, 20 y 25 µg/ml) tanto en medio químicamente definido como en DMEM con glucosa al 0,4%. La desnitro-nitazoxanida, un compuesto biológicamente inerte, se usó como control negativo, y el DMSO se usó para controlar cualquier efecto hidrófobo en la adición de NTZ (que se prepara como una solución madre de 25 mg/ml en DMSO).
- 20

- Hemaglutinación de glóbulos rojos por células bacterianas enteras. Se ha mostrado previamente que la hemaglutinación (HA) se correlaciona con la expresión de fimbrias AAF por diferentes cepas de EAEC (3). Los ensayos de HA se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos como se describe en la referencia (1). Las bacterias cultivadas durante la noche sin agitación (medio MinA-G con y sin NTZ 25 µg/ml) se suspendieron en PBS y se diluyeron hasta DO₆₀₀ de 1,5, 1,0 y 0,5 y se mezclaron 100 µl con un volumen igual de suspensión de eritrocitos de oveja al 3% (vol/vol) que contenía manosa al 1%, excepto cuando se ensayaron las cepas productoras de fimbrias de tipo I. En este último, las bacterias se cultivaron estáticamente en medio LB (con y sin NTZ) durante 48 h y la HA se determinó con eritrocitos de cobaya. Las reacciones de HA se incubaron a 4°C durante 20 min. La HA se determinó visualmente frente a controles que no recibían NTZ. Todos los ensayos se prepararon por triplicado y se repitieron dos veces.
- 25
- 30

- Extracción de ARN. Se cultivó EAEC 042 durante la noche en medio MinA-G y después se diluyó hasta una DO₆₀₀ inicial de 0,05 en 3 cultivos de 50 ml de MinA-G con NTZ 0, 10 y 25 µg/ml. Las células bacterianas se cultivaron con agitación hasta que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de ~0,4 y se recogieron por centrifugación a 4°C. Los sedimentos se volvieron a suspender en 200 µl de tampón TE, se transfirieron a tubos de 14 ml de fondo redondo, de poliestireno, y se extrajo el ARN total por el método de TES-fenol caliente como se ha descrito previamente (15). El ARN se volvió a precipitar y se lavó dos veces con 500 µl de etanol-DEPC al 70% para separar cualquier sal que quedara. Los sedimentos se secaron a 37°C y se suspendieron en 100 µl de agua-DEPC. La concentración de ARN se determinó con un espectrofotómetro UV-Vis Nanoprop ND-1000 UV-Vis. Los rendimientos del ARN típicamente estaban en el intervalo de 1,6-3,2 µg/µl. El ADN residual se separó por tratamiento con TURBO DNase y se almacenó a -80°C. (15).
- 35
- 40

- RT-PCR. Los cebadores para la qRT-PCR en tiempo real se diseñaron para dar amplicones de aproximadamente 150 pares de bases para los genes de virulencia *aggR* y *aafA* y para el gen de respuesta al estrés *rpoS*, que servía como un control interno. Se usó la transcriptasa inversa SuperScript™ (Invitrogen) para sintetizar la primera cadena de ADNc a partir de 1 µg de ARN purificado con 100 ng de cebadores aleatorios (Invitrogen). Se mezclaron el ARN, cebadores aleatorios y dNTP (concentración final 0,5 mM), se calentaron a 65°C durante 5 min, se centrifugaron brevemente, y se enfriaron sobre hielo rápidamente. A cada 20 µl de reacción se añadieron tampón de la primera cadena, DTT (concentración final 0,01 M), y 20 U de inhibidor de RNasa (Applied Biosystems). El contenido del tubo se mezcló suavemente y se incubó a 25°C durante 2 min. Se añadió RT SuperScript™ II y las reacciones se incubaron a 25°C durante 10 min y 43°C durante 50 min, seguido de inactivación con calor de la enzima a 70°C durante 15 min. Cada reacción se diluyó por adición de 80 µl de agua-DEPC.
- 45
- 50

- Se llevó a cabo la PCR de los tres genes para cada una de las tres reacciones de ADNc en un ciclador térmico iCycler con SYBR Green como agente de detección. Cada 25 µl de reacción consistían en 10 µl de ADNc diluido, 1x tampón de PCR (que contenía MgCl₂ 1,5 mM), 0,5x Q-Solution, MgCl₂ 4 mM, mezcla de dNTP 0,2 mM, 0,05 µg de cada uno de los cebadores directo e inverso, 1,25 U de ADN polimerasa HotStarTaq (QIAGEN), y 0,25 µl de SYBR Green (diluido 10⁻³). Las reacciones se incubaron durante 15 min a 95°C para activar la ADN polimerasa HotStarTaq, seguido de 35 ciclos de amplificación de 95°C durante 30 s, 58°C durante 30 s (optimizado por PCR en gradiente de ADN genómico), y 60°C durante 20 s, con una extensión final de 10 min a 60°C. Después de la PCR, la temperatura se aumentó en incrementos de 0,5°C cada 10 s para generar curvas de fusión de los amplicones de PCR. Para explicar cualquier amplificación debida a ADN genómico contaminante, las reacciones de PCR con ARN, correspondientes a la concentración usada para la síntesis de ADNc, sirvieron como controles negativos para cada
- 55
- 60

muestra. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Se llevaron a cabo ensayos repetidos para optimizar la purificación del ARN y condiciones de PCR y verificar la reproducibilidad de los resultados.

- 5 Fusiones de genes indicadores. Las fusiones de genes indicadores fueron proporcionadas por James Nataro (University of Maryland) e incluían *aggR-lacZ* de *E. coli* 042 y *aafA-phoA* de *E. coli* 042 (3.4.14 y 2.94) (3) y una cepa de control de *E. coli* 042 sin promotor de *lacZ* indefinida. Las cepas se cultivaron sin agitación en medio MinA-G complementado con NTZ 0, 12 o 25 µg/ml durante 16 h a 37°C. La actividad de la β-galactosidasa se determinó por espectrofotometría y se describió en unidades Miller (24). También se determinó la actividad de fosfatasa alcalina por espectrofotometría usando p-nitrofenol como se ha descrito previamente (23). Todos los ensayos se llevaron cabo por triplicado en tres experimentos independientes y se describieron la media y desviación típica.
- 10 Purificación y análisis de proteínas fimbriales por SDS-PAGE. Un procedimiento simplificado para la separación mecánica de fimbrias fue modificado por Dodd y Eisenstein (5). Se cultivó EAEC 042 en medio MinA-G y LB durante una noche y se inoculó 1:100 en 100 ml del medio de cultivo adecuado en matraces de 250 ml con y sin NTZ 25 µg/ml y se cultivaron estáticamente durante una noche a 37°C. Los cultivos se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 min a 25°C. Los sedimentos se volvieron a suspender en 2 ml de PBS, se mezclaron con vórtice 2x durante 30 s para que se desprendieran los flagelos y fimbrias, y después se centrifugaron a 8.000 rpm durante 10 min para separar las células enteras. Los líquidos sobrenadantes, que contenían los filamentos de fimbrias, se transfirieron a nuevos tubos y se añadieron 8 ml de acetona a las proteínas precipitadas. Las soluciones se volvieron a centrifugar a 8.000 rpm durante 10 min, y se decantó la acetona. Los sedimentos de proteínas que quedaban se volvieron a suspender en 50 µl de PBS y 100 µl de tampón de carga que contiene 2-mercaptoetanol 3X.
- 15
- 20 Se observaron las biopelículas en la interfase de aire-líquido en el cultivo de LB y en el fondo del matraz en MinA-G sin NTZ. Para analizar las proteínas contenidas en la biopelícula, los matraces se aclararon para separar las bacterias residuales, y las biopelículas se disolvieron en 1-2 ml de SDS al 1%. Se combinaron 50 µl de cada solución con 100 µl de tampón de carga 3X en tubos de PCR. Las cinco muestras se llevaron a un gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris a 120 V y se tiñeron con azul brillante Coomassie o se usaron directamente para la transferencia de proteínas a nitrocelulosa.
- 25
- Inmunotransferencia e inmunofluorescencia. La nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau se usó para visualizar proteínas transferidas y se usaron protocolos de inmunotransferencia en este estudio, como se ha descrito (14). Se usó suero de conejo hiperinmune generado contra subunidades fimbriales AafA de la cepa de EAEC 042 con una dilución 1/10000. Se usó la IgG de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina (1/5000) con BCIP-NBT para identificar proteínas inmunorreactivas. Para evaluar la expresión de fimbrias por inmunofluorescencia, las bacterias se fijaron con calor brevemente sobre portaobjetos de microscopio y se trataron 1 min con paraformaldehído al 2%. Después de tratamiento con suero anti-AafA durante 30 min, los portaobjetos se lavaron 3x con PBS y se tiñeron con inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con rodamina. Los portaobjetos se lavaron 3x en PBS, se secaron y se visualizaron con un microscopio de epi-fluorescencia Zeiss.
- 30
- 35 Análisis estadístico. Se usó el software SigmaStat para llevar a cabo los análisis estadísticos de los datos adquiridos de los ensayos de biopelícula y qRT-PCR.

Resultados

- La NTZ inhibe parcialmente el crecimiento de EAEC 042. Los autores de la invención describieron previamente que el fármaco antiparasitario NTZ inhibía parcialmente el crecimiento de la cepa de *E. coli* CC104 en medio MinA-G pero no en LB (38). La CMI ensayada en condiciones estáticas indicaba que para el medio LB, la CMI era > 64 µg/ml; mientras que para MinA-G era ~32 µg/ml. Se razonó que si el intestino humano se parece nutricionalmente al medio MinA-G (es decir, pobre en nutrientes) a diferencia del medio LB rico en nutrientes, entonces quizás la NTZ podría mostrar alguna eficacia contra estos organismos (35). Para ensayar esta hipótesis, se reprodujeron los experimentos de crecimiento con las cepas de EAEC 042 (AAF/II) y 17-2 (AAF/I), que son típicas de cepas que producen diarrea persistente. La NTZ y el metabolito desacetilado la tizoxanida inhibían el crecimiento aerobio de EAEC 042 (figura 9) y en menor medida de la 17-2 de una forma dependiente de la dosis en el medio MinA-G (solo se muestran los datos con NTZ). Aunque el crecimiento no era completamente inhibido en concentraciones de hasta 25 µg/ml, se calculó que se podía lograr 50% de inhibición con concentraciones de NTZ entre 15 y 20 µg/ml para la cepa 042 y de 20 a 25 µg/ml para la cepa 17-2. En condiciones estáticas, las cepas de EAEC presentaban una CMI₅₀ de ~20 µg/ml. Dichas concentraciones se pueden lograr clínicamente cuando se usan dosis de 1 g diario para tratar las infecciones de parásitos (8,13).
- 40
- 45
- 50

- La NTZ inhibe la formación de biopelícula. En el ensayo de la CMI realizado por microdilución, se observó que la cepa de EAEC 042 formaba una biopelícula en los pocillos de plástico en medio MinA-G y que niveles inferiores a la CMI de NTZ inhibían la producción de biopelícula. Se ha sugerido que la presencia de una biopelícula de mucosa de EAEC se correlaciona con la infectividad promocionando la colonización persistente y aumentando la resistencia a antibióticos (25). El comportamiento tanto de biopelícula como de adherencia agregativa se pueden atribuir a la expresión de las fimbrias AAF/II (41). Para explorar más el efecto de NTZ, se comparó la formación de biopelícula en el medio MinA-G con la del medio DMEM y LB. Como se ve en la figura 10, las biopelículas de EAEC (cepa 042 pero no las cepas 17-2 o JM221) eran más densas en medio MinA-G (DO₅₇₀ > 0,5) y estaban ausentes en LB (DO₅₇₀ <
- 55

0,01), de acuerdo con los descubrimientos previos que demostraban mayor expresión de biopelícula en medio alto en glucosa (37). Ensayos repetidos en medio MinA-G pusieron de manifiesto una inhibición dependiente de la dosis de la formación de biopelícula con NTZ. La inhibición más destacable era entre 10 y 15 µg/ml, con inhibición casi completa con 20 µg/ml (figura 11). Ensayos análogos con DMEM + glucosa al 0,4% dieron resultados comparables pero con menor densidad de película total y una disminución más constante en respuesta a la dosis creciente de NTZ (no se muestran los datos). Los recuentos de placa de las partes alícuotas a cada concentración de fármaco pusieron de manifiesto una alta densidad bacteriana (>10⁸ ufc/ml) en todos los pocillos, indicando que las bacterias estaban en fase estacionaria a las 24 h después de inoculación. Por lo tanto, la reducción de biopelícula no se debía a la inhibición del crecimiento.

La NTZ inhibe la hemaglutinación. Las cepas productoras tanto de fimbrias AAF/II como AAF/I hemaglutinan eritrocitos, y esto se confirmó con eritrocitos de oveja. Como se ve en la tabla 2, la NTZ inhibía la HA por ambas cepas de EAEC, sugiriendo un mecanismo inhibidor común. Además, concentraciones similares de NTZ (20 µg/ml) inhibían la HA por la cepa de EAEC JM221 cultivada estáticamente en medio LB que promueve la expresión de fimbrias de tipo I y reprime las fimbrias AAF. La diferencia se demostró además por la capacidad de JM221 cultivada en LB (pero no cultivada en medio MinA-G) para hemaglutinar eritrocitos de cobaya, pero no eritrocitos de oveja. La acción inhibidora de NTZ en la producción de fimbrias de tipo I en medio LB (CMI > 64 µg/ml), apoya la probabilidad de un objetivo específico en lugar de un mecanismo relacionado con crecimiento no específico.

Tabla 2. Ensayo de hemaglutinación

Cepas bacterianas	NTZ	HA (eritrocitos de oveja) ^a		
		DO ₆₆₀ bacteriana		
		1,5	1,0	0,5
EAEC 042	-	+++	++	+
EAEC 042	+	+	-	-
EAEC JM221	-	+++	++	-
EAEC JM221	+	++	-	-

Cepas bacterianas	NTZ	HA (eritrocitos de cobaya) ^b		
		1,5	1,0	0,5
EAEC JM221	-	+++	++	++
EAEC JM221	+	+	-	-

^aLos ensayos de hemaglutinación se realizaron en microplacas de 96 pocillos por triplicado. +++ = reacción de hemaglutinación fuerte, + débil y - sin hemaglutinación. NTZ + indica que las bacterias se cultivaron durante la noche en medio MinA-G complementado con 20 µg/ml de NTZ. ^bPara la determinación de la hemaglutinación por fimbrias de tipo I, las bacterias se cultivaron estáticamente en caldo LB durante 48 h en presencia (+) o ausencia (-) de NTZ (20 µg/ml). Las bacterias cultivadas en LB no hemaglutinan eritrocitos de oveja, lo que indica la ausencia de fimbrias AAF. La DO bacteriana usada es como la indicada para eritrocitos de oveja.

La NTZ inhibe el ensamblado de filamentos fimbriales. Tanto el fenotipo de adherencia agregativa como la formación de biopelícula de EAEC 042 son atribuibles a la producción de fimbrias AAF y no a la producción de polisacáridos (30). Aunque ambas cepas de EAEC producen fimbrias AAF, solo las fimbrias de la cepa 042 se adhieren al plástico. Por lo tanto, la inhibición de la formación de biopelícula y de HA por la NTZ debe deberse a la ausencia de filamentos de superficie en las cepas de EAEC. Para distinguir entre la expresión de genes de fimbrias y el ensamblado, se determinó primero si las fimbrias estaban realmente ausentes en las bacterias EAEC 042 tratadas con NTZ por inmunotransferencia de las bacterias enteras sometidas a mezcla con vórtice para desprender los filamentos. Como se ve en la figura 12 (A - tinción de proteína y B - inmunotransferencia), se obtuvieron filamentos intactos de las bacterias cultivadas estáticamente en medio MinA-G sin NTZ (líquidos sobrenadantes). También se detectaron las subunidades de fimbrias en los extractos sin células que representarían tanto monómeros como filamentos y en los raspados de biopelícula de los pocillos de plástico que representarían los filamentos. En cambio, los filamentos obtenidos por mezcla vorticial (figura 12, líquidos sobrenadantes) de bacterias cultivadas en LB eran mucho menos abundantes de lo confirmado previamente (35, 37), aunque se detectaron subunidades de fimbrias en extractos celulares y en mucha menor medida del material de los anillos de superficie extraído de los pocillos de las placas de microvaloración. Con 20 µg/ml, la NTZ inhibía la formación de biopelícula en medio MinA-G y los filamentos de fimbrias estaban casi ausentes de las células enteras mezcladas con vórtice (mucho menos que los observados para las bacterias cultivadas en LB). No se detectaron subunidades de fimbrias en extractos celulares, que pudieran sugerir que NTZ puede afectar a la expresión de genes. Aunque no se representa, los ensayos de inmunofluorescencia con células enteras estaban de acuerdo con los resultados de inmunotransferencia. Estos descubrimientos sugieren que la NTZ afecta a la producción de filamentos AafA por represión de la expresión del gen *aafA* o por inhibición de alguna etapa del ensamblado de AafA.

La NTZ no afecta a la expresión de *aafA*. Para determinar si la NTZ afectaba a la expresión del gen *aafA*, se usó la qRT-PCR en tiempo real para el seguimiento de los niveles de transcritos de *aggR* y *aafA* en bacterias cultivadas con agitación suave en medio MinA-G con y sin NTZ. El gen del factor sigma de fase estacionaria *rpoS* sirvió como

un control interno en la qRT-PCR. Como se ve en la figura 13, a la expresión de *aafA* no le afectaba la NTZ: un análisis ANOVA de una vía de tipo Kruskal-Wallis sobre rangos ($\alpha=0,05$) no encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión de *aafA* ($P=0,086$) o en la expresión de *rpoS* ($P=0,086$) en presencia o ausencia de NTZ. Además, el fármaco causaba un aumento de 10 veces de la expresión *aggR* ($P=0,002$, ANOVA de una vía). El aumento inducido por NTZ de la expresión de *aggR* también se podía demostrar con las fusiones de indicadores *lacZ* como se representa en la figura 4A. Los ensayos de β -galactosidasa mostraron un aumento similar en la expresión del gen *aggR* (~2,5 veces) con células cultivadas estáticamente en presencia de NTZ 12 $\mu\text{g/ml}$ y una ligera disminución con células cultivadas con 25 $\mu\text{g/ml}$. En cambio la expresión de *aafA*, seguida por la actividad de PhoA, estaba de acuerdo con los descubrimientos de la qPCR de que el tratamiento con NTZ no alteraba la expresión de genes *aafA* cuando se comparaba con controles no tratados (véase la figura 14B). Los resultados de la qRT-PCR y la fusión de indicadores indican que la NTZ no afecta a la expresión de genes *aafA*. La regulación por exceso de *agrR* y no *aafA* deben sugerir un requisito de factores de regulación adicionales para la activación de *aafA*.

La NTZ no afecta a la motilidad bacteriana. Puesto que es necesaria la formación de enlace disulfuro para el ensamblado de fimbrias en filamentos (20, 33), se consideró la posibilidad de que DsbA, una proteína periplasmática que cataliza esta reacción, pudiera ser un objetivo potencial de la acción de la NTZ basado en informes previos de la unión de NTZ a enzimas relacionadas (13). Puesto que la función de DsbA también es necesaria para el ensamblado y la función de flagelos, se examinó la motilidad de las bacterias tratadas con NTZ. Preparaciones húmedas de bacterias cultivadas en medio MinA-G con o sin NTZ retenían la motilidad, observada por microscopía con contraste de fase, y las concentraciones de NTZ que inhibían la formación de biopelícula no tenían efecto en la motilidad *swarming* en los ensayos de quimiotaxis en agar blando (no se presentan los datos). Las concentraciones de NTZ de CMI no afectaban al *swarming*, pero esto se atribuyó a la inhibición del crecimiento bacteriano. Los resultados de motilidad estaban de acuerdo con los estudios de fusión *aafA::phoA* (DsbA es necesario para activar PhoA) e indica que NTZ no es un inhibidor de la función de DsbA.

25 Discusión

En este estudio, los autores de la invención describen que el fármaco antiparasitario nitazoxanida y su metabolito desacetilado tizoxanida inhiben la producción de biopelícula por la cepa de EAEC 042, y la HA tanto para cepas productoras como no productoras de biopelícula, cuando se cultivaban en condiciones que promueven la formación de biopelícula y son permisivas para el crecimiento bacteriano. En general el medio MinA-G era superior a DMEM-G en la promoción de la producción de biopelícula y se produjo poca biopelícula en medio LB nutricionalmente rico. Puesto que la formación de biopelícula se debe a la producción de fimbrias de adhesión agregativas (AAF), se mostró por inmunotransferencia e inmunofluorescencia que la abundancia de filamentos de fimbrias intactos recuperados de las bacterias tratadas con NTZ se reducía espectacularmente frente a los controles, sugiriendo que la NTZ inhibía la biogénesis de filamentos. Los niveles de AafA en los extractos sin células de las bacterias tratadas con NTZ no eran detectables, de acuerdo con los informes previos de que los monómeros no ensamblados se degradan rápidamente (18). Los estudios de expresión génica (qRT-PCR y fusiones de genes informadores) de bacterias EAEC 042 tratadas con dosis de CI_{50} de NTZ, no mostraron cambio en la expresión del gen *aafA* frente a los controles, mientras que su regulador *aggR* aumentaba varias veces. La regulación por exceso de *aggR* debería reflejar la señalización de retroalimentación asociada con las condiciones ambientales permisivas con la biopelícula que resultan de la acción del fármaco; mientras que la ausencia de una mayor síntesis de subunidades de AafA debería indicar la retroalimentación negativa del ensamblado de AafA fallido y la recuperación de proteína posiblemente mediada por factores sigma extracitoplasmáticos. Alternativamente, son necesarios elementos reguladores adicionales además de *AggR* para activar la expresión de genes *aafA*. Aunque el efecto inhibidor de NTZ en el crecimiento de EAEC en medio MinA-G probablemente es resultado de los efectos acumulados en múltiples dianas biosintéticas, se puede esperar que el efecto profundo en el ensamblado de AAF, un determinante de la virulencia reconocido, afecte a la colonización y gravedad de la enfermedad. Serían necesarios estudios in vivo adicionales en modelos animales para determinar si la pérdida de adherencia agregativa es suficiente para reducir la infección, persistencia y gravedad de la diarrea.

El grupo de fimbrias AAF es un haz de filamentos de tipo IV codificados por plásmido que usa el sistema de chaperona-usher de membrana periplasmático para el ensamblado de monómeros en filamentos (1). Otras actividades requeridas incluyen la formación de enlaces disulfuro en los monómeros de AafA por DsbA y dispersión de filamentos en la superficie por una proteína de membrana externa dispersina (20, 40). La tiol:disulfuro oxidoreductasa DsbA tiene una función esencial en facilitar la formación de enlaces disulfuro en muchas proteínas extracelulares, incluyendo antígenos fimbriales y flagelina en la que este enlace estabiliza las subunidades estructurales mayores que son necesarias para el ensamblado (33, 42). Aunque la DsbA representa un objetivo atractivo para la acción inhibidora de la NTZ, el fármaco no tiene efecto en la motilidad bacteriana o en la actividad de PhoA, que dependen de la función de DsbA (42). Los estudios de los autores de la invención sugieren que NTZ inhibe el ensamblado de filamentos fimbriales a una etapa posterior, quizás por inhibición de las funciones de chaperona o usher, como se ha indicado para la chaperona PilD en *E. coli* uropatogénica (1, 31, 33). Este mecanismo está apoyado además por el descubrimiento de que la NTZ también inhibe la HA por las cepas de EAEC que no se adhieren al plástico y por las cepas de EAEC que expresan fimbrias de tipo 1. El término pilicida ha sido acuñado para moléculas pequeñas inhibitoras de biogénesis de filamentos (31). Se ha encontrado que varias clases de inhibidores interactúan con la chaperona PapD similar a inmunoglobulina del sistema de pili de *E. coli*

5 uropatógona para bloquear la función de chaperona-usheer (31). Los estudios de los autores de la invención no descartan la interferencia con otras etapas en el proceso, tales como secreción o procesamiento de prepilina o quizás ensamblado de monómeros de pilina. Parece que es necesaria la forma aniónica de la NTZ para la actividad biológica, ya que la forma desnitro de NTZ no inhibe la formación de biopelícula. Se necesita más estudio para identificar los mecanismos moleculares subyacentes de la acción de NTZ.

10 La mayor parte de la flora intestinal es no adherente y está metabólicamente adaptada al menú de nutrientes disponible. Los patógenos entéricos, por otro lado, tienden a hacerse directamente adherentes por las fimbrias o se adhieren como parte del tejido epitelial invasor, pero independientemente de la estrategia, su acción tiende a promover la inflamación, que por la filtración de suero proporciona aminoácidos y azúcares, una dieta más permisiva para el crecimiento. En el caso de EAEC, se cree que la infección resulta de la unión inicial por adhesinas agregativas, desplazamiento de la flora residente, elaboración de diferentes toxinas que inducen la inflamación y producción de biopelícula que promueve la persistencia clonal por los organismos (28). Los pilicidas, por la inhibición de la adherencia microbiana a las células epiteliales del intestino, deberían reducir notablemente la eficacia de la colonización. En relación con esto, la NTZ debería tener eficacia contra patógenos entéricos cuya estrategia de infección depende de la adherencia a través de adhesinas fimbriales.

20 Los autores de la invención demuestran aquí que la NTZ, un fármaco antidiarreico aprobado por la FDA, inhibe la formación de biopelícula impidiendo una etapa clave en la patogénesis de EAEC y ofrece un nuevo procedimiento para combatir un patógeno entérico cada vez más prevalente que es alta y variablemente resistente a muchos antibióticos. NTZ no mata EAEC sino que inhibe el ensamblado de filamentos asociado con la biopelícula de mucosa que tiene una función principal en la ayuda a la bacteria para colonizar el intestino y comprometer las defensas inmunitarias del hospedante. La NTZ podría servir como un solo anulador de los tres patógenos entéricos principales que producen enfermedades diarreicas repetidas o prolongadas entre los niños en los países en desarrollo y podría aliviar significativamente la carga de la morbilidad asociada con la diarrea.

Bibliografía - Ejemplo 2

1. Boisen, N., C. Struve, F. Scheutz, K. A. Krogfelt, and J. P. Nataro. 2008. New adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. *Infect. Immun.* 76:3281-3292.
2. Clarke, S. C. 2001. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*—an emerging problem? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41:93-98.
3. Czczulin, J.R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M.H., et al. (1997) Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 65: 4135–4145.
4. de Onis, M., M. Blossner, E. Borghi, R. Morris, and E. A. Frongillo. 2004. Methodology for estimating regional and global trends of child malnutrition. *Int. J. Epidemiol.* 33:1260-70.
5. Dodd, D. C., and B. I. Eisenstein. 1982. Antigenic quantitation of Type I fimbriae on the surface of *Escherichia coli* cells by an enzyme-linked immunosorbent inhibition assay. *Infect. Immun.* 38:764-773.
6. DuPont, H. L., C. D. Ericsson, P. C. Johnson, and F. E. de la Cabida. 1990. Use of bismuth subsalicylate for the prevention of travellers' diarrhea. *Rev. Infect. Dis.* 12(suppl. 1):S64-S67.
7. Elias, W.P. Jr, J. R. Czczulin, I. R. Henderson, L. R. Trabulsi, and J. P. Nataro. 1999. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:1779-85.
8. Fox, L. M., and L. D. Saravolatz. 2005. Nitazoxanide: A New Thiazolide Antiparasitic Agent. *Clin. Infect. Dis.* 40:1173-80.
9. Glandt, M., J. A. Adachi, J. J. Mathewson, Z. D. Jiang, D. DiCesare, D. Ashley, C. D. Ericsson, and H. L. DuPont. 1999. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of traveler's diarrhea: clinical response to ciprofloxacin. *Clin. Infect. Dis.* 29:335-8.
10. Guerrant, R. L., et al. 2001. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 32:331-51.

11. Guerrant, R. L., M. Kosek, A. A. M. Lima, B. Lorntz, and H. L. Guyatt. 2002. Updating the DALYs for diarrhoeal disease. *Trends Parasitol.* 18:191-3.
12. Harrington, S. M., E. G. Dudley, and J. P. Nataro. 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 254:12-18.
13. Hemphill, A., J. Mueller, and M. Esposito. 2006. Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opin Pharmacother.* 7:953-964.
14. Hoffman, P. S., C. A. Butler, and F. D. Quinn. 1989. Cloning and temperature-dependent expression in *Escherichia coli* of a *Legionella pneumophila* gene coding for a genus-common 60-kilodalton antigen. *Infect. Immun.* 57:1731-1739.
15. Hoffman, P. S., J. H. Seyer, and C. A. Butler. 1992. Molecular characterization of the 28 and 31 kilodalton subunits of the *Legionella pneumophila* porin. *J. Bacteriol.* 174:908-913.
16. Hoffman, P. S., G. Sisson, M. A. Croxen, K. Welch, W. D. Harman, N. Cremades, and M. G. Morash. 2007. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:868-876.
17. Huang, D. B., and H. L. DuPont. 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging pathogen in children. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 15:266-271.
18. Huang, D. V., A. Mohanty, H. L. DuPont, P. C. Okhuysen, and T. Chiang. 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 55:1303-11.
19. Infante, R. M., C. D. Ericsson, Z. D. Jiang, S. Ke, R. Steffen, L. Riopel, D. A. Sack, and H. L. DuPont. 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in travelers: response to rifaximin therapy. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2:135-8.
20. Jacob-Dubuisson, F., J. Pinkner, Z. Xu, R. Striker, A. Padmanabhan, and S. J. Hultgren. 1994. PapD chaperone function in pilus biogenesis depends on oxidant and chaperone-like activities of DsbA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11552-11556.
21. Kosek, M., C. Bern, and R. L. Guerrant. 2003. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. World Health Organ.* 81:197-204.

22. Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan, and H. J. Flint. 2007. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J Appl Microbiol.* 102:1197-1208.
23. Manoil, C., and J. Beckwith. 1985. Tnp_{hoA}: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8129-8133.
24. Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, NY.
25. Mohamed, J. A., D. B. Huang, Z. Jiang, H. L. DuPont, J. P. Nataro, J. Belkind-Gerson, and P. C. Okhuysen. 2007. Association of putative enteroaggregative *Escherichia coli* virulence genes and biofilm production in isolates from travelers to developing countries. *J. Clin. Microbiol.* 45:121-126.
26. Morcira, C. G., S. M. Carneiro, J. P. Nataro, L. R. Trabulsi, and W. P. Elias. 2003. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 226:79-85.
27. Musher, D. M., N. Logan, A. M. Bressler, D. P. Johnson, J. F. Rossignol. 2009. Nitazoxanide versus vancomycin in *Clostridium difficile* infection: A randomized, double-blind study. *Clin Infect Dis.* 48:41-46.
28. Nataro, J. P. 2005. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21:4-8.
29. Nataro, J. P., J. B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. Vial, and M. M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:829-831.
30. Nataro, J. P., D. Yikang, D. Yingkang, and K. Walkcr. 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:4691-4699.
31. Pinkner, J. S., H. Remaut, F. Buclens, E. Miller, V. Aberg, N. Pemberton, M. Hedenström, A. Larsson, P. Seed, G. Waksman, S. J. Hultgren, and F. Almqvist. 2006. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:17897-17902.
32. Pupo, G. M., D. K. R. Karadis, R. Lan, and P. R. Reeves. 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains inferred

- from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infect. Immun.* 64:2685-2692.
33. Remaut, H., C. Tang, N. S. Henderson, J. S. Pinkner, T. Wang, S. J. Hultgren, D. G. Thanassi, G. Waksman, and H. Li. 2009. Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell.* 133:640-652.
34. Ricci, K. A., F. Girosi, P. I. Tarr, Y. Lim, C. Mason, M. Miller, J. Hughes, L. Seidlein, J. M. Agosti, and R. L. Guerrant. 2006. Reducing stunting among children: the potential contribution of diagnostics. *Nature* 444:29-38.
35. Ruiz-Perez F., J. Sheikh, S. Davis, E. C. Boedeker, and J. P. Nataro. 2004. Use of a continuous-flow anaerobic culture to characterize enteric virulence gene expression. *Infect. Immun.* 72:3793-3802.
36. Sarantuya, J., J. Nishi, N. Wakimoto, S. Erdene, J. P. Nataro, J. Sheikh, M. Iwashita, K. Manago, K. Tokuda, M. Yoshinaga, K. Miyata, and Y. Kawano. 2004. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J. Clin. Microbiol.* 42:133-139.
37. Sheikh, J., S. Hicks, M. Dall'Agnol, A. D. Phillips, and J. P. Nataro. 2001. Roles for Fis and Yafk in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41:983-997.
38. Sisson, G., A. Goodwin, A. Raudonikienė, N. J. Hughes, A. K. Mukhopadhyay, D. E. Berg, and P. S. Hoffman. 2002. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2116-2123.
39. Steiner, T.S., A. A. Lima, J. P. Nataro, and R. L. Guerrant. 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 177:88-96.
40. Velarde JJ, Varney KM, Inman KG, Farfan M, Dudley E, Fletcher J, Weber DJ, Nataro JP. 2007. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2007 Dec;66(5):1123-35.
41. Wakimoto, N., J. Nishi, J. Sheikh, J. P. Nataro, J. Sarantuya, M. Iwashita, K. Manago, K. Tokuda, M. Yoshinaga, and Y. Kawano. 2004. Quantitative biofilm assay

using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am. J. Trop.*

Med. Hyg. 71:687-690.

42. Zhang, H.-Z., and M. S. Donnenberg. 1996. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21:787-797.

43. Zulu, I, P. Kelly, L. Njobvu, S. Sianongo, K. Kaonga, V. McDonald, M. Farthing, and R. Pollok. 2005. Nitazoxanide for persistent diarrhoea in Zambian acquired immune deficiency syndrome patients: a randomized-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 21:757-763.

Ejemplo 3. Nuevos compuestos y su actividad

Se llevaron a cabo trabajos adicionales para determinar el efecto de la nitazoxanida, y análogos y derivados de la misma, en diferentes microbios. Para este fin, se han diseñado una serie de fórmulas generales y se ha sintetizado una serie de compuestos para cada fórmula general y se han ensayado en varios tipos de ensayos con múltiples microorganismos. Los siguientes datos y tablas proporcionan estructuras así como actividad biológica. Las fórmulas estructurales se proporcionan en el resumen de la invención (antes) y los compuestos originales y derivados y análogos se proporcionan a continuación en las tablas.

Procedimientos experimentales generales y preparación de compuestos:

10 Consideraciones generales: Todos los reactivos se adquirieron de fuentes disponibles en el comercio y se usaron como estaban sin purificación adicional. Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno o argón salvo que se indique otra cosa. La cromatografía en gel de sílice ultrarrápida se llevó a cabo con gel de sílice de calidad estándar de 60 Å (Sortech). Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron usando espectrómetros Varian de 300 MHz o 500 MHz y se registraron a 23°C. Los desplazamientos químicos (s=singlete, s an= singlete ancho, d=doblete, dd=doblete de dobletes, dt=doblete de tripletes, t=triplete, tt=triplete de tripletes, m=multiplete) se dan en partes por millón con respecto al DMSO- d_6 (δ 2,50) para los espectros de protón y con respecto al DMSO- d_6 (δ 39,51) para los espectros de carbono. Los espectros de masas se obtuvieron en las instalaciones de espectrometría de masas del Departamento de Química de la NCSU financiado por el North Carolina Biotechnology Center y the NCSU Department of Chemistry.

20 Método A: Acoplamiento de amida con cloruro de ácido:

Se disolvió cloruro de ácido (100 mg, 0,1 m, 1 eq) en THF (0,1M) y se enfrió a -78°C , después se añadió el amino-heterociclo (1 eq) en una porción. Se añadió DIPEA (1,1 eq) a la suspensión resultante a -78°C y la solución se mantuvo a esta temperatura durante 10 min y después se dejó calentar a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se consideró completada por análisis de TLC (~ 24 h) y se diluyó con EtOAc (30 ml) y se lavó con solución saturada de NaHCO_3 (3x20 ml), HCl 1 M (3x20 ml) y salmuera (2x20 ml) y después se secó (MgSO_4) seguido de filtración y evaporación hasta sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc/hexanos al 10-60% o $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ al 1-2%) para obtener el producto.

Método B: Acoplamiento de amida con ácido carboxílico y EDC:

30 Se disolvieron ácido carboxílico (100 mg, 1 eq), EDC (2 eq), HOBT (2 eq) y DIPEA (3 eq) en THF (0,1M) y se agitaron a temperatura ambiente durante 15 min. Después se añadió el amino-heterociclo (1 eq) en una porción y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Una vez considerada completa por análisis de TLC (~ 24 h), la suspensión resultante se diluyó con EtOAc (30 ml) y se lavó con solución saturada de NaHCO_3 (3x20 ml), HCl 1 M (3x20 ml) y salmuera (2x20 ml) y después se secó (MgSO_4) seguido de filtración y evaporación hasta sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc/hexanos al 10-60%) para obtener el producto.

Método C: Alquilación de alcohol aromático:

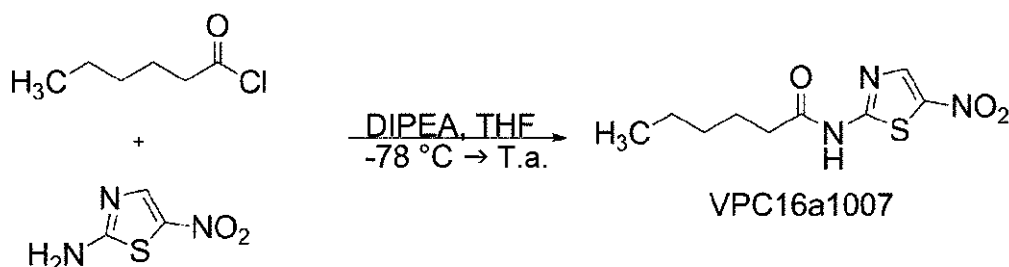
40 Se disolvió alcohol aromático (2,0 ml, 1 eq) en DMF (0,3 M) y después se añadieron K_2CO_3 finalmente dividido (2 eq) y bromuro de Boc-aminoetilo (1,5 eq). La solución se calentó a 65°C durante 3 días y después se concentró casi hasta sequedad. Después se añadió agua y la suspensión resultante se extrajo con EtOAc (3x40 ml). Las capas orgánicas se combinaron y lavaron con H_2O (2x20 ml), LiCl al 5% (2x20 ml) y salmuera (2x20 ml) y después se secaron (MgSO_4) seguido de filtración y evaporación hasta sequedad para obtener el producto.

Método D: Saponificación de éster alquílico:

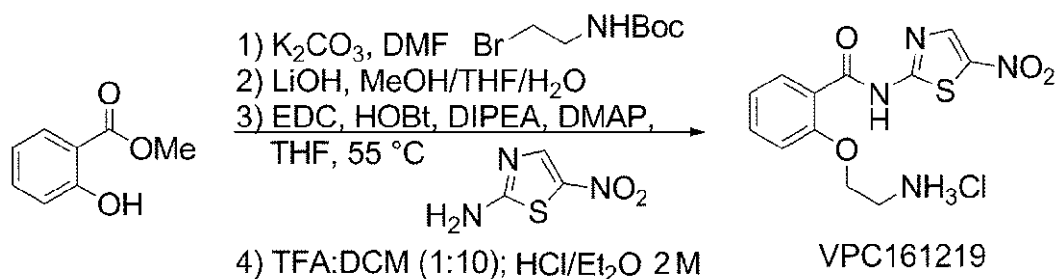
Se disolvió éster (240 mg, 1 eq) en una mezcla de MeOH:THF:H₂O (1M:1M:1M) y después se añadió LiOH.H₂O (3 eq). La solución se agitó durante 24 h y después se inactivó con HCl 1 M (20 ml) y se extrajo con EtOAc (4x15 ml). Las capas orgánicas combinadas después se lavaron con salmuera (2x20 ml), y después se secaron (MgSO₄) seguido de filtración y evaporación hasta sequedad para obtener el producto.

Método E: Desprotección del grupo Boc e intercambio de sal de HCl:

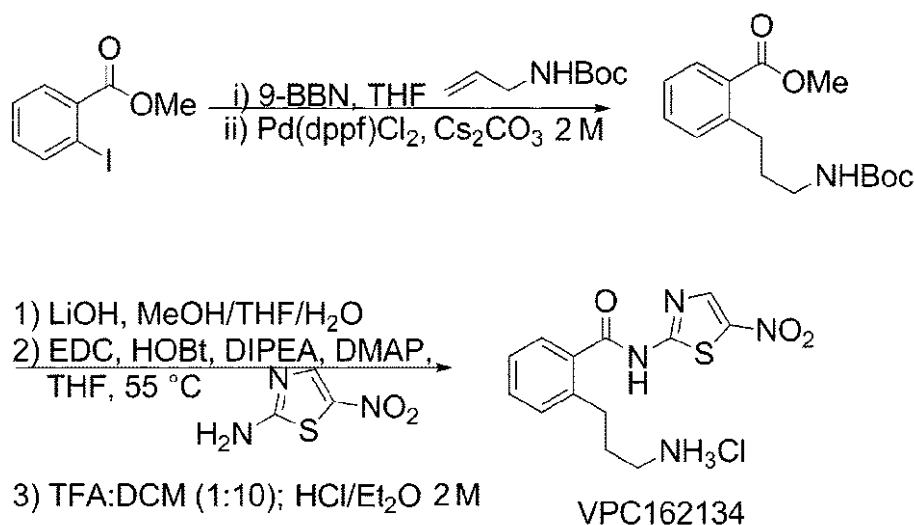
Se suspendió Boc-amina (1 eq) en CH₂Cl₂ anhidro (0,02 M) y se enfrió a 0°C. Se cargó TFA (0,2 M) en el matraz y la reacción se agitó durante la noche. Después de este tiempo, la reacción se evaporó hasta sequedad y se añadieron hexanos. La mezcla se concentró otra vez y se repitió el procedimiento. La sal de TFA resultante se disolvió en CH₂Cl₂ y se añadió HCl 2 M en Et₂O (0,15 M) seguido de Et₂O frío. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con Et₂O para obtener el compuesto del título.



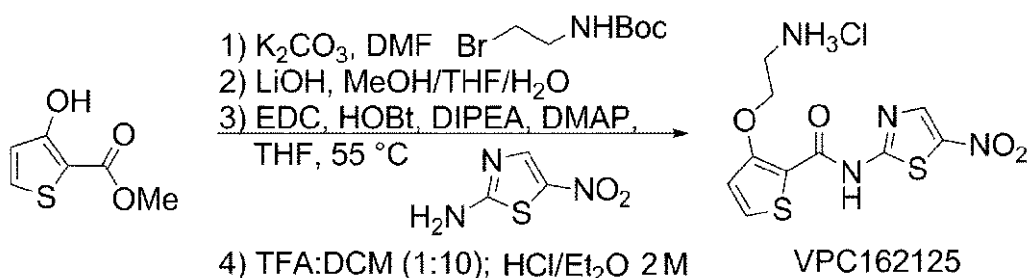
N-(5-Nitrotiazol-2-il)hexanamida (VPC16a1007 *no es de la invención). El método A dio el compuesto del título VPC16a1007 (126 mg, 71%) en forma de un sólido naranja claro. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,02 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 2,50 (t, J=7,5 Hz, 2H), 1,67-1,44 (m, 2H), 1,44-1,07 (m, 4H), 0,85 (t, J=7,0 Hz, 3H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173,1, 161,7, 142,6, 141,6, 34,9, 30,7, 24,0, 21,8, 13,8; HRMS (ESI) calculado para [C₉H₁₃N₃O₃S+H]⁺ 244,0750, encontrado 244,0757.



Hidrocloruro de 2-(2-aminoetoxi)-N-(5-nitrotiazol-2-il)benzamida (VPC161219). El método C con 2-hidroxibenzoato de metilo (2,0 ml, 15,4 mmol) dio el 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)benzoato de metilo (4,55 g, 99%) en forma de un aceite de color ámbar. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,64 (dd, J=7,6, 1,1 Hz, 1H), 7,57-7,45 (m, 1H), 7,14 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,02 (t, J=7,5 Hz, 1H), 6,83 (t, J=5,3 Hz, 1H), 4,03 (t, J=5,9 Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,31 (q, J=5,8 Hz, 2H), 1,38 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,4, 155,6, 133,4, 130,7, 120,6, 120,5, 114,0, 77,8, 67,4, 51,8, 39,3, 31,4, 28,2, 27,6; HRMS (ESI) calculado para [C₁₅H₂₁NO₅+Na]⁺ 318,1312, encontrado 318,1319. El método D con 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)benzoato de etilo (240 mg, 0,81 mmol) dio el ácido 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)benzoico (221 mg, 97%) en forma de un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,56 (s, 1H), 7,65 (dd, J=7,6, 1,7 Hz, 1H), 7,48 (td, J=8,3, 1,7 Hz, 1H), 7,13 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,01 (t, J=7,5 Hz, 1H), 6,85 (t, J=5,3 Hz, 1H), 1,37 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,3, 157,3, 155,7, 133,1, 130,8, 121,7, 120,6, 114,1, 77,9, 67,6, 39,2, 28,2; HRMS (ESI) calculado para [C₁₄H₁₉NO₅+Na]⁺ 304,115, encontrado 304,1168. El método B con ácido 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)benzoico (100 mg, 0,36 mmol) y DMAP cat. dio el 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoi)fenoxi)etilcarbamato de *tert*-butilo (56 mg, 38%) en forma de un sólido de color beige. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,75 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 7,71 (dd, J=7,6, 1,7 Hz, 1H), 7,66-7,53 (m, 1H), 7,24 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,08 (dt, J=10,9, 6,4 Hz, 2H), 4,15 (t, J=5,7 Hz, 2H), 3,37 (q, J=5,6 Hz, 2H), 1,34 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,7, 161,6, 156,5, 155,7, 142,8, 141,9, 134,2, 130,6, 121,0, 120,9, 113,2, 77,9, 67,6, 39,2, 28,2; HRMS (ESI) calculado para [C₁₇H₂₀N₄O₆S+H]⁺ 409,1176, encontrado 409,1189. El método E con 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoi)fenoxi)etilcarbamato de *tert*-butilo (32 mg, 0,07 mmol) dio el compuesto del título VPC161219 (27 mg, 99%) en forma de un sólido marrón. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,94 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,24 (s, 3H), 7,69 (dd, J=7,6, 1,4 Hz, 1H), 7,66-7,57 (m, 1H), 7,25 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,15 (t, J=7,5 Hz, 1H), 4,35 (t, J=4,8 Hz, 3H), 3,24 (q, J=4,3 Hz, 2H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,8, 161,8, 155,7, 142,8, 141,9, 134,1, 130,8, 121,6, 121,3, 113,2, 65,2, 38,2; HRMS (ESI) calculado para [C₁₂H₁₂N₄O₄S+H]⁺ 309,0652, encontrado 309,0666.

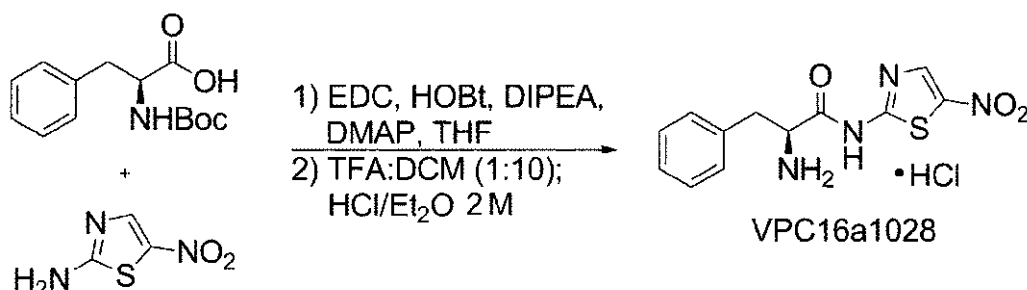


Hidrocloruro de 2-(3-aminopropil)-N-(5-nitrotiazol-2-il)benzamida (VPC162134). Se cargaron alilcarbamato de *tert*-butilo (113 mg, 0,72 mmol) y THF (1,5 ml) en un matraz de fondo redondo seco con llama, seguido de la adición gota a gota de 9-BBN 0,5 M en THF (1,92 ml). Después de 2 h, se añadieron Cs₂CO₃ 2 M (0,72 ml), 2-yodobenzoato de metilo (0,07 ml, 0,48 mmol) y Pd(dppf)Cl₂ (27,7 mg, 5% en moles) al matraz y se mantuvo a temperatura ambiente. Una vez considerada completa por TLC (~24 h), la mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (30 ml) y se lavó con solución saturada de NH₄Cl (2x20 ml) y salmuera (2x20 ml) y después se secó (MgSO₄) seguido de filtración y evaporación hasta sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (5-30% EtOAc/hexanos) para obtener el 2-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)propil)benzoato de metilo (130 mg, 93%) en forma de un aceite de color ámbar. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,76 (dd, J=7,8, 1,1 Hz, 1H), 7,49 (td, J=7,5, 1,4 Hz, 1H), 7,34-7,28 (m, 2H), 6,85 (t, J=5,4 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,93 (q, J=6,7 Hz, 2H), 2,86-2,79 (m, 2H), 1,65-1,58 (m, 2H), 1,37 (s, 9H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,5, 155,57, 143,0, 132,0, 130,9, 130,1, 129,4, 126,1, 77,4, 52,0, 39,8, 31,6, 31,0, 28,3; HRMS (ESI) calculado para [C₁₆H₂₃NO₄+Na]⁺ 316,1519, encontrado 316,1152. El método D con 2-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)propil)benzoato de metilo (130 mg, 0,45 mmol) dio el ácido 2-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)propil)benzoico (120 mg, 96%) en forma de un sólido blanco. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,82 (s ancho, 1H), 7,77 (dd, J=7,7, 1,1 Hz, 1H), 7,45 (td, J=7,5, 1,3 Hz, 1H), 7,33-7,24 (m, 2H), 6,81 (t, J=5,3 Hz, 1H), 3,00-2,83 (m, 4H), 1,78-1,53 (m, 2H), 1,37 (s, 9H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,8, 155,6, 142,9, 131,6, 130,8, 130,5, 130,2, 125,9, 77,4, 31,5, 30,9, 28,3; HRMS (ESI) calculado para [C₁₅H₂₁NO₄+Na]⁺ 302,1363, encontrado 302,1359. El método B con ácido 2-(3-(*tert*-butoxicarbonilamino)propil)benzoico (95 mg, 0,34 mmol) y DMAP cat. a 55°C dio el 3-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoyl)fenil)propilcarbamato de *tert*-butilo (58 mg, 42%) en forma de un sólido amarillo claro. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,54 (s ancho, 1H), 8,69 (s, 1H), 7,60 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,51 (t, J=7,6 Hz, 1H), 7,43-7,32 (m, 2H), 6,81 (t, J=5,5 Hz, 1H), 2,91 (q, J=6,5 Hz, 2H), 2,79-2,67 (m, 2H), 1,74-1,40 (m, 2H), 1,34 (s, 9H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,7, 162,0, 155,5, 142,6, 142,0, 141,2, 132,3, 131,5, 130,2, 128,5, 125,9, 77,3, 39,6, 31,5, 30,0, 28,2; HRMS (ESI) calculado para [C₁₈H₂₂N₄O₅S+Na]⁺ 429,1203, encontrado 429,1201. El método E con 3-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoyl)fenil)propilcarbamato de *tert*-butilo (310 mg, 0,76 mmol) dio el compuesto del título VPC162134 (257 mg, 98%) en forma de un sólido de color beige. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,60 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,05 (s ancho, 3H), 7,65 (d, J=7,7 Hz, 1H), 7,55 (t, J=7,6 Hz, 1H), 7,47-7,35 (m, 2H), 2,81 (t, J=7,5 Hz, 2H), 2,79-2,71 (m, 2H), 1,87 (quint., J=7,5 Hz, 2H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,6, 162,1, 142,7, 142,0, 140,3, 132,2, 131,7, 130,2, 128,8, 126,3, 38,4, 29,6, 28,9; HRMS (ESI) calculado para [C₁₃H₁₄N₄O₃S+H]⁺ 307,0859, encontrado 307,0855.

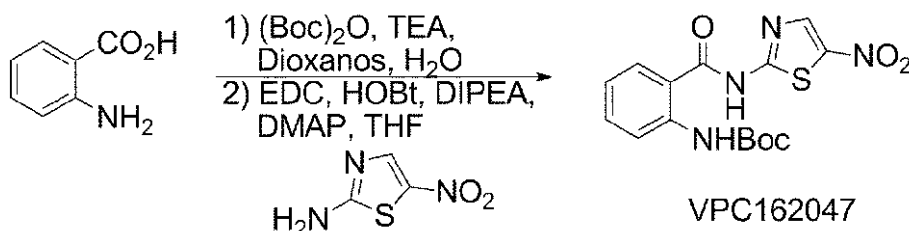


Hidrocloruro de 3-(2-aminoetoxi)-N-(5-nitrotiazol-2-il)tiofeno-2-carboxamida (VPC162125). El método C con 3-hidroxitiofeno-2-carboxilato de metilo (1,0 g 6,32 mmol) dio el 3-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)tiofeno-2-carboxilato de metilo (1,9 g, 100%) en forma de un aceite de color ámbar. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,81 (d, J=5,5 Hz, 1H), 7,11 (d, J=5,5 Hz, 1H), 6,91 (t, J=5,5 Hz, 1H), 4,12 (t, J=6,0 Hz, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,27 (q, J=5,9 Hz,

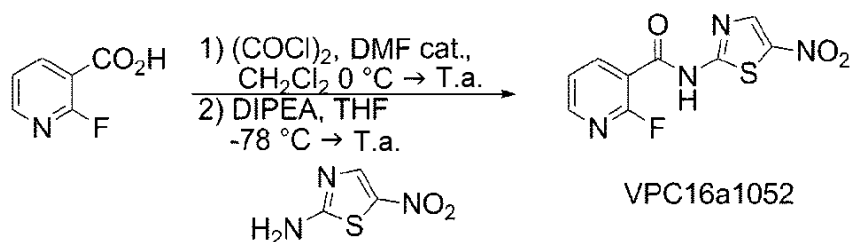
2H), 1,37 (s, 9H); RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 161,3, 160,9, 155,6, 132,0, 118,2, 108,7, 77,9, 70,0, 51,4, 39,4, 28,2; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}+\text{Na}]^+$ 324,0876, encontrado 324,0877. El método D con 3-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)tiófeno-2-carboxilato de metilo (70 mg, 0,23 mmol) dio el ácido 3-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)tiófeno-2-carboxílico (63 mg, 95%) en forma de un sólido blanco. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,43 (s ancho, 1H), 7,74 (d, $J=5,5$ Hz, 1H), 7,08 (d, $J=5,5$ Hz, 1H), 6,91 (t, $J=5,5$ Hz, 1H), 4,10 (t, $J=6,1$ Hz, 2H), 3,25 (q, $J=6,0$ Hz, 2H), 1,37 (s, $J=12,2$ Hz, 9H); RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 162,4, 160,3, 155,7, 131,3, 118,4, 110,5, 77,9, 70,0, 39,5, 28,2; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{S}+\text{Na}]^+$ 310,0720, encontrado 310,0719. El método B con ácido 3-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)tiófeno-2-carboxílico (100 mg, 0,35 mmol) y DMAP cat. a 55°C dio el 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)tiófen-3-iloxi)etilcarbamato de *tert*-butilo (100 mg, 69%) en forma de un sólido de color beige. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,30 (s ancho, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,06 (d, $J=5,5$ Hz, 1H), 7,29-7,22 (m, 2H), 4,34 (t, $J=5,1$ Hz, 2H), 3,39 (q, $J=5,2$ Hz, 2H), 1,33 (s, 9H); RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 160,9, 159,4, 159,1, 155,8, 142,5, 142,2, 134,9, 117,7, 78,0, 71,9, 39,4, 28,1; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2+\text{H}]^+$ 415,0741, encontrado 415,0745. El método E con 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)tiófen-3-iloxi)etilcarbamato de *tert*-butilo (25 mg, 0,06 mmol) dio el compuesto del título VPC162125 (21 mg, 100%) en forma de un sólido amarillo claro. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,62 (s ancho, 1H), 8,70 (s ancho, 1H), 8,51 (s ancho, 3H), 8,07 (s ancho, 1H), 7,27 (s ancho, 1H), 4,52 (s ancho, 2H), 3,26 (s ancho, 2H); RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 160,9, 159,3, 157,8, 142,4, 141,9, 134,8, 117,5, 111,8, 68,7, 38,2; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2+\text{H}]^+$ 315,0216, encontrado 315,0217.



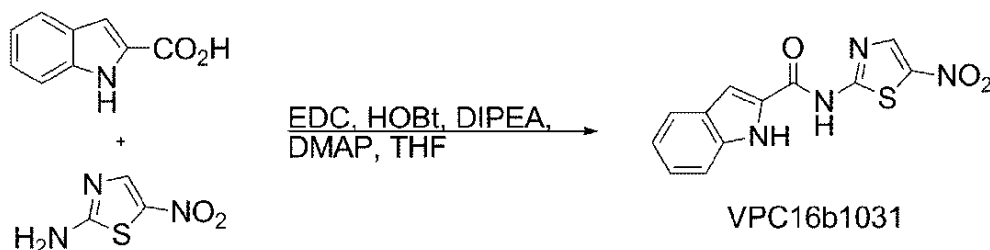
20 Hidrocloruro de (S)-2-amino-N-(5-nitrotiazol-2-il)-3-fenilpropanamida (VPC16a1028 *no es de la invención): El método B con Boc-L-fenilalanina (100 mg, 0,38 mmol) dio el (S)-1-(5-nitrotiazol-2-ilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-ilcarbamato de *tert*-butilo (107 mg, 72%) en forma de un sólido de color beige. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,37 (s, 1H), 8,64 (s, 1H), 7,44 (d, $J=7,5$ Hz, 1H), 7,35-7,18 (m, 5H), 4,47 (s ancho, 1H), 3,03 (dd, $J=13,6$, 4,3 Hz, 1H), 2,92-2,75 (m, 1H), 1,31 (s, 9H); RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 173,0, 161,5, 155,5, 142,7, 142,0, 137,2, 129,3, 128,2, 126,6, 78,5, 56,2, 36,5, 28,1; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}+\text{Na}]^+$ 415,1047, encontrado 415,1057. El método E con (S)-1-(5-nitrotiazol-2-ilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-ilcarbamato de *tert*-butilo (30 mg, 0,08 mmol) dio el compuesto del título VPC16a1028 (25 mg, 99%) en forma de un sólido marrón. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,83 (s ancho, 1H), 8,71 (s ancho, 3H), 8,67 (s, 1H), 7,35-7,30 (m, 2H), 7,27 (t, $J=8,5$ Hz, 3H), 4,44 (t, $J=6,4$ Hz, 1H), 3,24 (dd, $J=13,8$, 6,4 Hz, 1H), 3,17 (dd, $J=13,8$, 7,5 Hz, 1H); RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 169,0, 160,6, 142,5, 134,1, 129,5, 128,7, 127,4, 53,8, 36,5; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}+\text{H}]^+$ 292,0703, encontrado 292,0711.



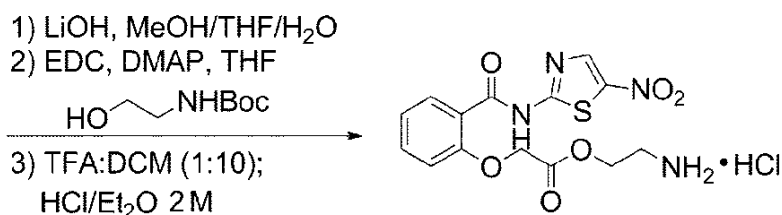
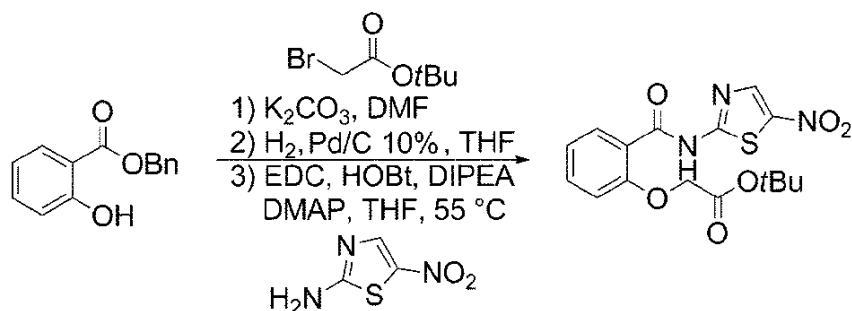
35 2-(5-Nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenilcarbomato de *tert*-butilo (VPC162047). El método B con ácido 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)benzoico^[1] (100 mg, 0,42 mmol) y DMAP catalítico en DMF (en lugar de THF) dio el compuesto del título VPC162047 (108 mg, 71%) en forma de un sólido de color beige. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,47 (s ancho, 1H), 9,65 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 7,77 (d, $J=7,7$ Hz, 1H), 7,70 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 7,55 (t, $J=7,7$ Hz, 1H), 7,19 (t, $J=7,6$ Hz, 1H), 1,39 (s, 9H); RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167,9, 162,6, 152,7, 142,5, 141,7, 138,2, 132,9, 129,4, 122,7, 122,4, 121,4, 79,8, 27,9; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}+\text{H}]^+$ 387,0734, encontrado 387,0745.



2-Fluoro-*N*-(5-nitrothiazol-2-il)nicotinamida (VPC16a1052). Se disolvió ácido 2-fluoronicotínico (100 mg, 0,71 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) con una gota de DMF (catalítico) y se enfrió a 0°C, y después se añadió gota a gota (COCl)₂ (0,18 ml, 2,12 mmol) a la disolución con agitación. La suspensión se dejó calentar a temperatura ambiente durante 2 h y después se concentró hasta sequedad usando hexanos para separar el exceso de (COCl)₂. El cloruro de ácido resultante se disolvió en THF (7 ml) y se añadió DIPEA (0,26 ml, 1,49 mmol). La solución se enfrió a -78°C y después se añadió 2-amino-5-nitrothiazol (108 mg, 0,78 mmol) en una porción y la solución se mantuvo a -78°C durante 10 min y después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 días hasta que se consideró completada por análisis por TLC. La suspensión resultante se inactivó con HCl 2 M en Et₂O (0,78 ml, 1,56 mmol) y se concentró hasta sequedad y después se purificó por cromatografía en columna (MeOH/CH₂Cl₂ al 1%) para obtener el compuesto del título VPC16a1052 (118 mg, 62%) en forma de un sólido amarillo. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,77 (s ancho, 1H), 8,70 (s, 1H), 8,54-8,44 (m, 1H), 8,41-8,35 (m, 1H), 7,63-7,50 (m, 1H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,0 (d, J_{CF}=5,9 Hz), 161,5, 159,4 (d, J_{CF}=242 Hz), 151,3 (d, J_{CF}=15,2 Hz), 142,4, 142,3, 122,3 (d, J_{CF}=4,1 Hz), 115,9 (d, J_{CF}=28,5 Hz); HRMS (ESI) calculado para [C₉H₅FN₄O₃S+H]⁺ 269,0139, encontrado 269,0143.

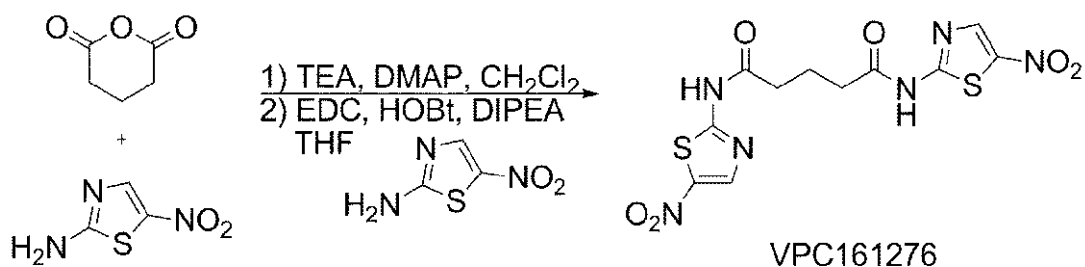


N-(5-Nitrothiazol-2-il)-1*H*-indol-2-carboxamida (VPC16b1031 *no es de la invención). El método B con ácido 1*H*-indol-2-carboxílico (75 mg, 0,47 mmol) con DMAP cat. dio el compuesto del título VPC16b1031 (92 mg, 69%) en forma de un sólido naranja. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,65 (s, 1H), 12,10 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,70 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,48 (d, J=8,2 Hz, 1H), 7,29 (t, J=7,5 Hz, 1H), 7,10 (t, J=7,4 Hz, 1H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,4, 160,1, 142,8, 141,9, 137,9, 128,1, 126,8, 125,3, 122,5, 120,5, 112,6, 107,6; HRMS (ESI) calculado para [C₁₂H₈N₄O₃S+H]⁺ 289,0390, encontrado 289,0396.



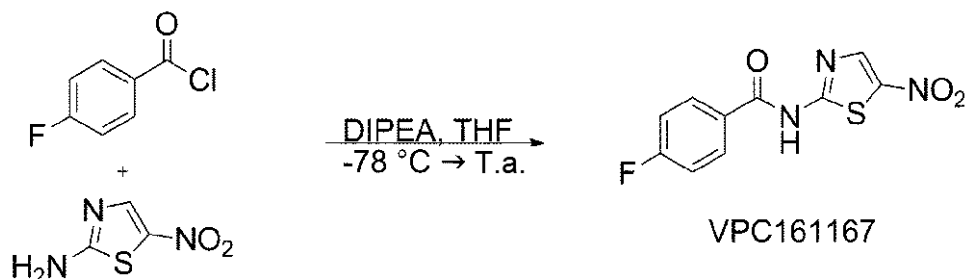
VPC162082

Hidrocloreto de 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenoxi)acetato de 2-aminoetilo (VPC162082). El método C con 2-hidroxibenzoato de bencilo (1,05 ml, 5,2 mmol) y 2-bromoacetato de *tert*-butilo (en lugar de bromuro de Boc-aminoetilo) dio el 2-(2-*tert*-butoxi-2-oxoetoxi)benzoato de bencilo (1,82 g, 98%) en forma de un aceite de color ámbar. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,69 (dd, J=7,6, 1,3 Hz, 1H), 7,65-7,42 (m, 3H), 7,42-7,19 (m, 3H), 7,13-6,97 (m, 2H), 5,31 (s, 2H), 4,76 (s, 2H), 1,40 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,4, 165,4, 156,7, 136,2, 133,3, 130,7, 128,4, 127,9, 127,7, 120,8, 120,5, 113,5, 81,5, 65,9, 65,5, 27,6; HRMS (ESI) calculado para [C₂₀H₂₂O₅+Na]⁺ 365,1359, encontrado 365,1367. En una solución de THF anhidro (42 ml) y Pd/C al 10% (0,15 g) se cargó 2-(2-*tert*-butoxi-2-oxoetoxi)benzoato de bencilo (1,56 g, 4,29 mmol). Se retiró el aire del sistema y la reacción se barrió con hidrógeno. Este procedimiento se repitió tres veces antes de poner la reacción con un balón de hidrógeno a presión y temperatura atmosféricas durante 22 h. Después de este tiempo, la reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite® y la torta de filtración se lavó con THF (20 ml). El filtrado se concentró a presión reducida para dar el ácido 2-(2-*tert*-butoxi-2-oxoetoxi)benzoico (1,14 g, 99%) en forma de un sólido amorfo marrón. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,61 (s ancho, 1H), 7,67 (dd, J=7,6, 1,5 Hz, 1H), 7,56-7,40 (m, 1H), 7,11-6,92 (m, 2H), 4,74 (s, 2H), 1,41 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,6, 167,1, 156,5, 132,8, 130,8, 121,6, 120,8, 113,5, 81,5, 65,6, 27,7; HRMS (ESI) calculado para [C₁₃H₁₆O₅+Na]⁺ 275,0890, encontrado 275,0898. El método B con ácido 2-(2-*tert*-butoxi-2-oxoetoxi)benzoico (200 mg, 0,79 mmol) dio el 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenoxi)acetato de *tert*-butilo (VPC162035) (178 mg, 59%) en forma de un sólido amarillo claro. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,71 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 7,83 (dd, J=7,7, 1,5 Hz, 1H), 7,69-7,54 (m, 1H), 7,26-7,10 (m, 2H), 4,89 (s, 2H), 1,44 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,6, 165,0, 161,3, 155,7, 142,7, 142,1, 134,4, 130,8, 121,7, 120,4, 113,6, 82,1, 66,0, 27,7; HRMS (ESI) calculado para [C₁₆H₁₇N₃O₆S+H]⁺ 380,0911, encontrado 380,0936. El método D con 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenoxi)acetato de *tert*-butilo (100 mg, 0,26 mmol) dio el ácido 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenoxi)acético (VPC162042) (78 mg, 92%) en forma de un sólido de color beige. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,93 (s ancho, 2H), 8,67 (s, 1H), 7,87 (dd, J=7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,72-7,57 (m, 1H), 7,24 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,18 (t, J=7,6 Hz, 1H), 4,94 (s, 2H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,5, 164,8, 161,4, 156,1, 142,8, 142,2, 134,7, 131,1, 121,9, 120,2, 114,2, 66,1; HRMS (ESI) calculado para [C₁₂H₉N₃O₆S+H]⁺ 324,0285, encontrado 324,0298. Se disolvieron EDC (30 mg, 0,15 mmol), DMAP catalítico, Boc-etanolamine (14 µl, 0,09 mmol) y ácido 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenoxi)acético (25 mg, 0,08 mmol) en THF (1 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante 21 h. Una vez considerada completada por análisis de TLC, la suspensión resultante se diluyó con EtOAc (30 ml) y se lavó con solución sat. de NaHCO₃ (3x20 ml), HCl 0,5 M (3x20 ml) y salmuera (2x20 ml) y después se secó (MgSO₄) seguido de filtración y evaporación hasta sequedad. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc/hexanos al 10-70%) para obtener el 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenoxi)acetato de 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilo (33 mg, 92%) en forma de un sólido de color beige. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,69 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 7,87 (dd, J=7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,69-7,57 (m, 1H), 7,25 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,19 (t, J=7,5 Hz, 1H), 6,97 (t, J=5,6 Hz, 1H), 4,98 (s, 2H), 4,19 (t, J=5,5 Hz, 2H), 3,21 (q, J=5,5 Hz, 2H), 1,35 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,4, 164,8, 161,3, 155,8, 142,79, 142,2, 134,6, 131,0, 121,8, 120,1, 113,8, 77,9, 65,9, 64,0, 38,8, 28,2; HRMS (ESI) calculado para [C₁₉H₂₂N₄O₆S+H]⁺ 467,1231, encontrado 467,1241. El método E con 2-(2-(5-nitrotiazol-2-ilcarbamoil)fenoxi)acetato de 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilo (24 mg, 0,05 mmol) dio el compuesto del título VPC162082 (19 mg, 93%) en forma de un sólido de color beige. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,69 (s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,11 (s, 3H), 7,87 (dd, J=7,7, 1,5 Hz, 1H), 7,65 (t, J=7,0 Hz, 1H), 7,28 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,20 (t, J=7,5 Hz, 1H), 5,04 (s, 2H), 4,41 (t, J=5,1 Hz, 2H), 3,15 (s, 2H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,3, 164,8, 161,3, 155,7, 142,8, 142,1, 134,6, 131,0, 121,9, 120,1, 113,8, 65,9, 61,4, 37,9; HRMS (ESI) calculado para [C₁₄H₁₄N₄O₆S+Na]⁺ 389,0526, encontrado 389,0535.

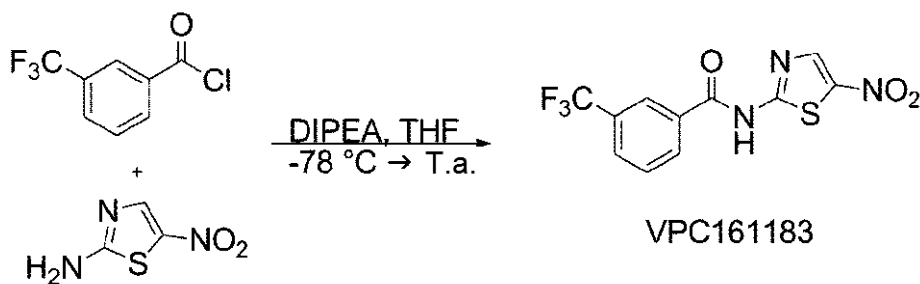


*N*¹,*N*⁵-Bis(5-nitrotiazol-2-il)glutaramida (VPC161276 *no es de la invención). Se disolvieron anhídrido glutárico (1,0 g, 8,8 mmol), TEA (1,35 ml, 9,6 mmol) y DMAP cat. en CH₂Cl₂ (7 ml). Después se añadió 2-amino-5-nitrotiazol (1,4 g, 9,64 mmol) y la solución se mantuvo a temperatura ambiente. Después de 18 h, la solución se diluyó con EtOAc (50 ml) y se extrajo con NaOH 1 M (3x30 ml). Las capas acuosas combinadas se lavaron con EtOAc (20 ml) y después se acidificó con HCl 12 M y posteriormente se extrajo con EtOAc (5x20 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2x20 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron hasta sequedad para dar el ácido 5-(5-nitrotiazol-2-ilamino)-5-oxopentanoico (1,13 g, 54%) en forma de un sólido naranja. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,59 (s ancho, 1H), 8,59 (s, 1H), 2,57 (t, J=7,4 Hz, 2H), 2,28 (t, J=7,3 Hz, 2H), 1,82 (quint., J=7,3 Hz, 2H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174,0, 172,8, 161,8, 142,8, 141,7, 34,1, 32,7, 19,6; HRMS (ESI) calculado para [C₈H₉N₃O₅S+H]⁺ 260,0336, encontrado 260,0344. El método B con ácido 5-(5-nitrotiazol-2-ilamino)-5-oxopentanoico (30 mg, 0,12 mmol) dio el compuesto del título VPC161276 (23 mg, 46%) en forma de un sólido naranja. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,61 (s, 2H), 2,61 (t, J=7,2 Hz, 4H), 1,97 (quint., J=7,0 Hz, 2H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 172,8, 162,0, 142,8, 141,5, 34,0, 19,3; HRMS (ESI) calculado para $[C_{11}H_{10}N_6O_6S_2+H]^+$ 387,0176, encontrado 387,0185.

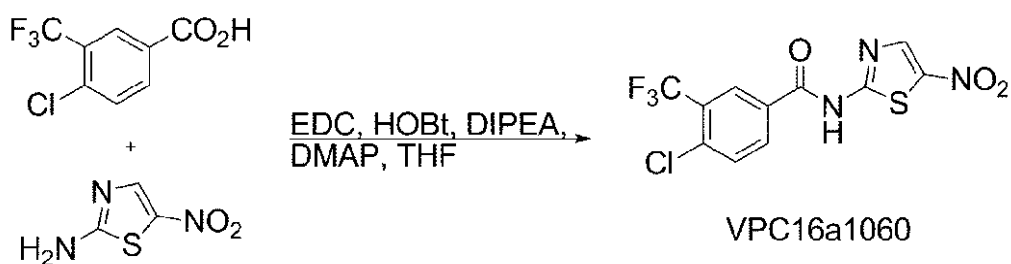


- 5 4-Fluoro-*N*-(5-nitrothiazol-2-il)benzamida (VPC161167). El método A con cloruro de 4-fluorobenzoilo (0,1 ml, 0,84 mmol) dio el compuesto del título VPC161167 (96 mg, 43%) en forma de un sólido marrón. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,62 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,22 (dd, $J=8,8, 5,4$ Hz, 2H), 7,43 (t, $J=8,9$ Hz, 2H); RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,3, 165,2 (d, $J_{CF}=150$ Hz), 162,6, 142,6, 142,1, 131,6 (d, $J_{CF}=9,5$ Hz), 127,4, 115,9 (d, $J_{CF}=22,1$ Hz); HRMS (ESI) calculado para $[C_{10}H_6FN_3O_3S+H]^+$ 268,0187, encontrado 268,0196.

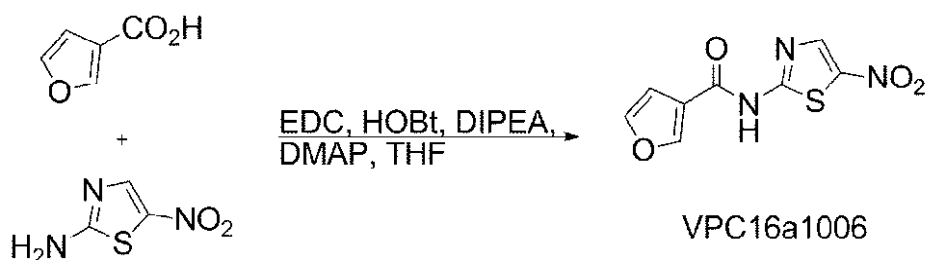


- 10 *N*-(5-Nitrothiazol-2-il)-3-(trifluorometil)benzamida (VPC161183). El método A con cloruro de 3-(trifluorometil)benzoilo (0,1 ml, 0,68 mmol) dio el compuesto del título VPC161183 (157 mg, 75%) en forma de un sólido amarillo claro. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,85 (s ancho, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,39 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 8,06 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 7,83 (t, $J=7,9$ Hz, 1H); RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,2, 162,4, 142,5, 142,2, 132,7, 131,9, 130,1, 129,8 (q, $J_{CF}=3,4$ Hz), 129,4 (q, $J_{CF}=32,6$ Hz), 125,2 (q, $J_{CF}=3,9$ Hz), 123,8 (q, $J_{CF}=273$ Hz); HRMS (ESI) calculado para $[C_{11}H_6F_3N_3O_3S+H]^+$ 318,0155, encontrado 318,0164.

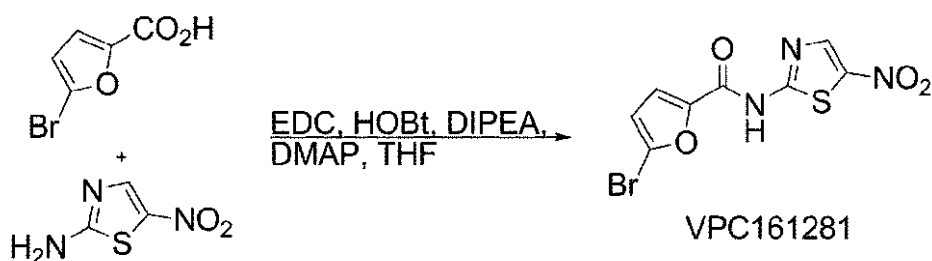
- 15 para $[C_{11}H_6F_3N_3O_3S+H]^+$ 318,0155, encontrado 318,0164.



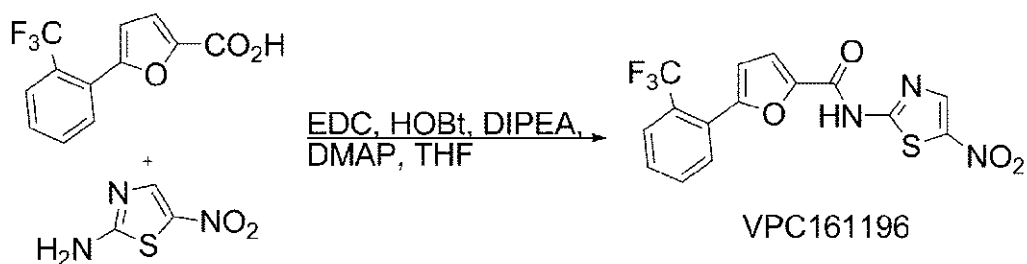
- 20 4-Cloro-*N*-(5-nitrothiazol-2-il)-3-(trifluorometil)benzamida (VPC16a1060). El método B con ácido 4-cloro-3-(trifluorometil)benzoico (100 mg, 0,45 mmol) dio el compuesto del título VPC16a1060 (126 mg, 80%) en forma de un sólido naranja. RMN 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,89 (s ancho, 1H), 8,71 (d, $J=0,6$ Hz, 1H), 8,58 (d, $J=1,9$ Hz, 1H), 8,35 (dd, $J=8,4, 2,1$ Hz, 1H), 7,94 (d, $J=8,4$ Hz, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 164,4, 162,4, 142,3, 135,7, 134,2, 132,3, 130,4, 127,9 (d, $J_{CF}=4,8$ Hz), 126,9 (q, $J_{CF}=31,6$ Hz), 122,5 (q, $J_{CF}=274$ Hz); HRMS (ESI) calculado para $[C_{11}H_5ClF_3N_3O_3S+H]^+$ 351,9765, encontrado 351,9775.



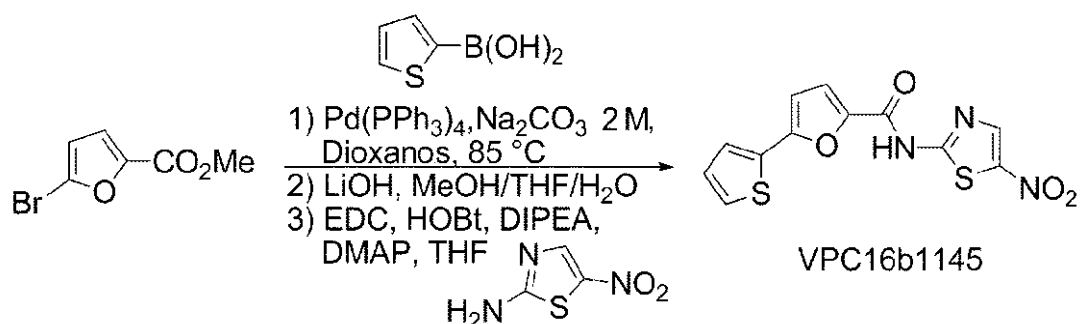
- 5 *N*-(5-Nitrotiazol-2-il)furan-3-carboxamida (VPC16a1006). El método B con ácido 3-furoico (100 mg, 0,89 mmol) dio el compuesto del título VPC16a1006 (105 mg, 49%) en forma de un sólido amarillo. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,44 (s ancho, 1H), 8,70 (s, 1H), 8,68 (dd, J=1,5, 0,8 Hz, 1H), 7,93-7,85 (m, 1H), 7,17-7,09 (m, 1H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 162,2, 161,1, 148,4, 145,1, 144,7, 142,6, 120,0, 109,1; HRMS (ESI) calculado para [C₈H₅N₃O₄S+H]⁺ 240,0074, encontrado 240,0082.



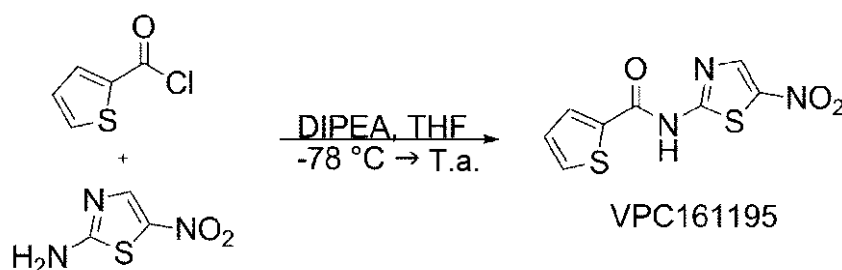
- 10 5-Bromo-*N*-(5-nitrotiazol-2-il)furan-2-carboxamida (VPC161281). El método B con ácido 5-bromo-2-furoico (100 mg, 0,52 mmol) dio el compuesto del título VPC161281 (72 mg, 44%) en forma de un sólido rojo. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,57 (s ancho, 1H), 8,63 (s, 1H), 7,73 (d, J=3,7 Hz, 1H), 6,89 (d, J=3,7 Hz, 1H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 161,9, 155,5, 146,6, 142,4, 142,1, 128,9, 120,5, 114,9; HRMS (ESI) calculado para [C₈H₄BrN₃O₄S+H]⁺ 317,9179, encontrado 317,918.



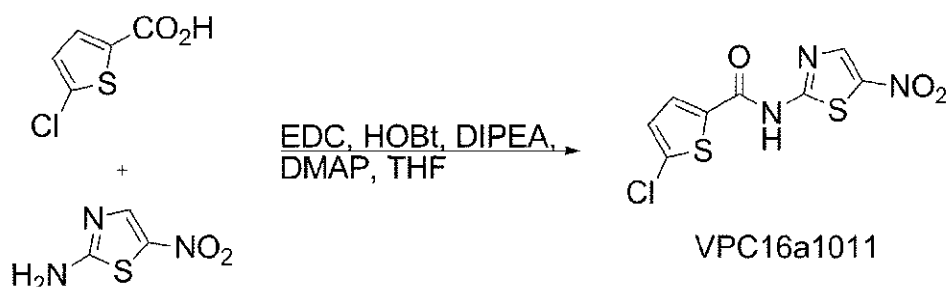
- 15 *N*-(5-Nitrotiazol-2-il)-5-(2-(trifluorometil)fenil)furan-2-carboxamida (VPC161196). El método B con ácido 5-(2-(trifluorometil)fenil)-2-furoico (100 mg, 0,39 mmol) dio el compuesto del título VPC161196 (82 mg, 55%) en forma de un sólido amarillo brillante. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 13,78 (s ancho, 1H), 8,70 (s, 1H), 8,03 (d, J=7,7 Hz, 1H), 7,92 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,87 (d, J=3,8 Hz, 1H), 7,84 (t, J=7,6 Hz, 1H), 7,71 (t, J=7,7 Hz, 1H), 7,05 (d, J=3,7 Hz, 1H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ 162,1, 156,3, 154,1, 144,9, 142,6, 142,1, 132,9, 131,1, 130,2, 127,2, 126,9 (q, J_{CF}=5,1 Hz), 125,8 (q, J_{CF}=31,7 Hz), 123,7 (q, J_{CF}=273 Hz), 119,9, 112,7; HRMS (ESI) calculado para [C₁₅H₈F₃N₃O₄S+H]⁺ 384,0260, encontrado 384,0270.



5 *N*-(5-Nitrotiazol-2-il)-5-(tiofen-2-il)furan-2-carboxamida (VPC16b1145). El 5-bromofuran-2-carboxilato de metilo (150 mg, 0,73 mmol), Pd(PPh₃)₄ (42 mg, 0,04 mmol), Na₂CO₃ 2 M (0,73 ml, 1,46 mmol) y ácido tiofen-2-ilborónico (121 mg, 0,95 mmol) en 1,4-dioxanos (7 ml) se calentaron a 90°C. Después la solución se mantuvo a esta temperatura
10 durante 26 h y después se enfrió y lavó con HCl 1 M (2x20 ml), salmuera (2x20 ml) y después se secó (MgSO₄) seguido de filtración y evaporación hasta sequedad. El residuo resultante después se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc/hexanos al 5%) para obtener el 5-(tiofen-2-il)furan-2-carboxilato de metilo (138 mg, 91%) en forma de un aceite amarillo. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,69 (dt, J=5,0, 0,9 Hz, 1H), 7,59 (dt, J=3,6, 0,8 Hz, 1H), 7,40 (dd, J=3,7, 0,6 Hz, 1H), 7,23-7,15 (m, 1H), 6,99 (d, J=3,7 Hz, 1H), 3,83 (s, 3H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158,1, 152,5, 142,3, 131,2, 128,5, 127,7, 125,8, 120,7, 107,5, 51,8; HRMS (ESI) calculado para [C₁₀H₈O₃S+H]⁺ 209,0267, encontrado 209,0272. El método D con 5-(tiofen-2-il)furan-2-carboxilato de metilo (100 mg, 0,48 mmol) dio el ácido 5-(tiofen-2-il)furan-2-carboxílico (92 mg, 99%) en forma de un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,16 (s ancho, 1H), 7,68 (dd, J=5,0, 1,1 Hz, 1H), 7,56 (dd, J=3,6, 1,1 Hz, 1H), 7,30 (d, J=3,6 Hz, 1H), 7,18 (dd, J=5,0, 3,7 Hz, 1H), 6,95 (d, J=3,6 Hz, 1H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159,1, 152,0, 143,5, 131,5, 128,5, 127,4, 125,5, 120,0, 107,4; HRMS (ESI) calculado para [C₉H₆O₃S+H]⁺ 195,0110, encontrado 195,0112.
15 El método B con ácido 5-(tiofen-2-il)furan-2-carboxílico (75 mg, 0,39 mmol) dio el compuesto del título VPC16b1145 (46 mg, 37%) en forma de un sólido amarillo. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,69 (s ancho, 1H), 8,72 (s, 1H), 7,81 (d, J=3,8 Hz, 1H), 7,73 (t, J=4,4 Hz, 2H), 7,22 (dd, J=4,9, 3,7 Hz, 1H), 7,07 (d, J=3,8 Hz, 1H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,2, 156,0, 153,2, 143,2, 142,5, 141,9, 131,1, 128,4, 128,1, 126,5, 120,7, 107,8; HRMS (ESI) calculado para [C₁₂H₇N₃O₄S₂+H]⁺ 321,9951, encontrado 321,9963.
20

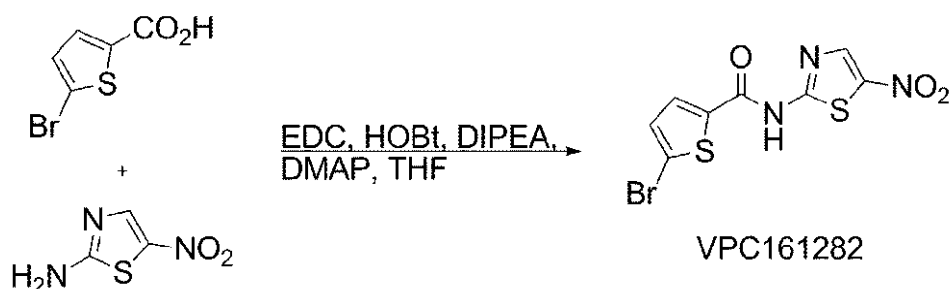


25 *N*-(5-Nitrotiazol-2-il)tiofeno-2-carboxamida (VPC161195). El método A con cloruro de tiofeno-2-carbonilo (0,1 ml, 0,94 mmol) dio el compuesto del título VPC161195 (85 mg, 36%) en forma de un sólido amarillo. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,70 (s ancho, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,32 (dd, J=3,8, 1,1 Hz, 1H), 8,09 (dd, J=5,0, 1,1 Hz, 1H), 7,30 (dd, J=5,0, 3,9 Hz, 1H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,5, 160,8, 142,6, 142,0, 135,7, 135,3, 132,4, 128,9; HRMS (ESI) calculado para [C₈H₅N₃O₃S₂+H]⁺ 255,9845, encontrado 255,9846.

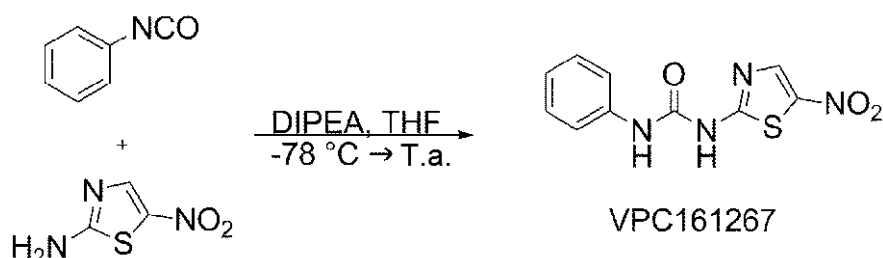


30 5-Cloro-*N*-(5-nitrotiazol-2-il)tiofeno-2-carboxamida (VPC16a1011). El método B con ácido 5-clorotiofeno-2-carboxílico (100 mg, 0,62 mmol) dio el compuesto del título VPC16a1011 (122 mg, 69%) en forma de un sólido amarillo. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,79 (s, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,17 (d, J=4,2 Hz, 1H), 7,35 (d, J=4,2 Hz, 1H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,4, 160,0, 142,3, 142,0, 137,1, 134,9, 132,4, 129,1; HRMS (ESI) calculado para

$[\text{C}_8\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}_2+\text{H}]^+$ 289,9455, encontrado 289,9465.

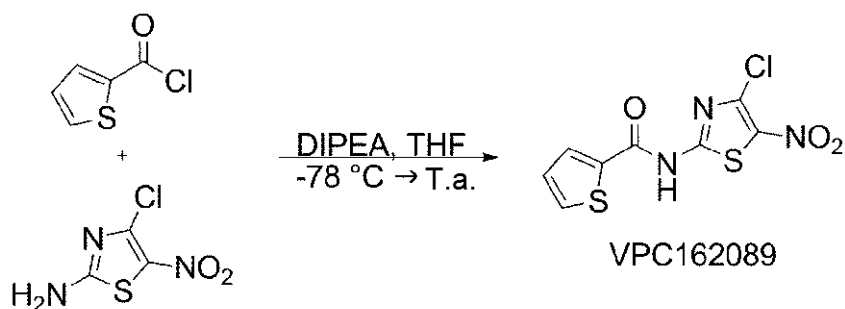


- 5 5-Bromo-*N*-(5-nitrothiazol-2-il)tiofeno-2-carboxamida (VPC161282). El método B con ácido 5-bromotiofeno-2-carboxílico (100 mg, 0,48 mmol) dio el compuesto del título VPC161282 (128 mg, 75%) en forma de un sólido marrón. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,77 (s ancho, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,11 (d, $J=4,1$ Hz, 1H), 7,44 (d, $J=4,1$ Hz, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 162,3, 159,9, 142,3, 142,0, 137,5, 133,1, 132,5, 121,4; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_8\text{H}_4\text{BrN}_3\text{O}_3\text{S}_2+\text{H}]^+$ 333,8950, encontrado 333,8959.

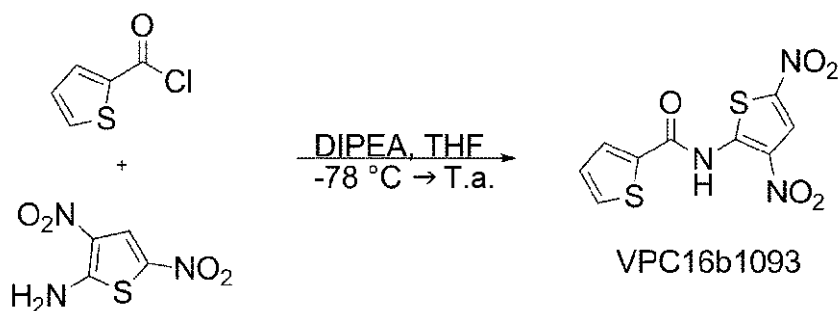


*no es de la invención

- 10 1-(5-Nitrothiazol-2-il)-3-fenilurea (VPC161223 *no es de la invención). El método A con isocianato de 4-fluorofenilo (en lugar de cloruro de ácido) (0,1 ml, 0,92 mmol) dio el compuesto del título VPC161223 (123 mg, 55%) en forma de un sólido marrón. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,58 (s ancho, 1H), 9,19 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,50 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), 7,35 (t, $J=7,7$ Hz, 2H), 7,17-7,03 (m, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,6, 151,4, 142,9, 141,2, 137,8, 129,1, 123,7, 119,2; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_3\text{S}+\text{H}]^+$ 265,0390, encontrado 265,0398.

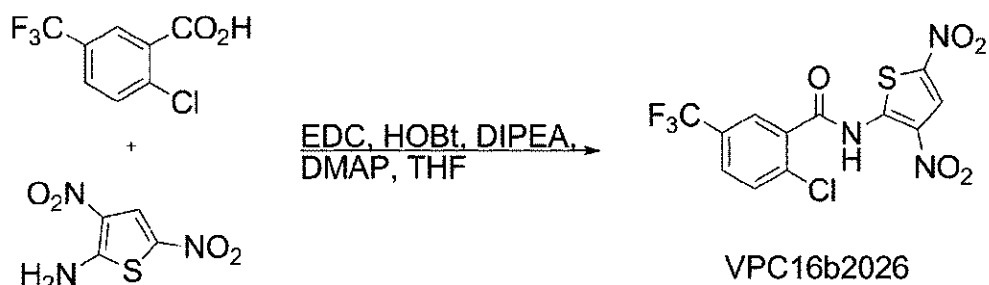


- 15 *N*-(4-Cloro-5-nitrothiazol-2-il)tiofeno-2-carboxamida (VPC162089). El método A con cloruro de tiofeno-2-carbonilo (0,05 ml, 0,42 mmol) y 2-amino-4-cloro-5-nitrothiazol^[2] dio el compuesto del título VPC162089 (59 mg, 49%) en forma de un sólido amarillo. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,87 (s ancho, 1H), 8,28 (dd, $J=3,8, 0,8$ Hz, 1H), 8,09 (dd, $J=4,9, 0,8$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J=4,8, 4,0$ Hz, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 161,2, 159,4, 138,2, 135,9, 135,2, 132,7, 129,0; HRMS (ESI) calculado para $[\text{C}_8\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}_2+\text{H}]^+$ 289,9455, encontrado 289,9467.
- 20



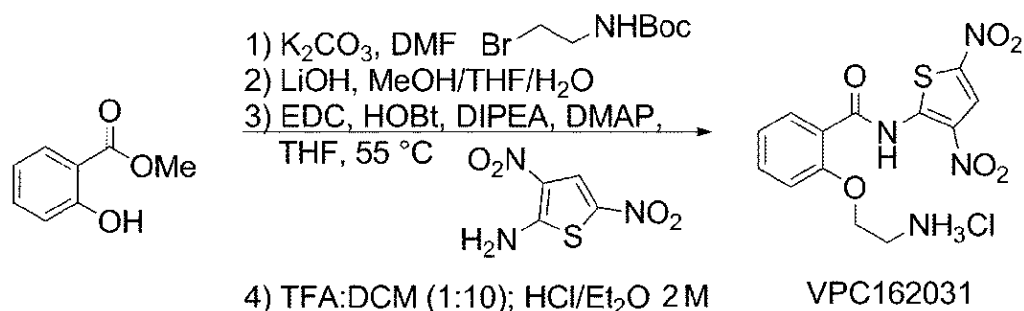
N-(3,5-Dinitrotiofen-2-il)tiofeno-2-carboxamida (VPC16b1093) El método A con cloruro de tiofeno-2-carbonilo (0,1 ml, 0,94 mmol) dio el compuesto del título VPC16b1093 (188 mg, 67%) en forma de un sólido marrón. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,52 (s, 1H), 8,15 (d, J=4,6 Hz, 1H), 8,05 (d, J=3,8 Hz, 1H), 7,34 (t, J=4,6 Hz, 1H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160,2, 146,9, 138,9, 136,2, 134,4, 133,1, 130,2, 129,1, 123,2; HRMS (ESI) calculado para [C₉H₅N₃O₅S₂+H]⁺ 299,9743, encontrado 299,9755.

5



2-Cloro-*N*-(3,5-dinitrotiofen-2-il)-5-(trifluorometil)benzamida (VPC16b2026). El método B con ácido 2-cloro-5-(trifluorometil)benzoico (100 mg, 0,45 mmol) dio el compuesto del título VPC16b2026 (99 mg, 56%) en forma de un sólido naranja. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,66 (s ancho, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,20 (d, J=0,8 Hz, 1H), 8,00 (ddd, J=8,5, 1,5, 0,8 Hz, 1H), 7,89 (d, J=8,5 Hz, 1H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,4, 145,8, 139,3, 135,2, 133,7, 131,2, 130,7, 129,4, 127,9 (q, J_{CF}=33,0 Hz), 127,4, 123,4 (q, J_{CF}=271 Hz), 123,1; HRMS (ESI) calculado para [C₁₂H₅ClF₃N₃O₅S+H]⁺ 395,9663, encontrado 395,9658.

10



15

2-(2-Aminoetoxi)-*N*-(3,5-dinitrotiofen-2-il)benzamida (VPC16b2031). El método C con 2-hidroxibenzoato de metilo (2,0 ml, 15,4 mmol) dio el 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)benzoato de metilo (4,55 g, 99%) en forma de un aceite de color ámbar. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,64 (dd, J=7,6, 1,1 Hz, 1H), 7,57-7,45 (m, 1H), 7,14 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,02 (t, J=7,5 Hz, 1H), 6,83 (t, J=5,3 Hz, 1H), 4,03 (t, J=5,9 Hz, 2H), 3,79 (s, 3H), 3,31 (q, J=5,8 Hz, 2H), 1,38 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157,4, 155,6, 133,4, 130,7, 120,6, 120,5, 114,0, 77,8, 67,4, 51,8, 39,3, 31,4, 28,2, 27,6; HRMS (ESI) calculado para [C₁₅H₂₁NO₅+Na]⁺ 318,1312, encontrado 318,1319. El método D con 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)benzoato de etilo (240 mg, 0,81 mmol) dio el ácido 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)benzoico (221 mg, 97%) en forma de un sólido blanco. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,56 (s, 1H), 7,65 (dd, J=7,6, 1,7 Hz, 1H), 7,48 (td, J=8,3, 1,7 Hz, 1H), 7,13 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,01 (t, J=7,5 Hz, 1H), 6,85 (t, J=5,3 Hz, 1H), 1,37 (s, 9H); RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,3, 157,3, 155,7, 133,1, 130,8, 121,7, 120,6, 114,1, 77,9, 67,6, 39,2, 28,2; HRMS (ESI) calculado para [C₁₄H₁₉NO₅+Na]⁺ 304,115, encontrado 304,1168. El método B con ácido 2-(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etoxi)benzoico (250 mg, 1,15 mmol) dio el 2-(2-(3,5-dinitrotiofen-2-ilcarbamoi)fenoxi)etilcarbamato de *tert*-butilo (325 mg, 68%) en forma de un sólido naranja. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,04 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,11 (d, J=6,6 Hz, 1H), 7,71 (dd, J=11,4, 4,3 Hz, 1H), 7,40 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,21 (t, J=7,5 Hz, 1H), 7,06 (t, J=5,7 Hz, 1H), 4,43 (t, J=4,8 Hz, 2H), 3,44 (q, J=4,7 Hz, 2H), 1,24 (s, 9H); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,5, 157,3, 155,7, 146,6, 139,0, 136,3, 132,3, 130,1, 123,0, 121,8, 117,3, 113,9, 77,8,

20

25

30

69,1, 38,6, 28,0; HRMS (ESI) calculado para $[C_{18}H_{20}N_4O_8S + Na]^+$ 475,0894, encontrado 475,0892. El método E con 2-(2-(3,5-dinitrofen-2-ilcarbamoil)fenoxi)etilcarbomato de *terc*-butilo (51 mg, 0,11 mmol) dio el compuesto del título VPC16b2031 (40 mg, 91%) en forma de un sólido amarillo. RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,77 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 8,46 (s ancho, 3H), 8,12 (dd, J=7,8, 1,5 Hz, 1H), 7,88-7,65 (m, 1H), 7,43 (d, J=8,5 Hz, 1H), 7,25 (t, J=7,5 Hz, 1H), 4,65 (t, J=4,8 Hz, 2H), 3,42 (s ancho, 2H); RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ 163,5, 156,6, 146,9, 139,1, 136,4, 132,5, 129,9, 122,9, 122,2, 117,3, 113,7, 66,5, 37,6.

Esquemas sintéticos adicionales

Las figuras 15-30 proporcionan esquemas sintéticos para compuestos descritos en la presente memoria. Los esquemas que generan compuestos "principales" en estas figuras están marcados en recuadros en negrilla.

10 Bibliografía para los procedimientos experimentales generales y preparación de compuestos.

[1] R. A. Forsch, J. E. Wright, A. Rosowsky, *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10, 2067.

[2] G. D. Beck, Stefan; Brandes, Wilhelm; Paulus, Wilfried, EP0402716 (A1) ed., 1990, p. 61.

Tablas de actividad para PFOR y para biopelícula:

15 Ensayo de CMI por dilución de caldo. Se usó un protocolo de dilución de caldo convencional en microplacas de 96 pocillos que contenían una dilución estándar de microorganismos a ensayar en 100 μ l del medio adecuado. Medio adecuado: *E. coli*, medio LB; cepas de *Staphilococcus*, Trypticase-soja; y parar *H. pylori* y *C. jejuni*, infusión de cerebro y corazón. Los compuestos a ensayar se pusieron con 32 μ g/ml en 200 μ l en el pocillo uno y después se hicieron diluciones seriadas para proporcionar un intervalo de 32 a 0,06. Los pocillos se puntuaron visualmente a las 24 h. El pocillo en el que no había crecimiento se registró como la CMI. *Clostridium difficile* se ensayó por métodos de difusión en agar y difusión con discos (Kirby Bower) en condiciones anaerobias en agar de Wilkins Chalgren. En estos ensayos, se midió la zona de crecimiento inhibido y se comparó con la proporción relativa de la zona registrada para la NTZ. En la dilución en agar, la CMI se puntuó como la concentración de compuesto que inhibía completamente el crecimiento bacteriano.

25 Los compuestos representativos se ensayaron en una serie de ensayos contra una serie de organismos descritos antes. Las siguientes tablas (tablas 3-18) proporcionan una estructura y fórmula originales y los análogos y derivados ensayados, así como los resultados de los diferentes ensayos usados. Los organismos ensayados incluyen *C. difficile*, *H. pylori*, *C. jejuni*, MRSA, *S. epidermidis*, y *E. coli*. *S. epidermidis* y *E. coli* se ensayaron en el ensayo de placa y de biopelícula. También se usó el ensayo de difusión con *C. difficile*. También se llevaron a cabo ensayos enzimáticos directos de PFOR. Todos los análogos y derivados no se ensayaron en todos los organismos ni en cada tipo de ensayo (el "-" en cada tabla significa que no se ensayó).

Se hicieron y ensayaron los siguientes tipos de compuestos:

Tabla 3 - Derivados alifáticos de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 4 - Análogos de amina alifáticos de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 5 - Análogos de aminoácido de 2-amino-5-nitrotiazol

35 Tabla 6 - Análogos antranílicos de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 7 - Análogos de piridina de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 8 - Análogos de indol de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 9 - Análogos de ácido carboxílico de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 10 - Análogos tipo dímero de 2-amino-5-nitrotiazol

40 Tabla 11 - Análogos de haluro de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 12 - Análogos monosustituídos de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 13 - Análogos disustituídos de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 14 - Análogos de furano de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 15 - Análogos de tiofeno de 2-amino-5-nitrotiazol

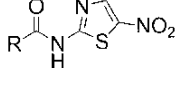










45 Tabla 16 - Isoésteres de amida de 2-amino-5-nitrotiazol

Tabla 17 - Análogos de 2-amino-4-cloro-5-nitrotiazol




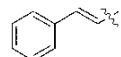
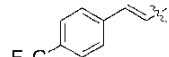
Tabla 18 - Análogos de 2-amino-3,5-dinitrofenol

En las siguientes tablas, los compuestos marcados con un asterisco (*) no son parte de la presente invención

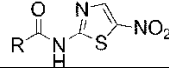
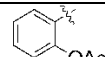
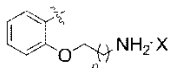
Derivados alifáticos de 2-amino-5-nitrotiazol

	CMI (µM)								Difusión con discos (%)	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. <i>difficile</i>	H. <i>pylori</i>	C. <i>jejuni</i>	MRSA	<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>			
R=					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 VPC161178	-	1,3	3,0	12,0	32,1	32,1	128,4	128,4	78 ± 3	73
 *VPC16a1010	62,6	0,7	11,4	125,2	31,3	-	125,2	31,3	53 ± 3	93
 n = 1 *VPC16a1013	-	21,6	1,8	121,5	22,8	-	121,5	-	-	-
 n = 2 *VPC16b1030	-	0,3	1,30	115,4	14,4	-	115,4	50,5	54,5 ± 0,5	-
 n = 3 *VPC16a1020	-	13,8	2,6	109,8	109,8	-	109,8	54,9	33 ± 3	-
 *VPC16b1032	-	1,7	26,6	13,8	13,8	-	110,6	-	-	-
 *VPC16a1018	-	0,7	10,7	106,2	106,2	26,5	106,2	53,1	-	-
 H ₃ C *VPC16a1033	-	3,5	14,0	171,0	21,4	21,4	42,7	42,7	-	-
 H ₃ C n = 2 *VPC16b1045	-	0,5	2,1	148,7	37,2	4,6	148,7	148,7	-	-

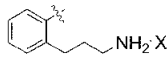
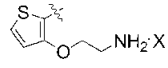
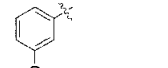
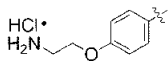
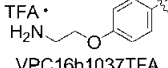
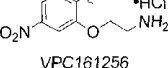
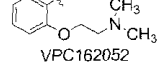
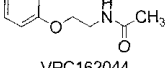
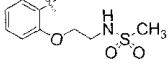
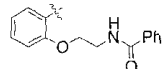
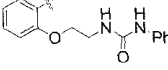
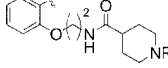
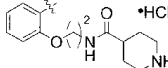
ES 2 528 946 T3

 $n = 4$ * VPC16a1007	65,8	1,4	5,5	131,5	32,9	-	131,5	131,5	56,5 ± 0,5	123
 $n = 6$ * VPC16b1046	-	0,8	106,9	59,0	11,1	7,4	117,9	88,4	54 ± 4	-
 $n = 8$ * VPC16b1043	-	1,2	3,9	106,9	106,9	1,7	106,9	106,9	-	-
 * VPC161200	-	0,3	2,7	116,2	29,1	14,5	116,2	116,2	-	93
 * VPC161239	-	0,6	93,2	93,2	2,9	-	93,2	-	-	-

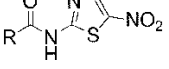

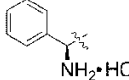
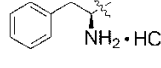
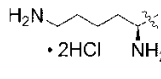
Análogos de amina alifáticos de 2-amino-5-nitrotiazol

 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%)	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	<i>C. difficile</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. jejuni</i>	MRSA	<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. difficile</i>	
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 $n = 1; X = \text{HCl}$ VPC161219	46,4	0,7	17,4	92,8	92,8	46,4	69,6	46,4	88 ± 4	114
$n = 1; X = \text{TFA}$ VPC161219TFA	-	1,88	14,2	75,8	75,8	-	75,8	-	81	-
$n = 2; X = \text{HCl}$ VPC162102HCl	-	1,0	8,4	89,2	44,6	-	89,2	-	74	-
$n = 2; X = \text{TFA}$ VPC162102TFA	-	0,9	13,8	73,3	73,3	-	73,3	-	79	-
$n = 3; X = \text{HCl}$ VPC162096HCl	-	2,0	5,4	85,8	42,9	-	85,8	-	111	-
$n = 3; X = \text{TFA}$ VPC162096TFA	-	1,7	6,7	71,0	35,5	-	71,0	-	111	-

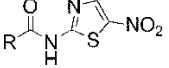

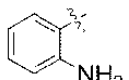
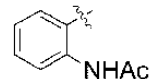
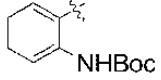
ES 2 528 946 T3

 X = HCl VPC162134	-	2,9	17,5	93,3	93,3	-	-	-	-	144
 X = HCl VPC162125	-	0,7	11,4	91,2	91,2	-	91,2	-	-	137
 VPC16a1021	-	4,4	34,8	92,8	92,8	-	92,8	-	-	-
 VPC16b1037	-	2,2	2,9	92,8	92,8	92,8	92,8	23,2	77 ± 4	78
 VPC16b1037TFA	-	2,4	3,6	75,8	37,9	-	75,8	-	84	-
 VPC161256	-	1,3	5,1	82,1	82,1	-	82,1	-	-	-
 VPC162052	-	1,5	17,8	95,1	95,1	-	95,1	-	-	-
 VPC162044	-	1,1	34,3	91,3	22,8	-	91,3	-	77	-
 VPC162045	-	0,6	51,8	82,8	62,1	-	82,8	-	51	-
 VPC162049	-	0,6	77,6	77,6	77,6	-	77,6	-	26	-
 VPC162048	-	0,4	74,9	74,9	74,9	-	74,9	-	31	-
 R = Boc VPC162059	-	0,7	61,6	61,6	61,6	-	61,6	-	38	-
 VPC162068	-	52,6	35,1	70,2	70,2	-	70,2	-	-	-

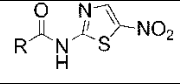
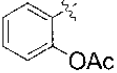




Análogos de aminoácido de 2-amino-5-nitrotiazol

 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 * VPC16a1027	-	76,3	38,1	101,7	101,7	101,7	101,7	25,4	-	-
 * VPC16a1028	-	18,3	36,5	97,3	97,3	97,3	97,3	48,7	-	-
 * VPC16a1032	-	69,3	92,4	92,4	92,4	92,4	92,4	0,1	-	-

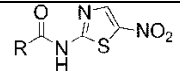
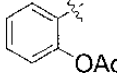
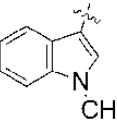
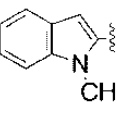
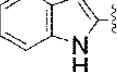
Análogos antranílicos de 2-amino-5-nitrotiazol

 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 VPC162055	-	2,4	11,4	121,1	90,8	-	45,4	-	83	-
 VPC162046b	-	6,9	41,6	55,5	111,0	-	111,0	-	-	-
 VPC162047	-	0,3	27,4	5,5	5,5	-	87,8	-	83	-

Análogos de piridina de 2-amino-5-nitrotiazol

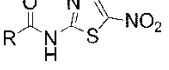

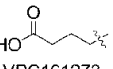
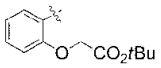
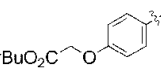
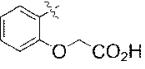
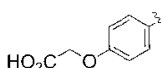
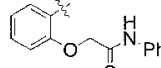
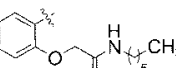
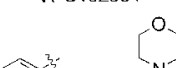
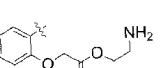
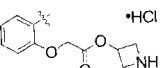
 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 * VPC161177	-	16,0	24,0	127,9	127,9	127,9	127,9	127,9	-	-
 VPC161176	-	4,0	71,9	127,9	127,9	63,9	127,9	127,9	-	-
 * VPC16a1053	-	3,7	14,9	119,3	119,3	-	119,3	-	-	-
 VPC16a1052	-	3,7	7,5	119,3	119,3	-	119,3	-	100	91

Análogos de indol de 2-amino-5-nitrotiazol

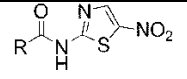
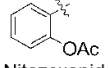
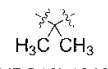
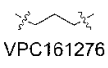
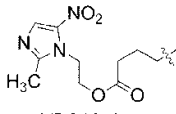
 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 * VPC16a1014	-	1,2	19,9	105,9	5,0	-	105,9	-	-	-
 * VPC16b1028	-	1,2	39,7	105,9	105,9	-	105,9	-	-	-
 * VPC16b1031	-	6,9	13,9	27,8	13,9	-	111,0	-	75	-

ES 2 528 946 T3

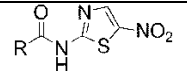
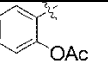
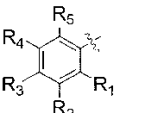
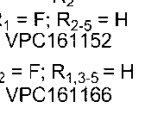
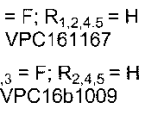
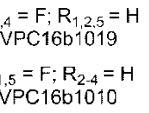
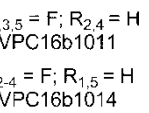
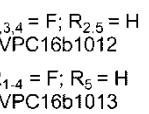
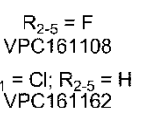
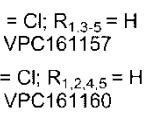


Análogos de ácido carboxílico de 2-amino-5-nitrotiazol

 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 • Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 • VPC161273	-	5,8	123,4	123,4		123,4	123,4	61,7	-	-
 VPC162035	-	1,0	84,4	84,3	84,3	-	84,3	-	0	-
 VPC162036	-	0,5	84,4	84,3	84,3	-	84,3	-	-	-
 VPC162042	-	49,5	99,0	99,0	99,0	-	99,0	-	-	-
 VPC162043	-	99,0	99,0	99,0	99,0	-	99,0	-	-	-
 VPC162056	-	0,9	80,3	80,3	80,3	-	80,3	-	-	-
 VPC162064	-	1,9	78,7	78,7	4,9	-	78,7	-	-	-
 VPC162065	-	2,3	36,7	73,5	27,6	-	73,5	-	-	-
 VPC162082	-	6,2	29,8	79,4	79,4	-	79,4	-	-	-
 VPC162083	-	24,1	77,1	77,1	77,1	-	77,1	-	-	-

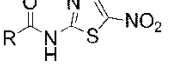
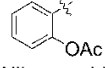
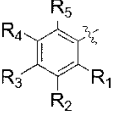
Análogos tipo dímero de 2-amino-5-nitrotiazol

 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 * VPC16b1048	-	20,7	82,8	82,8	82,8	41,4	82,8	82,8	-	-
 * VPC161276	-	5,2	31,1	82,8	82,8	1,3	82,8	82,8	-	-
 * VPC161277	-	1,8	29,1	77,6	77,6	2,4	77,6	77,6	-	-

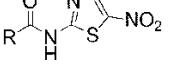
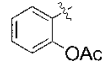
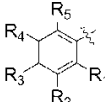
Análogos de haluro de 2-amino-5-nitrotiazol

 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 R ₁ = F; R _{2,5} = H VPC161152	-	0,5	5,6	18,7	119,7	59,9	119,7	119,7	-	-
 R ₂ = F; R _{1,3,5} = H VPC161166	-	0,9	11,2	16,8	22,5	59,9	119,7	59,9	-	-
 R ₃ = F; R _{1,2,4,5} = H VPC161167	-	0,9	2,8	8,4	15,0	29,9	119,7	119,7	89	99
 R _{1,3} = F; R _{2,4,5} = H VPC16b1009	-	0,4	7,0	28,0	42,1	-	112,2	-	-	-
 R _{3,4} = F; R _{1,2,5} = H VPC16b1019	-	1,8	5,3	10,5	28,0	-	84,1	-	-	-
 R _{1,5} = F; R _{2,4} = H VPC16b1010	-	0,7	14,0	28,0	28,0	-	112,2	-	-	-
 R _{1,3,5} = F; R _{2,4} = H VPC16b1011	-	4,9	9,9	39,6	52,8	-	105,5	-	-	-
 R _{2,4} = F; R _{1,5} = H VPC16b1014	-	1,2	4,9	29,7	66,0	-	105,5	-	-	-
 R _{1,3,4} = F; R _{2,5} = H VPC16b1012	-	0,8	9,9	33,0	33,0	-	105,5	-	-	-
 R _{1,4} = F; R ₅ = H VPC16b1013	-	1,2	4,7	6,2	12,5	-	99,6	-	-	-
 R _{2,5} = F VPC161108	-	7,4	23,6	8,8	47,2	6,6	94,3	47,2	-	-
 R ₁ = Cl; R _{2,5} = H VPC161162	-	0,3	7,8	3,9	20,9	20,9	83,4	83,4	-	-
 R ₂ = Cl; R _{1,3,5} = H VPC161157	-	1,0	6,5	7,8	31,3	20,9	83,4	41,7	-	-
 R ₃ = Cl; R _{1,2,4,5} = H VPC161160	-	0,7	6,5	2,0	26,1	5,2	62,6	41,7	-	-

Análogos monosustituidos de 2-amino-5-nitrotiazol

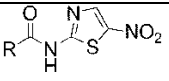
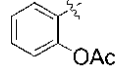
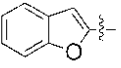
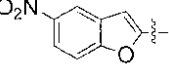





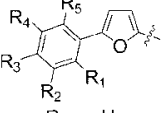
	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
R=	Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 + Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 R ₂ = CN; R _{1,3,5} = H * VPC161173	-	4,1	36,5	43,8	29,2	58,3	116,7	116,7	-	-
* R ₃ = CN; R _{1,2,4,5} = H VPC161086	-	9,1	43,8	14,6	21,9	4,6	87,5	58,3	-	74
R ₁ = CF ₃ ; R _{2,5} = H VPC161182	-	1,6	18,9	25,2	25,2	50,4	100,9	100,9	-	-
R ₂ = CF ₃ ; R _{1,3,5} = H VPC161183	12,6	3,5	4,7	3,2	12,6	25,2	37,8	31,5	95 ± 2	87
R ₃ = CF ₃ ; R _{1,2,4,5} = H VPC161184	-	1,6	4,7	100,9	12,6	12,6	63,0	12,6	90	-
R ₁ = NO ₂ ; R _{2,5} = H VPC161168	-	1,7	27,2	108,8	40,8	68,0	108,8	108,8	-	-
R ₂ = NO ₂ ; R _{1,3,5} = H VPC161169	-	1,3	27,2	10,2	10,2	3,4	81,6	108,8	-	-
R ₃ = NO ₂ ; R _{1,2,4,5} = H VPC161170	-	1,3	13,6	20,4	10,2	3,4	81,6	108,8	-	-
R ₁ = OMe; R _{2,5} = H VPC161192	-	1,8	17,9	114,6	114,6	114,6	114,6	57,3	-	-
R ₂ = OMe; R _{1,3,5} = H VPC161193	28,6	1,3	7,2	14,3	28,6	57,3	114,6	114,6	73 ± 1	82
R ₃ = OMe; R _{1,2,4,5} = H VPC161194	-	1,8	4,5	28,6	28,6	28,6	114,6	114,6	-	84
R ₃ = C(O)CF ₃ ; R _{1,2,4,5} = H VPC161175	23,2	4,3	69,5	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7	-	-
R ₂ = OCF ₃ ; R _{1,3,5} = H VPC16a1041	-	1,1	9,0	6,0	12,0	-	96,0	-	90	-

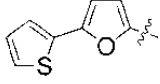
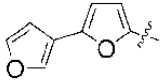
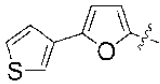
Análogos disustituidos de 2-amino-5-nitrotiazol

	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
R=					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 R ₁ = OAc; R ₃ = CN; R _{2,4,5} = H * VPC161076	-	24,1	96,3	96,3	96,3	48,2	96,3	96,3	-	-
R ₄ = CF ₃ ; R ₅ = Cl; R _{1,3} = H VPC16a1059	-	0,9	92,1	92,1	92,1	92,1	92,1	92,1	-	-
R ₁ = OMe; R ₃ = NO ₂ ; R _{2,4,5} = H VPC161093 R ₁ = OMe;	98,7	0,6	9,3	98,7	12,3	12,3	98,7	98,7	-	115
R ₄ = o,p-DifluoroPh; R _{2,3,5} = H VPC161171	-	0,8	40,9	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	-	-
R ₁ = OH; R ₂ = NO ₂ ; R _{3,5} = H * VPC161090	-	19,3	103,1	103,1	77,4	6,4	103,1	103,1	-	-
R ₁ = CF ₃ ; R ₃ = F; R _{2,4,5} = H VPC161127	-	3,4	23,9	8,9	23,9	13,4	95,5	95,5	-	-
R ₁ = NO ₂ ; R ₃ = CF ₃ ; R _{2,4,5} = H VPC16b1016	-	8,3	88,3	88,3	88,3	-	88,3	88,3	-	-
R ₂ = NO ₂ ; R ₃ = F; R _{1,5,6} = H VPC16b1017	-	1,6	51,2	76,9	51,2	-	102,5	102,5	-	-
R _{2,4} = CF ₃ ; R _{1,3,5} = H VPC16a1039	-	5,2	41,5	2,6	1,9	-	83,1	-	80	54**
R ₁ = Cl; R ₄ = CF ₃ ; R _{2,3,5} = H VPC16a1040	-	1,1	17,1	22,7	22,7	-	91,0	-	90	68
R ₄ = CF ₃ ; R ₅ = Cl; R _{1,3} = H VPC16a1059	-	0,9	5,7	11,4	11,4	-	91,0	-	90	-
R ₃ = Cl; R ₄ = CF ₃ ; R _{1,2,5} = H VPC16a1060	-	2,8	2,8	2,8	2,8	-	91,0	-	89	63**

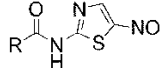
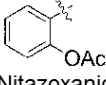

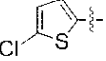
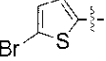


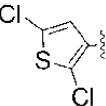
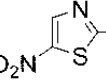
**Produce algo de precipitado en el extracto

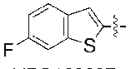
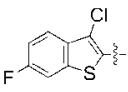
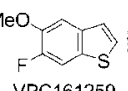
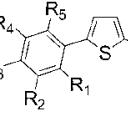
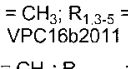
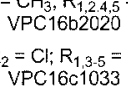
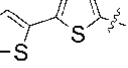
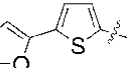
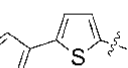
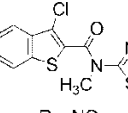
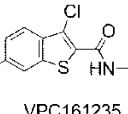
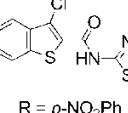
Análogos de furano de 2-amino-5-nitrotiazol

	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
R=					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 VPC161144	-	0,6	110,6	57,0	110,6	110,6	110,6	110,6	-	70
 VPC16a1019	-	4,5	4,5	47,9	23,9	-	95,7	-	77	-
 * VPC16a1006	33,4	0,8	12,5	50,2	33,4	-	133,8	133,8	97 ± 3	98
 VPC161124	-	1,0	8,4	50,2	66,9	66,9	133,8	33,4	100	82
 VPC161281	-	1,6	12,6	6,3	25,1	50,3	100,6	0,4	92	-
 VPC161164	-	2,8	20,2	3,8	15,1	20,2	60,5	40,3	-	56
 VPC16b1007	28,2	21,1	7,0	112,6	28,1	56,3	14,1	26,4	102 ± 8	-
 VPC16c1020 R ₁₋₅ = H	-	2,4	101,5	101,5	101,5	-	101,5	-	-	-
R ₃ = NO ₂ ; R _{1,2,4,5} = H VPC161189	-	6,9	16,7	88,8	11,1	11,1	88,8	88,8	-	-
R ₂ = NO ₂ ; R _{1,3,5} = H VPC161190	-	6,9	16,7	44,4	11,1	11,1	88,8	88,8	-	-
R ₁ = CF ₃ ; R _{2,5} = H VPC161196	-	1,1	8,5	2,8	5,7	5,7	90,8	90,8	70,5 ± 0,5	-
R ₂ = CF ₃ ; R _{1,3,5} = H VPC161197	-	1,1	8,5	11,4	5,7	5,7	90,8	90,8	-	-
R ₁ = CH ₃ ; R _{2,5} = H VPC16a1103	-	3,8	24,3	12,1	12,1	-	97,2	-	-	-
R ₂ = CH ₃ ; R _{1,3,5} = H VPC16b2014	-	2,3	97,2	97,2	97,2	-	97,2	-	-	-
R ₃ = CH ₃ ; R _{1,2,4,5} = H VPC16b2019	-	1,5	97,2	97,2	97,2	-	97,2	-	-	-
R ₂ = F; R _{1,3,5} = H VPC16b1115	-	1,5	24,0	24,0	12,0	-	96,0	-	-	-
R ₃ = F; R _{1,2,4,5} = H VPC16a1104	-	1,0	96,0	96,0	96,0	-	-	-	-	81
R ₁ = Cl; R _{2,5} = H VPC16b1118	-	1,4	11,4	11,4	5,7	-	91,5	-	-	-
R ₂ = Cl; R _{1,3,5} = H VPC16b1119	-	1,1	22,9	91,5	91,5	-	91,5	-	-	-
R ₃ = Cl; R _{1,2,4,5} = H	-									

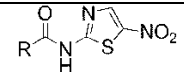
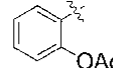
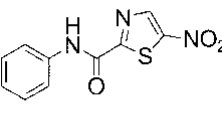
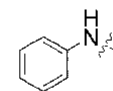
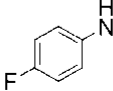
	-	1,1	8,6	2,9	2,9	-	91,5	-	60,5 ± 4,5	-
	-	1,5	92,7	92,7	92,7	-	92,7	-	-	-
	-	1,4	89,1	89,1	89,1	-	89,1	-	-	-
 VPC16b1145	-	1,9	12,5	12,4	12,4	-	99,6	-	-	-
 VPC16b1142	-	1,6	13,1	26,2	13,1	-	104,8	-	-	-
 VPC16b2022	-	6,2	99,6	99,6	99,6	-	99,6	-	-	-

Análogos de tiofeno de 2-amino-5-nitrotiazol

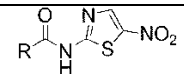
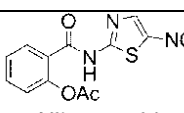
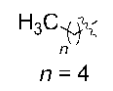
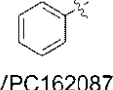
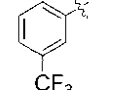
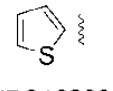
	CMI (µM)								Difusión con discos (%) <i>C. difficile</i>	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	<i>C. difficile</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. jejuni</i>	MRSA	<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>			
R=					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 VPC161195	31,3	2,9	2,9	15,7	31,3	62,7	125,4	125,4	97	88
 VPC16a1011	6,9	5,2	6,9	10,4	27,6	-	110,5	0,9	89	65
 VPC161282	-	3,0	9,9	4,5	23,9	47,9	95,8	0,1	90	-
 VPC16a1009	-	5,2	20,7	20,7	55,2	-	110,5	-	-	-
 * VPC16a1008	-	0,7	5,9	23,5	15,7	-	125,4	-	100	96
 * VPC161199	12,3	1,5	2,3	6,2	12,3	24,7	98,7	24,7	89	48
 * VPC161280	-	6,6	13,3	53,1	5,0	6,6	39,8	3,3	-	-

	13,1	2,5	9,8	6,6	13,1	19,7	104,8	104,8	81	-
	11,8	2,2	5,9	2,9	5,9	11,8	94,2	94,2	72	-
 VPC162037	-	3,1	6,2	61,9	49,5	-	99,0	-	70	-
 VPC161115	11,2	1,0	5,6	2,1	5,6	0,1	89,4	5,6	44	96
 VPC161259	-	2,1	11,3	11,3	11,3	-	90,6	-	-	-
 R ₂ = CH ₃ ; R _{1,3,5} = H VPC16b2011	-	2,2	92,6	92,6	92,6	-	92,6	-	-	-
 R ₃ = CH ₃ ; R _{1,2,4,5} = H VPC16b2020	-	0,9	92,6	92,6	92,6	-	92,6	-	-	-
 R ₂ = Cl; R _{1,3,5} = H VPC16c1033	-	0,7	5,5	87,5	87,5	-	-	-	-	84
 VPC16b2021	-	3,0	94,8	94,8	94,8	-	94,8	-	-	-
 VPC16b1148	-	7,8	12,4	24,9	12,4	-	99,6	-	-	-
 VPC16b1154	-	3,0	94,8	94,8	94,8	-	94,8	-	-	-
 R = NO ₂ VPC161269	-	1,0	53,8	86,1	86,1	86,1	86,1	21,5	-	-
 VPC161235	-	12,8	102,3	102,3	102,3	-	102,3	-	-	-
 R = p-NO ₂ Ph VPC161237	-	73,6	73,6	73,6	73,6	-	73,6	-	-	-

Isoésteres de amida de 2-amino-5-nitrotiazol

 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 VPC161232	-	6,0	8,0	32,1	16,0	-	128,4	-	0	-
 * VPC161223	-	1,4	30,3	30,3	30,3	-	121,1	-	-	-
 * VPC161267	-	0,9	21,3	56,7	28,3	28,3	113,4	56,7	-	-

Análogos de 2-amino-4-cloro-5-nitrotiazol

 R=	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 * Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 * VPC162080	-	0,9	3,6	43,2	14,4	-	115,2	-	72	116**
 VPC162087	-	8,8	7,1	112,8	35,2	-	112,8	-	66	107
 VPC162088	-	5,7	34,1	11,4	8,5	-	91,0	-	76	49***
 VPC162089	-	6,9	13,8	110,5	82,8	-	110,5	-	-	93

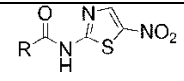
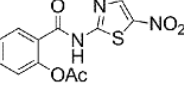
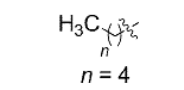
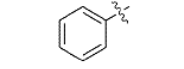
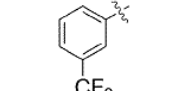
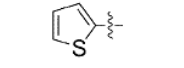
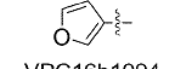
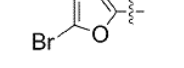
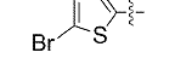
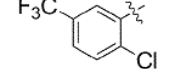
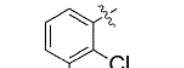
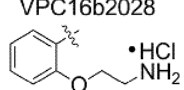
*No es compuesto de la presente invención

**Inhibición inicial bifásica seguido de velocidad no inhibida

***Produjo algo de precipitado en el extracto

5

Análogos de 2-amino-3,5-dinitrotiemo

	CMI (µM)								Difusión con discos (%) C. difficile	Ensayo enzimático directo de PFOR (%)
	C. difficile	H. pylori	C. jejuni	MRSA	S. epidermidis		E. coli			
R=					Placa	Biopelícula	Placa	Biopelícula		
 Nitazoxanida	52,1	13,0	39,1	39,1	52,1	32,5	104,1	26,0	100	100
 *VPC16b1089	-	2,6	0,9	55,7	20,9	-	111,4	-	42	148*
 VPC16b1090	-	1,3	0,9	109,1	5,1	-	109,1	-	0	100**
 VPC16b1092	-	0,5	2,1	1,4	0,2	-	88,6	-	59	87**
 VPC16b1093	-	2,5	1,0	26,7	13,4	-	106,9	-	43	143
 *VPC16b1094	-	2,7	0,4	56,5	28,2	-	113,0	-	53	126**
 VPC16b2023	-	2,1	2,8	33,1	88,4	-	-	-	-	94***
 VPC16b2025	-	2,6	2,6	63,5	15,9	-	-	-	-	98***
 VPC16b2026	-	0,8	2,5	30,3	15,2	-	-	-	-	100
 VPC16b2028	-	0,8	1,9	30,3	30,3	-	-	-	-	113
 VPC16b2031	-	1,9	1,3	82,3	25,7	-	-	-	-	162

*No es compuesto de la presente invención

**Inhibición inicial bifásica seguido de velocidad no inhibida

***Produjo algo de precipitado en el extracto

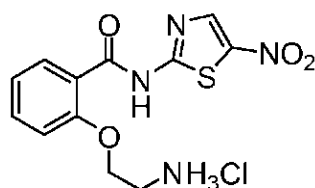
- 5 Ejemplo 4 - Comparación de amixina (VPC161219) con nitazoxanida en la inhibición de la multiplicación del virus de la hepatitis C en un modelo de replicón y comparación de la amixina con otros fármacos antiparasitarios en la eficacia en el tratamiento de la disentería amebiana en un modelo de infección de ratón.

- 10 La figura 31 proporciona los resultados de una comparación de la amixina con la nitazoxanida en la inhibición de la multiplicación del virus de la hepatitis C en un modelo de replicón. Los datos se expresan basándose en un ensayo que es la medición por PCR cuantitativa en tiempo real del ARN vírico y la inhibición dependiente de la dosis de fármaco de la multiplicación vírica. Se presentan los valores de CI₅₀ para la inhibición de la multiplicación vírica de

dos experimentos independientes que muestran que la amixina es superior a la NTZ por el modelo del replicón.

5 La figura 32 proporciona los resultados de una comparación de amixina con otros fármacos antiparasitarios para la eficacia en el tratamiento de la disentería amebiana en un modelo de infección de ratón. La comparación de diferentes fármacos en los recuentos de células de *E. histolytica* muestran que la amixina es superior a la nitazoxanida basado en la CMI. Los fármacos ensayados incluyen tinidazol, amixina219, metronidazol, nitazoxanida, pamoato de pirivinio, yodoquinol, emetina y cloroquina (Figura 32A). Los fármacos también se compararon por administración oral o parenteral (Figura 32B); * pval=0,02 (test exacto de Fisher) frente a PBS; †pval=0,02 (test exacto de Fisher) frente a metronidazol.

10 La estructura del nuevo compuesto de amixina (VPC161219), también denominado AMIX en la presente memoria es:

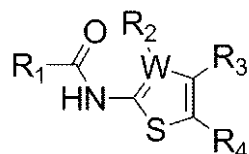


VPC161219

15 Aunque esta invención se ha descrito con referencia a realizaciones específicas, es evidente que el experto en la técnica puede diseñar otras realizaciones y variaciones de esta invención sin salirse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones. Las reivindicaciones adjuntas se pretende que sean interpretadas para incluir todas dichas realizaciones y variaciones equivalentes. Por consiguiente, la presente invención no se pretende que sea limitante de las realizaciones mostradas en la presente memoria sino que debe concedérsele el alcance más amplio de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



(I)

en donde:

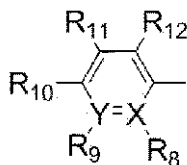
5 W se selecciona de N, C;

10 R₃ es H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, o aminoácido, en donde los grupos de R₁ y R₃ están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos donde los grupos sustituyentes son independientemente H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido;

15 R₂ está ausente cuando W es N, o cuando W es C, R₂ es H, acilo, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, nitro, cadena lateral de aminoácido, aminoácido, carbonilo y carboxi, en donde los grupos de R₂ y R₄ están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos donde los grupos sustituyentes son independientemente H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido;

R₄ es nitro; y

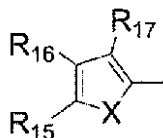
R₁ es



20 en donde:

X e Y se selecciona cada uno de C y N, y cuando X es N, R₈ está ausente y cuando Y es N, R₉ está ausente;

o R₁ es



en donde:

25 X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

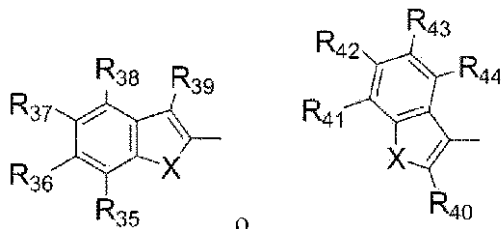
R₈ - R₁₂ y R₁₅ - R₁₇ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, aminoácido "-Z(CH₂)_nNR₁₃R₁₄",

30 R₁₃ y R₁₄ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido, en donde los grupos de R₁₃ y R₁₄ están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos donde los grupos sustituyentes son independientemente H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido;

Z se selecciona de CH₂, O, S, N;

n se selecciona de 1 a 6:

o R₁ es



5 en donde:

R₃₅ - R₃₉, R₄₀ - R₄₄ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido, y aminoácido;

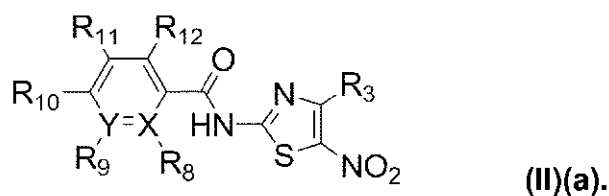
X se selecciona de O y S;

10 en donde los grupos R₈ - R₁₂, R₁₅ - R₁₇, R₃₅ - R₃₉, R₄₀ - R₄₄ están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos donde los grupos sustituyentes son independientemente H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido;

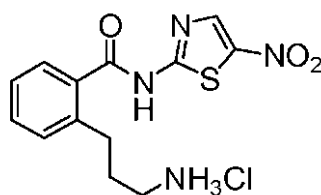
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 2. Un compuesto de fórmula (I) de la reivindicación 1, en donde W es N y R₂ está ausente.

3. Un compuesto de la reivindicación 1 o reivindicación 2 de fórmula (II)(a)

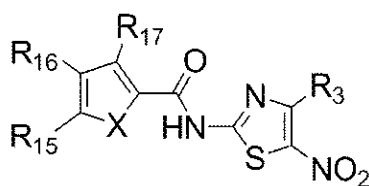


4. Un compuesto de la reivindicación 3, en donde dicho compuesto es



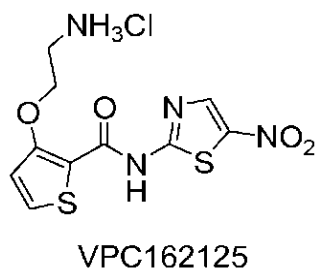
VPC162134

20 5. Un compuesto de la reivindicación 1 o reivindicación 2 de fórmula (III)(a)

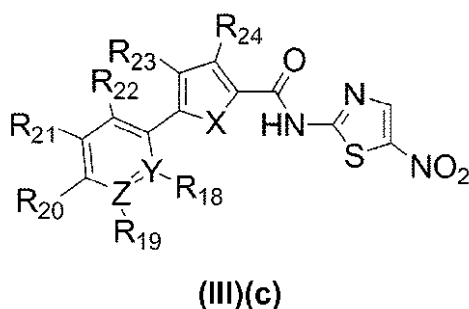


(III)(a).

6. Un compuesto de la reivindicación 5, en donde dicho compuesto es



7. Un compuesto de la reivindicación 5 de fórmula (III)(c)

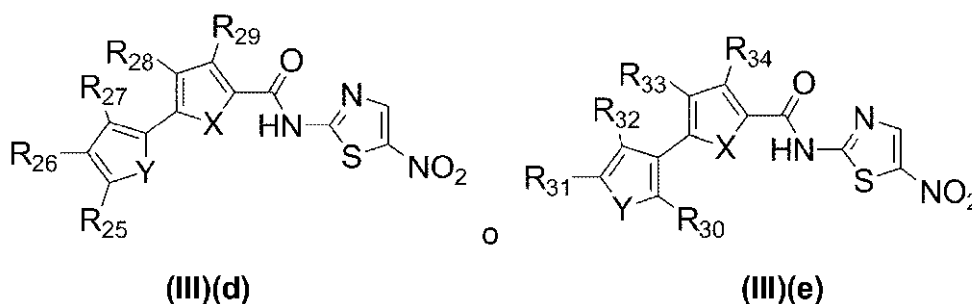


5 en donde R₁₈ - R₂₄ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido, en donde los grupos de R₁₈ - R₂₄ están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos donde los grupos sustituyentes son independientemente H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido;

X se selecciona de O, S, NH y NCH₃;

Y y Z se selecciona cada uno independientemente de C y N, y cuando Y es N, R₁₈ está ausente y cuando Z es N, R₁₉ está ausente.

8. Un compuesto de la reivindicación 5 de fórmula (III)(d) o (e)



en donde:

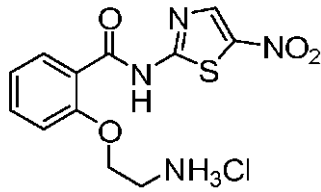
R₂₅ - R₂₉ y R₃₀ - R₃₄ se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido, en donde los grupos de R₂₅ - R₂₉ están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos donde los grupos sustituyentes son independientemente H, halógeno, hidroxilo, acilo, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, alcoxi, amino, amida, tiol, sulfona, sulfóxido, oxo, oxi, nitro, carbonilo, carboxi, cadena lateral de aminoácido y aminoácido;

X e Y se seleccionan independientemente de O, S, NH y NCH₃.

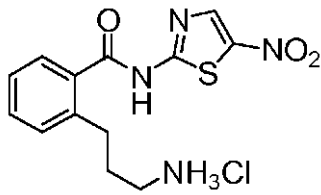
9. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde W es C y R₂ es nitro.

10. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde R₃ es H.

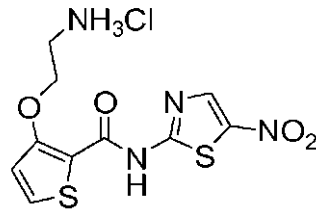
11. Un compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



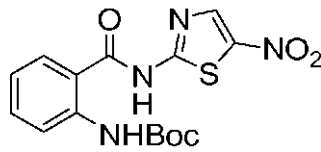
VPC161219 ,



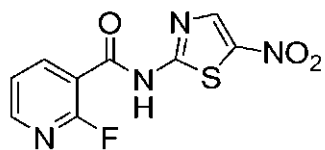
VPC162134 ,



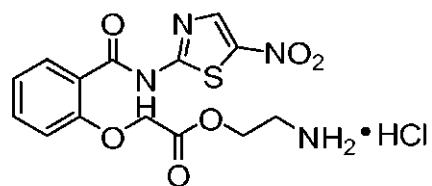
VPC162125 ,



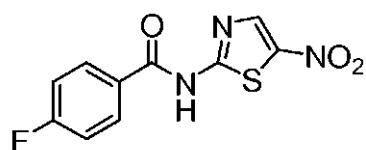
VPC162047 ,



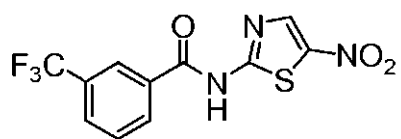
VPC16a1052



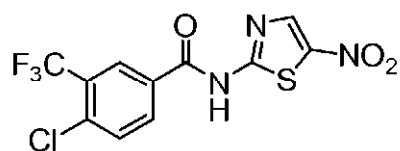
VPC162082



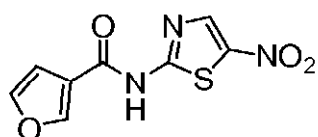
VPC161167



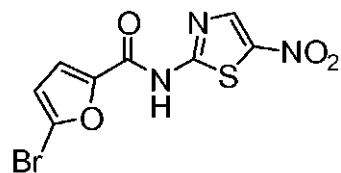
VPC161183



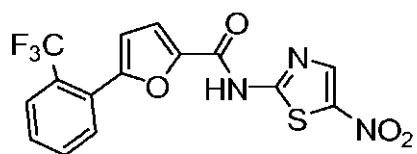
VPC16a1060



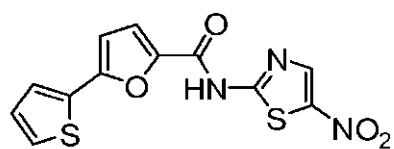
VPC16a1006



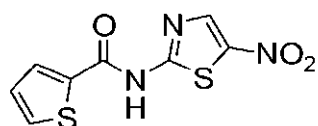
VPC161281



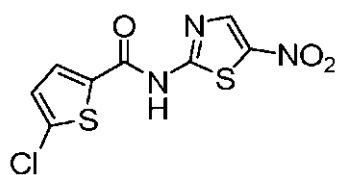
VPC161196



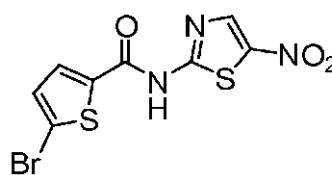
VPC16b1145



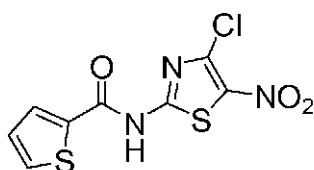
VPC161195



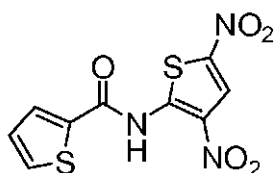
VPC16a1011 ,



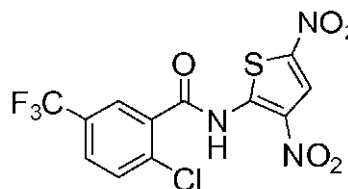
VPC161282 ,



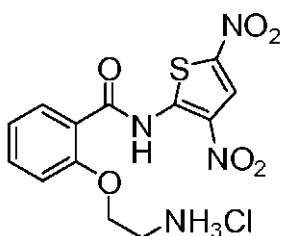
VPC162089 ,



VPC16b1093 ,



VPC16b2026 , y



VPC162031 ;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 13. Un kit para administrar un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, comprendiendo dicho kit al menos un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, opcionalmente suministrado como una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, un aplicador, y un material de instrucciones para el uso del mismo.
- 10 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, para usar en la prevención o tratamiento de una infección microbiana, tal como infección bacteriana, en particular de bacterias anaerobias, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus epidermidis* o *S. aureus*.
- 15 15. Una composición que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en NTZ, TIZ, AMIX y un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para usar en la prevención o tratamiento de una infección vírica.
16. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de la formación de

biopelícula bacteriana, en donde dicho inhibidor de formación de biopelícula se selecciona del grupo de compuestos que consiste en NTZ, TIZ, AMIX, y un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para usar en la inhibición de la formación de biopelícula bacteriana.

5 17. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en NTZ, TIZ, AMIX, un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en la prevención o tratamiento de la hepatitis, tal como la hepatitis C, disentería amebiana o infección parasitaria anaerobia.

18. Un compuesto de la reivindicación 1, para usar en la prevención o tratamiento de una infección por micobacterias, tal como infección por *M. tuberculosis*.