

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 516**

51 Int. Cl.:

**C07D 405/14** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**C07F 9/6558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2012 E 12702920 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2663557**

54 Título: **Inhibidores de la pirimidina girasa y la topoisomerasa IV**

30 Prioridad:

**20.06.2011 US 201161499134 P**

**14.01.2011 US 201161432965 P**

**04.08.2011 US 201161515174 P**

**04.08.2011 US 201161515249 P**

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

**11.09.2015**

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED  
(100.0%)**

**50 Northern Avenue  
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**LE TIRAN, ARNAUD;  
GRILLOT, ANNE-LAURE;  
CHARIFSON, PAUL S.;  
BENNANI, YOUSSEF LAAFIRET;  
O'DOWD, HARDWIN y  
PEROLA, EMANUELE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 545 516 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

Inhibidores de la pirimidina girasa y la topoisomerasa IV

Referencia a las aplicaciones relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio según 35 U.S.C. § 119 de la solicitud de patente provisoria de los Estados Unidos número de serie 61/432.965 presentada el 14 de enero de 2011, de la solicitud de patente provisoria de los Estados Unidos número de serie 61/515.174 presentada el 4 de agosto de 2011; de la solicitud de patente provisoria de los Estados Unidos número de serie 61/515.249 presentada el 4 de agosto de 2011; y de la solicitud de patente provisoria de los Estados Unidos número de serie 61/499.134 presentada el 20 de junio de 2011.

Antecedentes de la invención

10 Desde hace tiempo se reconoce la resistencia bacteriana a los antibióticos, y hoy se considera un problema grave para la salud en todo el mundo. Como resultado de la resistencia, algunas infecciones bacterianas son difíciles de tratar con antibióticos o incluso son intratables. Este problema se ha tornado especialmente serio con el desarrollo reciente de la resistencia a múltiples fármacos en ciertas cepas de bacterias, como *Streptococcus pneumoniae* (SP),  
 15 *Mycobacterium tuberculosis* y *Enterococcus*. La aparición de enterococos resistentes a la Vancomicina fue particularmente alarmante porque la Vancomicina era antiguamente el único antibiótico eficaz para el tratamiento de esta infección y había sido considerada para muchas infecciones como el fármaco de "último recurso". Si bien muchas otras bacterias resistentes a los fármacos no causan enfermedades mortales, como los enterococos, existe el temor de que los genes que inducen resistencia puedan extenderse a microorganismos más mortíferos como *Staphylococcus aureus*, donde ya es frecuente la resistencia a la Metilicina (De Clerq, et al., Current Opinion in Anti-  
 20 infective Investigational Drugs, 1999, 1, 1; Levy, "The Challenge of Antibiotic Resistance", Scientific American, marzo de 1998).

Otra preocupación es qué tan rápido puede diseminarse la resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, hasta la década de 1960 SP era universalmente sensible a la penicilina y en 1987 sólo el 0.02% de las cepas de SP en los Estados Unidos fueron resistentes. Sin embargo, en 1995 se informó que la resistencia de SP a la penicilina era  
 25 aproximadamente de siete por ciento y tan alta como 30% en algunas partes de los Estados Unidos (Lewis, FDA Consumer magazine (setiembre de 1995); Gershman en The Medical Reporter, 1997).

Los hospitales, en particular, sirven como centros para la formación y transmisión de microorganismos resistentes a los fármacos. Las infecciones que ocurren en los hospitales, conocidas como infecciones nosocomiales, se están volviendo un problema cada vez más grave. De los 2 millones de americanos infectados en hospitales cada año,  
 30 más de la mitad de estas infecciones tienen resistencia a al menos un antibiótico. El centro para el control de enfermedades informó que en 1992, más de 13 000 pacientes hospitalarios murieron de infecciones por bacterias que eran resistentes a la antibioticoterapia (Lewis, "The Rise of Antibiotic-Resistant Infections", FDA Consumer magazine, setiembre de 1995).

Como resultado de la necesidad de combatir a las bacterias resistentes a los fármacos y la falta creciente de fármacos disponibles, ha habido un interés resurgente de descubrir nuevos antibióticos. Una estrategia atractiva para el desarrollo de nuevos antibióticos es inhibir la ADN girasa y/o la topoisomerasa IV, enzimas bacterianas necesarias para la replicación del ADN y por lo tanto, necesaria para el crecimiento y la división de la célula bacteriana. La actividad de la girasa y/o la topoisomerasa IV también está asociada a eventos en la transcripción, la  
 35 reparación y la recombinación del ADN.

La girasa es una de las topoisomerasas, un grupo de enzimas que cataliza la interconversión de los isómeros topológicos del ADN (véase en general, Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed., capítulo 12, 1992, W. H. Freeman y Co.; Drlica, Molecular Microbiology, 1992, 6, 425; Drlica y Zhao, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61, pp. 377-392). La girasa controla el superenrollamiento del ADN y alivia el estrés topológico que se produce cuando las hebras de ADN de un dúplex parental se desenrollan durante el proceso de replicación. La girasa también cataliza la conversión del ADN dúplex circular cerrado, relajado, a la forma negativa de superhélice que es más favorable para su recombinación. El mecanismo de la reacción de superenrollamiento implica la  
 40 envoltura de la girasa alrededor de una región del ADN, la ruptura de la doble cadena en esa región, el pasaje a una segunda región del ADN a través de la rotura y la vuelta a unirse de las hebras rotas. Este mecanismo de escisión es característico de una topoisomerasa tipo II. La reacción de superenrollamiento es dirigida por la unión del ATP a la girasa. Después el ATP se hidroliza durante la reacción. Esta unión del ATP y la hidrólisis posterior causan cambios conformacionales en la girasa de unión al ADN que son necesarios para su actividad. También se encontró que el grado de superenrollamiento del ADN (o relajación) es dependiente de la relación ATP/ADP. En ausencia de ATP, la girasa es sólo capaz de relajar el ADN superenrollado.

La ADN girasa bacteriana es una proteína tetramérica de 400 kilodalton que consta de dos subunidades A (GyrA) y dos B (GyrB). La unión y la escisión del ADN se asocian a la GyrA, en vista de que el ATP es unido e hidrolizado por la proteína GyrB. La GyrB consta de un dominio amino-terminal que tiene actividad de ATPasa y un dominio carboxi-terminal que interacciona con la GyrA y el ADN. Por el contrario, las topoisomerasas eucariotas tipo II son homodímeros que pueden relajar superenrollamientos negativos y positivos, pero no pueden introducir  
 55

superenrollamientos negativos. Idealmente, un antibiótico basado en la inhibición de la ADN girasa bacteriana y/o la topoisomerasa IV sería selectivo para estas enzimas y relativamente inactivo contra las topoisomerasas eucariotas tipo II.

La topoisomerasa IV resuelve principalmente dímeros cromosómicos unidos al final de la replicación del ADN.

5 Los antibióticos quinolonas ampliamente utilizados inhiben la ADN girasa bacteriana (GyrA) y/o la topoisomerasa IV (ParC). Los ejemplos de las quinolonas incluyen los primeros compuestos como el ácido nalidíxico y el ácido oxolínico, así como las fluoroquinolonas posteriores más potentes, como norfloxacin, ciprofloxacina y trovafloxacin. Estos compuestos se unen a GyrA y/o ParC y estabilizan el complejo escindido, inhibiendo la función global de girasa, lo que lleva a la muerte celular. Las fluoroquinolonas inhiben las subunidades catalíticas de la girasa (GyrA) y/o la topoisomerasa IV (Par C) (véase Drlica y Zhao, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61, 377-392). Sin embargo, la resistencia a los fármacos también ha sido reconocida como un problema para esta clase de compuestos (informe de la OMS, "Use of Quinolones in Food Animals and Potential Impact on Human Health", 1998). Con las quinolonas, al igual que con otras clases de antibióticos, las bacterias expuestas a los primeros compuestos desarrollaron a menudo rápidamente una resistencia cruzada a compuestos más potentes de la misma clase.

Las subunidades asociadas responsables de suministrar la energía necesaria para el número de recambio/la reanudación catalítica de las enzimas vía hidrólisis de ATP son la GyrB (girasa) y la ParE (topoisomerasa IV), respectivamente (véase, Champoux, J.J., *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70, pp. 369-413. Los compuestos dirigidos a estos mismos sitios de unión del ATP en las subunidades GyrB y ParE serían útiles para tratar diversas infecciones bacterianas (véase, Charifson et al., *J. Med Quím.*, 2008, 51, págs. 5243-5263).

Existen inhibidores menos conocidos que se unen a GyrB. Los ejemplos incluyen cumarinas, novobiocina y cumermicina A1, ciclotialidina, cinodina y clerocidina. Se ha demostrado que las cumarinas se unen muy fuertemente a la GyrB. Por ejemplo, la novobiocina fabrica una red de enlaces de hidrógeno con la proteína y varios contactos hidrófobos. Si bien la novobiocina y el ATP parecen unirse dentro del sitio de unión del ATP, hay una superposición mínima en la orientación de unión de los dos compuestos. Las porciones superpuestas son la unidad azúcar de la novobiocina y la ATP adenina (Maxwell, *Trends in Microbiology*, 1997, 5, 102).

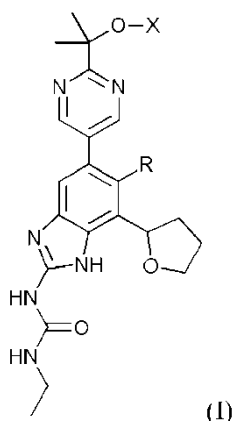
Para las bacterias resistentes a la cumarina, la mutación puntual más prevalente es un residuo de arginina superficial que se une al carbonilo del anillo de cumarina (Arg136 en GyrB de *E. coli*). Si bien las enzimas con esta mutación presentan menor superenrollamiento y actividad de ATPasa, también son menos sensibles a la inhibición por fármacos del tipo cumarina (Maxwell, *Mol. Microbiol.*, 1993, 9, 681).

A pesar de ser inhibidores potentes del superenrollamiento de la girasa las cumarinas no han sido ampliamente utilizadas como antibióticos. Generalmente no son adecuadas debido a su baja permeabilidad en las bacterias, la toxicidad eucariótica y la baja solubilidad en agua (Maxwell, *Trends in Microbiology*, 1997, 5, 102). Sería deseable tener un nuevo y eficaz inhibidor de GyrB y ParE que superara estos inconvenientes y, preferentemente no basara su actividad en la unión a Arg136. Un inhibidor de ese tipo sería un posible antibiótico atractivo, sin antecedentes de problemas de resistencia que abundan en otras clases de antibióticos.

Como la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en un problema importante de salud pública, existe una necesidad continua de desarrollar antibióticos más nuevos y más potentes. Más concretamente, existe la necesidad de antibióticos que representen una nueva clase de compuestos que no haya sido utilizada previamente para tratar infecciones bacterianas. Los compuestos dirigidos a los sitios de unión del ATP tanto en las subunidades GyrB (girasa) como ParE (topoisomerasa IV) serían útiles para tratar diversas infecciones bacterianas. Dichos compuestos serían particularmente útiles para tratar infecciones nosocomiales en hospitales en los que la formación y transmisión de bacterias resistentes se ha vuelto cada vez más frecuente. Además, existe la necesidad de nuevos antibióticos que tengan un amplio espectro de actividad con propiedades toxicológicas ventajosas.

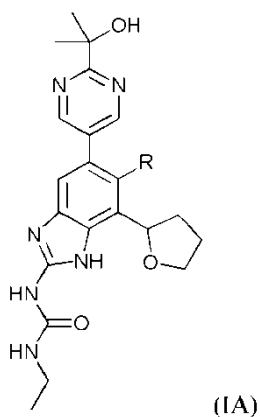
45 Resumen de la invención

La presente invención está dirigida a compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables, útiles como inhibidores de la girasa y/o la topoisomerasa IV. Los inhibidores de la girasa y/o la topoisomerasa IV de la presente invención pueden ser representados por la fórmula (I) o sus sales:



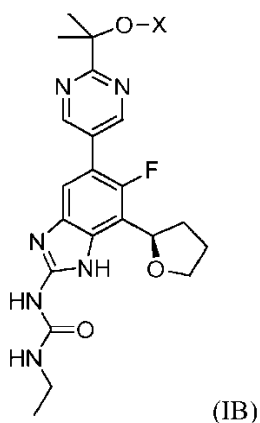
5 donde R es hidrógeno o flúor; X es hidrógeno,  $-PO(OH)_2$ ,  $-PO(OH)O-M^+$ ,  $-PO(O^-)_2 \cdot 2M^+$  o  $-PO(O^-)_2 \cdot D^{2+}$ ;  $M^+$  es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable; y  $D^{2+}$  es un catión divalente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de fórmula (I) o bien poseen un amplio espectro de actividad antibacteriana y propiedades toxicológicas ventajosas o son profármacos de compuestos que tienen dicha actividad.

La presente invención también se refiere a compuestos de fórmula (IA) o sus sales farmacéuticamente aceptables, útiles como inhibidores de la girasa y/o la topoisomerasa IV. Los compuestos de fórmula (IA) están comprendidos por la fórmula (I). Los compuestos de fórmula (IA) se pueden representar como:



10 donde R es hidrógeno o flúor. Los compuestos de fórmula (IA) poseen un amplio espectro de actividad antibacteriana y propiedades toxicológicas ventajosas.

La presente invención también se refiere a compuestos de fórmula (B), o sus sales farmacéuticamente aceptables, útiles como profármacos de los inhibidores de la girasa y/o la topoisomerasa IV. Los compuestos de fórmula (IB) están comprendidos por la fórmula (I). Los compuestos de fórmula (IB) se pueden representar como:



15 donde X es  $-PO(OH)_2$ ,  $-PO(OH)O-M^+$ ,  $-PO(O^-)_2 \cdot 2M^+$  o  $-PO(O^-)_2 \cdot D^{2+}$ ;  $M^+$  es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable; y  $D^{2+}$  es un catión divalente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos de fórmula (IB) son ésteres fosfato profármacos del compuesto (R)-1-etil-3-(6-fluoro-5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-

il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea, que posee un amplio espectro de actividad antibacteriana y propiedades toxicológicas ventajosas. Además de los compuestos provistos en este documento, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene un compuesto de fórmula (I) (que incluye otras fórmulas abarcadas por la fórmula (I) como las fórmulas (IA), (IB), (IC) e (ID)) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, un portador farmacéuticamente aceptable y otro agente terapéutico elegido entre un antibiótico, un antiinflamatorio, un inhibidor de las metaloproteinasas de matriz, un inhibidor de la lipoxigenasa, un antagonista de las citocinas, un inmunosupresor, un antineoplásico, un antiviral, una citocina, un factor de crecimiento, un inmuno modulador, una prostaglandina o un compuesto antihiperproliferación vascular.

En otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto o a una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en un método de tratamiento de una infección bacteriana en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en un método de tratamiento de una infección bacteriana en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un antibiótico, un antiinflamatorio, un inhibidor de las metaloproteinasas de matriz, un inhibidor de la lipoxigenasa, un antagonista de las citocinas, un inmunosupresor, un antineoplásico, un antiviral, una citocina, un factor de crecimiento, un inmunomodulador, una prostaglandina o un compuesto antihiperproliferación vascular, ya sea como parte de una forma multidosis junto con dicho compuesto o como formas farmacéuticas separadas.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1 es un gráfico de un elipsoide térmico de dos moléculas de simetría independiente del compuesto 12.

FIG. 2 es un gráfico de un elipsoide térmico de dos moléculas de simetría independiente del compuesto 23.

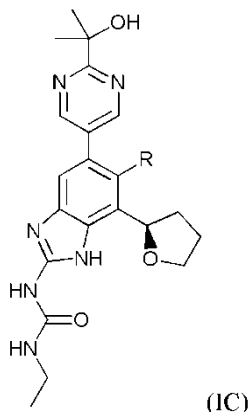
Descripción detallada

Según se usa en este documento, el término "halógeno" significa F, Cl, Br o I.

A menos que se indique lo contrario, las estructuras representadas en este documento también pretenden incluir todas las formas estereoquímicas de la estructura, es decir las configuraciones R y S para cada centro asimétrico. Por consiguiente, los isómeros estereoquímicos individuales así como las mezclas de enantiómeros y diastereoisómeros de los compuestos de la presente invención están comprendidos por el alcance de la invención.

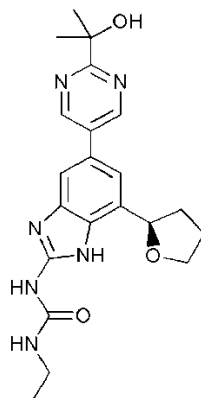
Las formas marcadas isotópicamente de los compuestos de fórmula (I) en las que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masa encontrado habitualmente en la naturaleza, también están incluidas en este documento. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y flúor, como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  y  $^{17}\text{O}$ . Dichos compuestos radiomarcados y marcados isotópicamente de forma estable son útiles, por ejemplo, como herramientas de investigación o diagnóstico o como inhibidores de la girasa y/o la topoisomerasa IV con un mejor perfil terapéutico. Las estructuras también abarcan formas zwitteriónicas de los compuestos o sales, cuando corresponda.

En una realización, los compuestos de fórmula (I) incluyen compuestos de fórmula (IC)



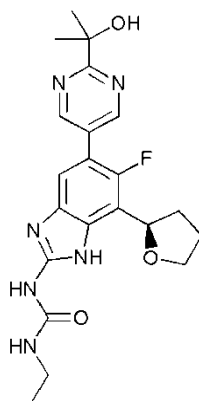
donde R es el definido antes.

En otra realización, los compuestos de fórmula (I) incluyen los compuestos de fórmula (ID) e (IE) como se indican a continuación:



(ID)

- 5 (R)-1-etil-3-(5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y



(IE)

- 10 (R)-1-etil-3-(6-fluoro-5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. A menos que se indique lo contrario, la frase "compuestos de fórmula (I)" pretende incluir otras fórmulas indicadas aquí y abarcadas por la fórmula (I) incluidas las fórmulas (IA), (IB), (IC), (ID) e (IE).

- 15 Los compuestos de fórmula (IB) son profármacos del compuesto precursor, 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-benzimidazol-2-il]urea. Por consiguiente, la actividad exhibida luego de la administración del profármaco se debe principalmente a la presencia del compuesto precursor que resulta de la escisión del profármaco.

- 20 El término "profármaco" se refiere a los compuestos que son precursores de fármacos que, luego de la administración y absorción, liberan el fármaco in vivo a través de procesos metabólicos. En general, un profármaco posee menos actividad biológica que el fármaco precursor. Un profármaco también puede mejorar las propiedades físicas del fármaco precursor y/o también puede mejorar la eficacia global del fármaco, por ejemplo por reducción de la toxicidad y los efectos indeseados de un fármaco mediante el control de su absorción, niveles sanguíneos, distribución metabólica y absorción celular.

- 25 La expresión "compuesto precursor" o "fármaco precursor" se refiere a la entidad biológicamente activa que es liberada a través de acción enzimática de un proceso metabólico o un proceso catabólico, o a través de un proceso químico que sigue a la administración del profármaco. El compuesto precursor también puede ser el material de partida para la preparación de su correspondiente profármaco.

- 30 Los cationes monovalentes definidos por  $M^+$  incluyen amonio, iones de metales alcalinos como iones de sodio, litio y potasio, ion de dicitohexilamina y ion de N-metil-D-glucamina. Los cationes divalentes definidos por  $D^{2+}$  incluyen, iones de metales alcalinotérreos como iones de aluminio, calcio y magnesio. También están incluidos los cationes de aminoácidos como los iones de arginina, lisina, ornitina, etc. Si  $M^+$  es un catión monovalente, se admite que si la definición  $2M^+$  está presente, cada  $M^+$  puede ser el mismo o diferente. Además, se reconoce análogamente que si la definición  $2M^+$  está presente, un catión divalente  $D^{2+}$  puede en su lugar estar presente. Asimismo, los grupos que

contienen nitrógeno básico pueden ser cuaternizados con agentes como: haluros de alquilo inferiores, como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo, sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo; sulfatos de diamilo; haluros de cadena larga como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de aralquilo como bromuro de bencilo y otros.

5 Diversas realizaciones de la invención incluyen compuestos o sales de fórmula (IB) como los indicados a continuación:

(1) compuestos en los que X es

(a)  $-\text{PO}(\text{OH})\text{O}-\text{M}^+$ ;

(b)  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2 \cdot 2\text{M}^+$ ; o

10 (c)  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2 \cdot \text{D}^{2+}$ ;

(2) compuestos en los que  $\text{M}^+$  es

(a)  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , N-metil-D-glucamina o  $\text{N}(\text{R}^9)_4^+$ ; o

(b)  $\text{Na}^+$ ;

(c) cada  $\text{R}^9$  es independientemente hidrógeno o un grupo  $\text{C}_1\text{-C}_4$  alquilo;

15 (3) compuestos en los que  $\text{D}^{2+}$  es

(a)  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ ; o

(b)  $\text{Ca}^{2+}$ ;

(4) el compuesto fosfato de (R)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-ilo; y

20 (5) el compuesto (R)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato disódico.

Se entenderá que se pueden elegir varias realizaciones alternativas de los compuestos o sales de fórmula (IB) por requerimiento de una o más de las realizaciones alternativa indicadas en (1) a (3) precedentemente. Por ejemplo, se pueden obtener otras realizaciones de la invención combinando (1)(a) y (2)(a); (1)(a) y (2)(b); (1)(c) y (3)(a); (1)(c) y (3)(b); (1)(b) y (2)(a); (1)(b) y (2)(b); y similares.

Los profármacos de la presente invención se caracterizan por una solubilidad acuosa inesperadamente alta. Esta solubilidad facilita la administración de dosis mayores del profármaco, lo que da lugar a una mayor carga de fármaco por forma farmacéutica.

30 Una realización de esta invención se refiere a un compuesto o a una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en un método de tratamiento de una infección bacteriana en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

35 Según otra realización, la invención proporciona un método para disminuir o inhibir la cantidad de bacterias en una muestra biológica. Este método comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La expresión "muestra biológica", según se usa en este documento, significa, cultivos celulares o sus extractos; material de biopsia obtenido de un mamífero o sus extractos; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros líquidos corporales, o sus extractos.

40 Una realización comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto elegido del grupo que consiste en (R)-1-etil-3-(5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y (R)-1-etil-3-(6-fluoro-5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas útiles para dichos métodos se describen a continuación.

45 Una realización comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un éster fosfato profármaco de (R)-1-etil-3-(6-fluoro-5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea, según se definió con la fórmula (IB). Las composiciones farmacéuticas útiles para dichos métodos se describen a continuación.

La actividad antimicrobiana de los compuestos de fórmula (I) puede ser demostrada mediante el ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Los detalles de las afecciones utilizadas para los ensayos de sensibilidad antimicrobiana se indican en los ejemplos siguientes.

5 Los inhibidores de la girasa y/o la topoisomerasa IV de esta invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se pueden formular en composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. Estas composiciones farmacéuticas eficaces para tratar o prevenir una infección bacteriana que contienen al inhibidor de la girasa y/o la topoisomerasa IV en una cantidad suficiente para disminuir mensurablemente la cantidad de bacterias y un portador farmacéuticamente aceptable, son otra realización de la presente invención. La expresión "disminuir mensurablemente la cantidad de bacterias", según se usa en este documento significa un cambio medible en la  
10 cantidad de bacterias entre una muestra que contiene dicho inhibidor y una muestra que contiene sólo bacterias.

Los agentes que aumentan la sensibilidad de los microorganismos bacterianos a los antibióticos son conocidos. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5,523,288, la patente de Estados Unidos N° 5,783,561 y la patente de Estados Unidos N° 6,140,306 describen métodos de uso de proteínas que aumentan la permeabilidad bactericida (BPI) para aumentar la sensibilidad a los antibióticos de las bacterias grampositivas y gramnegativas. Los agentes  
15 que aumentan la permeabilidad de la membrana externa de los microorganismos bacterianos han sido descritos por Vaara, M. en *Microbiological Reviews* (1992) pp. pp. 395-411, y la sensibilización de las bacterias gramnegativas ha sido descrita por Tsubery, H., et al, en *J. Med. Chem.* (2000) pp. 3085-3092.

Otra realización de esta invención se refiere a un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en un método, según se describió antes, de prevención, control, tratamiento o reducción del avance, la  
20 gravedad o los efectos de una infección bacteriana en un mamífero que lo necesita, pero que comprende además el paso de administrar a dicho mamífero un agente que aumente la sensibilidad de los microorganismos bacterianos a los antibióticos.

Según otra realización, los compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en los métodos de la presente invención son útiles para tratar pacientes en el campo veterinario, incluidos, pero no exclusivamente, animales de zoológico, de laboratorio, mascotas y animales de granja, incluidos primates, roedores, reptiles y aves. Los ejemplos de dichos animales incluyen, pero no exclusivamente, cobayos, hámsters, jerbos, ratas, ratones, conejos, perros, gatos, caballos, cerdos, ovejas, vacas, cabras, ciervos, macacos de la india, monos, monos tífi, micos, babuinos, chimpancés, orangutanes, gibones, avestruces, gallinas, pavos, patos y gansos.

Las composiciones y los compuestos farmacéuticos y sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en los métodos de esta invención serán útiles en general para controlar infecciones bacterianas *in vivo*. Los ejemplos de microorganismos bacterianos que pueden ser controlados por las composiciones y los compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en los métodos de esta invención incluyen, pero no exclusivamente, los microorganismos siguientes: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. *Proteus* spp. *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*,  
35 *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Clostridium difficile*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium kansasii* y  
40 *Mycobacterium ulcerans*.

Las composiciones y los compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en los métodos serán útiles por lo tanto para controlar, tratar o reducir el avance, la gravedad o los efectos de infecciones nosocomiales o no nosocomiales. Los ejemplos de infecciones nosocomiales o no nosocomiales comprenden entre otras las infecciones de las vías respiratorias superiores, infecciones de las vías respiratorias inferiores, infecciones de oído,  
45 infecciones pleuropulmonares y bronquiales, infecciones del aparato urinario complicadas, infecciones del aparato urinario simples, infecciones intraabdominales, infecciones cardiovasculares, una infección en el torrente sanguíneo, septicemia, bacteriemia, infecciones del SNC, infecciones cutáneas y de tejidos blandos, infecciones GI, infecciones óseas y articulares, infecciones genitales, infecciones oculares o infecciones granulomatosas. Los ejemplos de infecciones bacterianas específicas incluyen, pero no exclusivamente, infecciones cutáneas y de la estructura cutánea simples (uSSSI), infecciones cutáneas y de la estructura cutánea complicadas (cSSSI), infecciones por catéter, faringitis, sinusitis, otitis externa, otitis media, bronquitis, empiema, neumonía, neumonía bacteriana extrahospitalaria (CABP), neumonía intrahospitalaria (HAP), neumonía bacteriana intrahospitalaria, neumonía asociada a respirador (VAP), infecciones del pie diabético, infecciones por enterococos resistentes a la Vancomicina, cistitis y pielonefritis, cálculos renales, prostatitis, peritonitis, infecciones intraabdominales complicadas (cIAI) y otras  
50 infecciones intraabdominales, peritonitis asociada a diálisis, abscesos viscerales, endocarditis, miocarditis, pericarditis, septicemia asociada a transfusión, meningitis, encefalitis, absceso cerebral, osteomielitis, artritis, úlceras genitales, uretritis, vaginitis, cervicitis, gingivitis, conjuntivitis, queratitis, endoftalmítis, una infección en pacientes con fibrosis quística o una infección en pacientes neutropénicos febriles.

La expresión "infecciones no nosocomiales" también se refiere a infecciones extrahospitalarias.



En una realización, las composiciones y los compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en los métodos serán por lo tanto útiles para controlar, tratar o reducir el avance, la gravedad o los efectos de: neumonía extrahospitalaria (CABP), neumonía intrahospitalaria (HAP), neumonía bacteriana intrahospitalaria, neumonía asociada a respirador (VAP), bacteriemia, infecciones del pie diabético, infecciones por catéter, infecciones cutáneas y de la estructura cutánea simples (uSSSI), infecciones cutáneas y de la estructura cutánea complicadas (cSSSI), infecciones por enterococos resistentes a la Vancomicina u osteomielitis.

En otra realización, las composiciones y los compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar en los métodos serán útiles por lo tanto para controlar, tratar o reducir el avance, la gravedad o los efectos de infecciones de las vías respiratorias superiores, infecciones de las vías respiratorias inferiores, infecciones de oído, infecciones pleuropulmonares y bronquiales, infecciones del aparato urinario complicadas, infecciones del aparato urinario simples, infecciones intraabdominales, infecciones cardiovasculares, una infección en el torrente sanguíneo, septicemia, bacteriemia, infecciones del SNC, infecciones cutáneas y de tejidos blandos, infecciones GI, infecciones óseas y articulares, infecciones genitales, infecciones oculares o infecciones granulomatosas, infecciones cutáneas y de la estructura cutánea simples (uSSSI), infecciones cutáneas y de la estructura cutánea complicadas (cSSSI), infecciones por catéter, faringitis, sinusitis, otitis externa, otitis media, bronquitis, empiema, neumonía, neumonía bacteriana extrahospitalaria (CABP), neumonía intrahospitalaria (HAP), neumonía bacteriana intrahospitalaria, neumonía asociada a respirador (VAP), infecciones del pie diabético, infecciones por enterococos resistentes a la Vancomicina, cistitis y pielonefritis, cálculos renales, prostatitis, peritonitis, infecciones intraabdominales complicadas (cIAI) y otras infecciones intraabdominales, peritonitis asociada a diálisis, abscesos viscerales, endocarditis, miocarditis, pericarditis, septicemia asociada a transfusión, meningitis, encefalitis, absceso cerebral, osteomielitis, artritis, úlceras genitales, uretritis, vaginitis, cervicitis, gingivitis, conjuntivitis, queratitis, endoftalmítis, una infección en pacientes con fibrosis quística o una infección en pacientes neutropénicos febriles.

En otra realización, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de una o más bacterias entre *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* o *Mycobacterium tuberculosis*.

En otra realización, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de una o más bacterias entre *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* o *Staphylococcus aureus*.

En otra realización, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de una o más bacterias entre *E. coli*, *Moraxella catarrhalis* o *Haemophilus influenzae*.

En otra realización, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de una o más bacterias entre *Clostridium difficile*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium ulcerans*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis*.

En otra realización, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de una o más bacterias entre *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium ulcerans*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* o estreptococos  $\beta$ -hemolíticos.

En algunas realizaciones, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de una o más bacterias entre *Staphylococcus aureus* resistente a la Metilicina, *Staphylococcus aureus* resistente a las fluoroquinolonas, *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a Linezolid, *Streptococcus pneumoniae* resistente a las penicilinas, *Streptococcus pneumoniae* resistente a los macrólidos, *Streptococcus pneumoniae* resistente a las fluoroquinolonas, *Enterococcus faecalis* resistente a la Vancomicina, *Enterococcus faecalis* resistente a Linezolid, *Enterococcus faecalis* resistente a las fluoroquinolonas, *Enterococcus faecium* resistente a la Vancomicina, *Enterococcus faecium* resistente a Linezolid, *Enterococcus faecium* resistente a las fluoroquinolonas, *Enterococcus faecium* resistente a la Ampicilina, *Haemophilus influenzae* resistente a los macrólidos, *Haemophilus influenzae* resistente a la  $\beta$ -lactama, *Haemophilus influenzae* resistente a las fluoroquinolonas, *Moraxella catarrhalis* resistente a la  $\beta$ -lactama, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la Metilicina, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la Vancomicina, *Staphylococcus epidermidis* resistente a las fluoroquinolonas, *Mycoplasma pneumoniae* resistente a los macrólidos, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a Isoniazid, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a Rifampin, *coagulase negative Staphylococcus* resistente a la Metilicina, *coagulase negative Staphylococcus* resistente a las fluoroquinolonas, *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a los glucopéptidos, *Staphylococcus aureus* resistente a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con hetero resistencia intermedia a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con hetero resistencia a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a Macrólidos-Lincosamida-Estreptograminas, *Enterococcus faecalis* resistente a la  $\beta$ -lactama, *Enterococcus faecium* resistente a la  $\beta$ -lactama, *Streptococcus pneumoniae* resistente a los glicolípidos, *Streptococcus pyogenes* resistente a los glicolípidos, *Streptococcus pyogenes* resistente a los macrólidos, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la Vancomicina, *Neisseria gonorrhoea* resistente a las fluoroquinolonas, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos o *Neisseria gonorrhoea* resistente a las cefalosporinas.

- Según otra realización, los estafilococos resistentes a la Meticilina se eligen entre *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la Meticilina o *coagulase negative Staphylococcus* resistente a la Meticilina.
- 5 En algunas realizaciones se usa una forma de un compuesto de fórmula (I) para tratar una MRSA extrahospitalaria (es decir, cMRSA).
- En otras realizaciones, se usa una forma de un compuesto de fórmula (I) para tratar un microorganismo resistente a la Daptomicina, pero no exclusivamente, *Enterococcus faecium* resistente a la Daptomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a la Daptomicina.
- 10 Según otra realización, los estafilococos resistentes a las fluoroquinolonas se eligen entre *Staphylococcus aureus* resistente a las fluoroquinolonas, *Staphylococcus epidermidis* resistente a las fluoroquinolonas o *coagulase negative Staphylococcus* resistente a las fluoroquinolonas.
- Según otra realización, los estafilococos resistentes a los glucopéptidos se eligen entre *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a los glucopéptidos, *Staphylococcus aureus* resistente a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con hetero resistencia intermedia a la Vancomicina o *Staphylococcus aureus* con hetero resistencia a la Vancomicina.
- 15 Según otra realización, el estafilococo resistente a Macrólidos-Lincosamida-Estreptograminas es *Staphylococcus aureus* resistente a Macrólidos-Lincosamida-Estreptograminas.
- Según otra realización, los enterococos resistentes a Linezolid se eligen entre *Enterococcus faecalis* resistente a Linezolid o *Enterococcus faecium* resistente a Linezolid.
- 20 Según otra realización, los enterococos resistentes a los glucopéptidos se eligen entre *Enterococcus faecium* resistente a la Vancomicina o *Enterococcus faecalis* resistente a la Vancomicina.
- Según otra realización, el *Enterococcus faecalis* resistente a la  $\beta$ -lactama es *Enterococcus faecium* resistente a la  $\beta$ -lactama.
- Según otra realización, el estreptococo resistente a las penicilinas es *Streptococcus pneumoniae* resistente a las penicilinas.
- 25 Según otra realización, el estreptococo resistente a los macrólidos es *Streptococcus pneumoniae* resistente a los macrólidos.
- Según otra realización, los estreptococos resistentes a los glicolípidos se eligen entre *Streptococcus pneumoniae* resistente a los macrólidos y *Streptococcus pyogenes* resistente a los glicolípidos.
- 30 Según otra realización, el estreptococo resistente a las fluoroquinolonas es *Streptococcus pneumoniae* resistente a las fluoroquinolonas.
- Según otra realización, el hemófilo resistente a la  $\beta$ -lactama es *Haemophilus influenzae* resistente a la  $\beta$ -lactama.
- Según otra realización, el hemófilo resistente a las fluoroquinolonas es *Haemophilus influenzae* resistente a las fluoroquinolonas.
- 35 Según otra realización, el hemófilo resistente a los macrólidos es *Haemophilus influenzae* resistente a los macrólidos.
- Según otra realización, el micoplasma resistente a los macrólidos es *Mycoplasma pneumoniae* resistente a los macrólidos.
- Según otra realización, la micobacteria resistente al Isoniazid es *Mycobacterium tuberculosis* resistente al Isoniazid.
- Según otra realización, la micobacteria resistente al Rifampin es *Mycobacterium tuberculosis* resistente al Rifampin.
- 40 Según otra realización, la moraxella resistente a la  $\beta$ -lactama es *Moraxella catarrhalis* resistente a la  $\beta$ -lactama.
- Según otra realización, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de uno o más de los siguientes: *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente a las fluoroquinolonas, *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a Linezolid, *Streptococcus pneumoniae* resistente a las penicilinas, *Streptococcus pneumoniae* resistente a los macrólidos,
- 45 *Streptococcus pneumoniae* resistente a las fluoroquinolonas, *Enterococcus faecalis* resistente a la Vancomicina, *Enterococcus faecalis* resistente a Linezolid, *Enterococcus faecium* resistente a la Vancomicina, *Enterococcus faecium* resistente a Linezolid, *Enterococcus faecium* resistente a las fluoroquinolonas, *Enterococcus faecium* resistente a la Ampicilina, *Haemophilus influenzae* resistente a los macrólidos, *Haemophilus influenzae* resistente a la  $\beta$ -lactama, *Haemophilus influenzae* resistente a las fluoroquinolonas, *Moraxella catarrhalis* resistente a la  $\beta$ -lactama, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la
- 50

Meticilina, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la Meticilina, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la Vancomicina, *Staphylococcus epidermidis* resistente a las fluoroquinolonas, *Mycoplasma pneumoniae* resistente a los macrólidos, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a Isoniazid, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a Rifampin, *Neisseria gonorrhoea* resistente a las fluoroquinolonas o *Neisseria gonorrhoea* resistente a las cefalosporinas.

Según otra realización, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de uno o más de los siguientes: *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la Meticilina, *coagulase negative Staphylococcus* resistente a la Meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente a las fluoroquinolonas, *Staphylococcus epidermidis* resistente a las fluoroquinolonas, *coagulase negative Staphylococcus* resistente a las fluoroquinolonas, *Staphylococcus aureus* resistente a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a los glucopéptidos, *Staphylococcus aureus* resistente a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con hetero resistencia a la Vancomicina, *Enterococcus faecium* resistente a la Vancomicina, *Enterococcus faecalis* resistente a la Vancomicina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a las penicilinas, *Streptococcus pneumoniae* resistente a los macrólidos, *Streptococcus pneumoniae* resistente a las fluoroquinolonas, *Streptococcus pyogenes* resistente a los macrólidos o *Haemophilus influenzae* resistente a la  $\beta$ -lactama. Según otra realización, la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de uno o más de los siguientes: *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina, *Enterococcus faecium* resistente a la Vancomicina, *Enterococcus faecalis* resistente a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con hetero resistencia intermedia a la Vancomicina, *Staphylococcus aureus* con hetero resistencia a la Vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a Isoniazid y *Mycobacterium tuberculosis* resistente a Rifampin.

Además de los compuestos de esta invención, los derivados o profármacos de los compuestos de esta invención farmacéuticamente aceptables también se pueden emplear en composiciones para tratar o prevenir los trastornos identificados antes.

Un "derivado o profármaco farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal, éster, sal de un éster u otro derivado de un compuesto de esta invención farmacéuticamente aceptable, que luego de la administración a un receptor, sea capaz de proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto de esta invención o un metabolito inhibitoriamente activo o un residuo de éste. Los derivados o profármacos particularmente favorecidos son los que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando dichos compuestos se administran a un mamífero (por ej., permitiendo que un compuesto administrado oralmente sea absorbido más fácilmente en la sangre) o los que potencian la administración del compuesto precursor a un compartimiento biológico (por ej., el cerebro o sistema linfático) con relación a la especie precursora.

Los profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen, sin limitación, ésteres, ésteres de aminoácidos, ésteres fosfato, sales metálicas y ésteres sulfonato.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las derivadas de bases y ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales de ácido adecuadas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Otros ácidos, como el ácido oxálico, si bien en sí no son farmacéuticamente aceptables, se pueden emplear en la preparación de sales útiles como productos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

Las sales derivadas de bases adecuadas incluyen sales de metales alcalinos (por ej. sodio y potasio), metales alcalinotérreos, (por ej. magnesio), amonio y  $N^+(C_{1-4} \text{ alquil})$ . Esta invención también contempla la cuaternización de todos los grupos que contengan nitrógeno básico de los compuestos dados a conocer en este documento. Se pueden obtener productos solubles o dispersables en agua o aceite mediante dicha cuaternización.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención contienen un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un portador farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden contener opcionalmente otro agente terapéutico. Dichos agentes incluyen, pero no exclusivamente, un antibiótico, un antiinflamatorio, un inhibidor de las metaloproteasas de matriz, un inhibidor de la lipoxigenasa, un antagonista de las citocinas, un inmunosupresor, un antineoplásico, un antiviral, una citocina, un factor de crecimiento, un inmunomodulador, una prostaglandina o un compuesto antihiperproliferación vascular. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador no tóxico que se puede administrar a un paciente junto con un compuesto de esta invención y que no destruye la actividad farmacológica de éste.

Los portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero no exclusivamente, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina,

proteínas séricas como seroalbúmina humana, sustancias amortiguadoras como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos como sulfato de protamina, fosfato ácido disódico, fosfato ácido de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, lanolina y sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) como alfa-tocoferol, succinato de polietilenglicol 1000 u otras matrices poliméricas de administración similares.

La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para tratar o mejorar una infección bacteriana en un paciente. La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para prevenir o mitigar sustancialmente una infección bacteriana en un paciente.

Dependiendo de la afección o enfermedad particular a ser tratada o prevenida, también se pueden administrar conjuntamente con los inhibidores de esta invención, otros agentes terapéuticos que normalmente se administran para tratar o prevenir esa afección. Dichos agentes incluyen, pero no exclusivamente, un antibiótico, un antiinflamatorio, un inhibidor de las metaloproteasas de matriz, un inhibidor de la lipoxigenasa, un antagonista de las citocinas, un inmunosupresor, un antineoplásico, un antiviral, una citocina, un factor de crecimiento, un inmunomodulador, una prostaglandina o un compuesto antihiperproliferación vascular.

Los compuestos de esta invención se pueden emplear de manera convencional para controlar niveles de infecciones bacterianas *in vivo* y para tratar enfermedades o reducir el avance o la gravedad de los efectos que son mediados por bacterias. Dichos métodos de tratamiento, sus niveles de dosificación y requerimientos, pueden ser elegidos por los expertos en el área entre métodos y técnicas disponibles.

Por ejemplo, un compuesto de esta invención se puede combinar con un adyuvante farmacéuticamente aceptable para la administración a un paciente que sufre de una infección o una enfermedad bacteriana, de manera farmacéuticamente aceptable y en una cantidad eficaz para mitigar la gravedad de dicha infección o enfermedad.

Alternativamente, los compuestos de esta invención se pueden usar en composiciones y métodos para tratar o proteger individuos contra infecciones o enfermedades bacterianas por períodos de tiempo prolongados. En una realización, los compuestos de esta invención se pueden usar en composiciones y métodos para tratar o proteger individuos contra infecciones o enfermedades bacterianas por períodos de 1 a 2 semanas. En otra realización, los compuestos de esta invención se pueden usar en composiciones y métodos para tratar o proteger individuos contra infecciones o enfermedades bacterianas por períodos de 4 a 8 semanas (por ejemplo, en el tratamiento de pacientes que tienen endocarditis u osteomielitis o corren riesgo de sufrirlas). En otra realización, los compuestos de esta invención se pueden usar en composiciones y métodos para tratar o proteger individuos contra infecciones o enfermedades bacterianas por períodos de 8 a 12 semanas. Los compuestos se pueden emplear en dichas composiciones ya sea solos o junto con otros compuestos de esta invención de manera compatible con el uso convencional de los inhibidores de las enzimas en composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, un compuesto de esta invención se puede combinar con adyudantes farmacéuticamente aceptables, empleados convencionalmente en vacunas, y administrar en cantidades profilácticamente eficaces para proteger a los individuos durante un período prolongado de tiempo contra infecciones o enfermedades bacterianas.

En algunas realizaciones, los compuestos de fórmula (I) se pueden usar profilácticamente para prevenir una infección bacteriana. En algunas realizaciones, los compuestos de fórmula (I) se pueden usar antes, durante o después de un procedimiento dental o quirúrgico para prevenir infecciones oportunistas como las que se encuentran en la endocarditis bacteriana. En otras realizaciones, los compuestos de fórmula (I) se pueden usar profilácticamente en procedimientos dentales, que incluyen pero no exclusivamente, extracciones, procedimientos periodontales, colocación de implantes dentales y cirugía endodóntica. En otras realizaciones, los compuestos de fórmula (I) se pueden usar profilácticamente en procedimientos quirúrgicos que incluyen entre otros, cirugía general, cirugía respiratoria (tonsilectomía/adenoidectomía), cirugía gastrointestinal (cirugía GI superior y electiva de intestino delgado, escleroterapia esofágica y dilatación, resecciones del intestino grueso, apendicectomía aguda), cirugía de traumatismos (cirugía abdominal penetrante), cirugía del aparato genitourinario (prostatectomía, dilatación uretral, cistoscopia, histerectomía vaginal o abdominal, cesárea), cirugía de trasplante (trasplante de riñón, hígado, páncreas o riñón), cirugía de cabeza y cuello (abrasiones cutáneas, abrasiones de cuello, laringectomía, cirugía de cáncer de cabeza y cuello, fracturas mandibulares), cirugía ortopédica (reemplazo total de articulación, fracturas traumáticas abiertas), cirugía vascular (procedimiento vascular periférico), cirugía cardiotorácica, cirugía de revascularización coronaria, resección pulmonar y neurocirugía.

La expresión "prevenir una infección bacteriana" según se usa en este documento, a menos que se indique lo contrario, significa el uso profiláctico de un antibiótico, como un inhibidor de la girasa y/o de la topoisomerasa IV de la presente invención, para prevenir una infección bacteriana. El tratamiento con un inhibidor de la girasa y/o de la topoisomerasa IV podría hacerse profilácticamente para prevenir una infección causada por un microorganismo que sea sensible al inhibidor de la girasa y/o la topoisomerasa IV. Un conjunto general de afecciones en las que se podría considerar el tratamiento profiláctico es cuando un individuo es más vulnerable a una infección debida, por ejemplo, a una inmunidad debilitada, una cirugía, un traumatismo, la presencia de un dispositivo artificial en el microorganismo (temporal o permanentemente), un defecto anatómico, la exposición a altos niveles de bacterias o la

- posible exposición a un patógeno causante de enfermedad. Los ejemplos de factores que podrían conducir a una inmunidad debilitada incluyen la quimioterapia antineoplásica, la radioterapia, la diabetes, la edad avanzada, la infección por VIH y los trasplantes. Un ejemplo de un defecto anatómico sería un defecto en las válvulas cardíacas que aumenta el riesgo de endocarditis bacteriana. Los ejemplos de dispositivos artificiales incluyen articulaciones artificiales, clavos quirúrgicos, catéteres etc. Otro conjunto de situaciones en las que el uso profiláctico de un inhibidor de la girasa y/o la topoisomerasa IV podría ser apropiado sería la prevención de la diseminación de un patógeno entre individuos (directa o indirecta). Un ejemplo específico del uso profiláctico para prevenir la diseminación de un patógeno es el uso de un inhibidor de la girasa y/o la topoisomerasa IV por individuos en un Instituto de atención de la salud (por ejemplo un hospital o una residencia para ancianos).
- 5
- 10 Los compuestos de fórmula (I) también se pueden coadministrar con otros antibióticos para aumentar el efecto de la terapia o la profilaxis contra diversas infecciones bacterianas. Cuando los compuestos de esta invención se administran en terapias de combinación con otros agentes, se pueden administrar al paciente secuencialmente o simultáneamente. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas o profilácticas según esta invención comprenden la combinación de un compuesto de fórmula (I) y otro agente terapéutico o profiláctico.
- 15 En algunas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos adicionales es un antibiótico elegido entre una penicilina natural, una penicilina resistente a la penicilinasas, una penicilina antipseudomonas, una aminopenicilina, una cefalosporina de primera generación, una cefalosporina de segunda generación, una cefalosporina de tercera generación, una cefalosporina de cuarta generación, un carbapenem, una cefamicina, una quinolona, una fluoroquinolona, un aminoglucósido, un macrólido, un quetólido, una polimixina, una tetraciclina, un glucopéptido, una estreptogramina, una oxazolidinona, una rifamicina o una sulfonamida.
- 20 En algunas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos adicionales es un antibiótico elegido entre una penicilina, una cefalosporina, una quinolona, un aminoglucósido o una oxazolidinona.
- En otras realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales se eligen entre una penicilina natural incluida Benzatina penicilina G, Penicilina G y Penicilina V, entre una penicilina resistente a la penicilinasas incluidas Cloxacilina, Dicloxacilina, Nafcilina y Oxacilina, entre una penicilina antipseudomonas incluidas Carbenicilina, Mezlocilina, Piperacilina, Piperacilina/tazobactam, Ticarcilina y Ticarcilina/Clavulanato, entre una aminopenicilina incluidas Amoxicilina, Ampicilina y Ampicilina/Sulbactam, entre una cefalosporina de primera generación incluidas Cefazolina, Cefadroxil, Cefalexina y Cefadrina, entre una cefalosporina de segunda generación incluidas Cefaclor, Cefaclor-CD, Cefamandol, Cefonacid, Cefprozil, Loracarbef y Cefuroxima, entre una cefalosporina de tercera generación incluidas Cefdinir, Cefixima, Cefoperazona, Cefotaxima, Cefpodoxima, Ceftazidima, Ceftibuten, Ceftizoxima y Ceftriaxona, entre una cefalosporina de cuarta generación incluidas Cefepima, Ceftarolina y Ceftobiprol, entre una Cefamicina incluidas Cefotetan y Cefoxitina, entre un carbapenem incluidos Doripenem, Imipenem y Meropenem, entre un monobactam incluido Aztreonam, entre una quinolona incluidas Cinoxacin, ácido Nalidixico, ácido Oxolinico y ácido Pipemidico, entre una fluoroquinolona incluidas Besifloxacin, Ciprofloxacina, Enoxacina, Gatifloxacina, Grepafloxacina, Levofloxacina, Lomefloxacina, Moxifloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina y Sparfloxacina, entre un aminoglucósido incluidos Amikacina, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Netilmicina, Espectinomina, Estreptomina y Tobramicina, entre un macrólido incluidos Azitromicina, Claritromicina y Eritromicina, entre un quetólido incluidos Telitromicina, entre una tetraciclina incluidas Clortetraciclina, Demeclociclina, Doxiciclina, Minociclina y Tetraciclina, entre un glucopéptido incluidos Oritavancina, Dalbavancina, Telavancina, Teicoplanina y Vancomicina, entre una estreptogramina incluidas Dalfopristina/quinupristina, entre una oxazolidinona incluida Linezolid, entre una rifamicina incluidas Rifabutina y Rifampina y entre otros antibióticos incluidos bacitracina, colistina, Tygacil, Daptomicina, cloranfenicol, clindamicina, isoniazida, metronidazol, mupirocina, polimixina B, pirazinamida, trimetoprim/sulfametoxazol y sulfisoxazol.
- 25 En otras realizaciones, los agentes terapéuticos adicionales se eligen entre una penicilina natural incluida la Penicilina G, entre una penicilina resistente la penicilinasas incluidas Nafcilina y Oxacilina, entre una penicilina antipseudomonas incluidas Piperacilina/tazobactam, entre una aminopenicilina incluida Amoxicilina, entre una cefalosporina de primera generación incluida Cefalexina, entre una cefalosporina de segunda generación incluidas Cefaclor, Cefaclor-CD y Cefuroxima, entre una cefalosporina de tercera generación incluidas Ceftazidima y Ceftriaxona, entre una cefalosporina de cuarta generación incluida Cefepima, entre un carbapenem incluidos Imepenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem, Panipenem y Biapenem, entre una fluoroquinolona incluidas Ciprofloxacina, Gatifloxacina, Levofloxacina y Moxifloxacina, entre un aminoglucósido incluido Tobramicina, entre un macrólido incluidos Azitromicina y Claritromicina, entre una tetraciclina incluida Doxiciclina, entre un glucopéptido incluido Vancomicina, entre una rifamicina incluida Rifampina y entre otros antibióticos incluidos isoniazid, pirazinamida, Tygacil, Daptomicina o trimetoprim/sulfametoxazol.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 En algunas realizaciones, una forma sólida de un compuesto de fórmula (I) se puede administrar para el tratamiento de una infección grampositiva. En algunas realizaciones, la composición es un sólido, un líquido (por ej., una suspensión), o una composición iv (por ej., una forma del compuesto de fórmula (I) se disuelve en un líquido y se administra iv). En algunas realizaciones, la composición que incluye un compuesto de fórmula (I), se administra en combinación con otro antibiótico, por ejemplo, una penicilina natural, una penicilina resistente a la penicilinasas, una penicilina antipseudomonas, una aminopenicilina, una cefalosporina de primera generación, una cefalosporina de segunda generación, una cefalosporina de tercera generación, una cefalosporina de cuarta generación, un
- 60

carbapenem, una cefamicina, una quinolona, una fluoroquinolona, un aminoglucósido, un macrólido, un quetólido, una polimixina, una tetraciclina, un glucopéptido, una estreptogramina, una oxazolidinona, una rifamicina o una sulfonamida. En algunas realizaciones, la composición que incluye una forma sólida de un compuesto de fórmula (I), se administra por vía oral, y el otro antibiótico, por ejemplo, una penicilina natural, una penicilina resistente a la penicilinasas, una penicilina antipseudomonas, una aminopenicilina, una cefalosporina de primera generación, una cefalosporina de segunda generación, una cefalosporina de tercera generación, una cefalosporina de cuarta generación, un carbapenem, una cefamicina, una quinolona, una fluoroquinolona, un aminoglucósido, un macrólido, un quetólido, una polimixina, una tetraciclina, un glucopéptido, una estreptogramina, una oxazolidinona, una rifamicina o una sulfonamida se administra iv.

En algunas realizaciones, una forma sólida de un compuesto de fórmula (I) se puede administrar para el tratamiento de una infección gramnegativa. En algunas realizaciones, la composición es un sólido, un líquido (por ej., una suspensión), o una composición iv (por ej., una forma del compuesto de fórmula (I) se disuelve en un líquido y se administra iv). En algunas realizaciones la composición que incluye un compuesto de fórmula (I) se administra en combinación con otro antibiótico, elegido entre: una penicilina natural, una penicilina resistente a la penicilinasas, una penicilina antipseudomonas, una aminopenicilina, una cefalosporina de primera generación, una cefalosporina de segunda generación, una cefalosporina de tercera generación, una cefalosporina de cuarta generación, un carbapenem, una cefamicina, un monobactam, una quinolona, una fluoroquinolona, un aminoglucósido, un macrólido, un quetólido, una polimixina, una tetraciclina o una sulfonamida. En algunas realizaciones, la composición que incluye una forma sólida de un compuesto de fórmula (I), se administra por vía oral, y el otro antibiótico, por ejemplo, una penicilina natural, una penicilina resistente a la penicilinasas, una penicilina antipseudomonas, una aminopenicilina, una cefalosporina de primera generación, una cefalosporina de segunda generación, una cefalosporina de tercera generación, una cefalosporina de cuarta generación, un carbapenem, una cefamicina, un monobactam, una quinolona, una fluoroquinolona, un aminoglucósido, un macrólido, un quetólido, una polimixina, una tetraciclina o una sulfonamida se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional se administra iv.

Los agentes terapéuticos adicionales descritos antes se pueden administrar por separado, como parte de un régimen de dosificación múltiple, de la composición que contiene el inhibidor. Alternativamente, estos agentes pueden ser parte de una única forma farmacéutica mezclados con el inhibidor en una sola composición.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, por inhalación de aerosol, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier portador, adyuvante o vehículo convencional atóxico y farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el pH de la formulación se puede ajustar con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o de su forma de administración. El término parenteral según se usa en este documento incluye la inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginosas inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas utilizando dispersantes o humectantes (como, por ejemplo, Tween 80) y suspendientes adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente atóxico aceptable para uso parenteral, como por ejemplo una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el manitol, el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como solvente o suspendiente. Con este fin, se puede utilizar cualquier aceite fijo blando, incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados glicérido son útiles en la preparación de inyectables porque son aceites naturales farmacéuticamente aceptables como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohol de cadena larga, como los descritos en la Farmacopea Helvética, o un alcohol similar.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar oralmente en cualquier forma farmacéutica aceptable por vía oral, que incluye, pero no exclusivamente, cápsulas, comprimidos y suspensiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los portadores que se utilizan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se agregan habitualmente lubricantes como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran oralmente suspensiones y soluciones y propilenglicol, el principio activo se combina con emulsionantes y suspendientes. Si se desea, también se pueden agregar ciertos edulcorantes y/o saborizantes y/o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar mezclando un compuesto de esta invención con un excipiente no irritante adecuado, que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por

consiguiente que se funda en el recto para liberar los principios activos. Dichos materiales incluyen, pero no exclusivamente, manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

5 La administración tópica de las composiciones farmacéuticas de esta invención es especialmente útil cuando el tratamiento deseado involucra áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica. Para aplicación tópica a la piel, la composición farmacéutica se debe formular con una pomada adecuada que contenga los principios activos suspendidos o disueltos en un portador. Los portadores para administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no exclusivamente, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden formular con una loción o crema adecuada que contenga el principio activo suspendido o disuelto en un portador. Entre los portadores adecuados se encuentran, pero no exclusivamente, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden aplicar tópicamente a la parte inferior del tracto intestinal mediante una formulación en supositorio rectal o en una formulación en enema adecuada. También están incluidos en esta invención los parches transdérmicos tópicos.

15 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar mediante un aerosol o inhalación nasal. Dichas composiciones se preparan según técnicas bien conocidas en el área de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes, promotores de la absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros solubilizantes o dispersantes adecuados, conocidos en el área.

20 Según otra realización, los compuestos de fórmula (I) también se pueden administrar por implantación (por ej., quirúrgicamente), como un dispositivo implantable o permanente. Un dispositivo implantable o permanente puede ser diseñado para residir permanentemente o temporalmente en un sujeto. Los ejemplos de dispositivos implantables y permanentes incluyen, entre otros, lentes de contacto, catéteres venosos centrales y conectores sin agujas, tubos endotraqueales, dispositivos intrauterinos, válvulas cardíacas mecánicas, marcapasos, catéteres de diálisis peritoneales, articulaciones protésicas, como reemplazos de cadera y rodilla, tubos de timpanostomía, catéteres urinarios, prótesis de voz, stents, bombas de administración, filtros vasculares y composiciones implantables de liberación controlada. Las biopelículas pueden ser perjudiciales para la salud del paciente con un dispositivo médico implantable o permanente porque introducen un sustrato artificial en el cuerpo y pueden causar infecciones persistentes. Por lo tanto, proporcionar compuestos de fórmula (I) en o sobre un dispositivo implantable o permanente puede prevenir o reducir la producción de una biopelícula. Además, los dispositivos implantables o permanentes se pueden usar como un depot o un reservorio de compuestos de fórmula (I). Cualquier dispositivo implantable permanente se puede utilizar para administrar compuestos de fórmula (I) siempre que a) el dispositivo, los compuestos de fórmula (I) y cualquier composición farmacéutica que incluya compuestos de fórmula (I) sean biocompatibles, y b) que el dispositivo pueda administrar o liberar una cantidad eficaz de compuestos de fórmula (I) para conferir un efecto terapéutico a un paciente tratado.

La administración de agentes terapéuticos a través de dispositivos implantables o permanentes es conocida en el área. Véase por ejemplo, "Recent Developments in Coated Stents" por Hofma et al. publicado en Current Interventional Cardiology Reports 2001, 3:28-36. Otras descripciones de dispositivos implantables se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos N° 6,569,195 y 6,322,847; y en las solicitudes de patentes de Estados Unidos números 2004/0044405, 2004/0018228, 2003/0229390, 2003/0225450, 2003/0216699 y 2003/0204168.

En algunas realizaciones, el dispositivo implantable es un stent. En una realización específica, un stent puede incluir cables engranados entrelazados. Cada cable puede incluir alambres metálicos para el soporte estructural y alambres poliméricos para la administración del agente terapéutico. El alambre polimérico se puede dosificar sumergiendo el polímero en una solución del agente terapéutico. Alternativamente, el agente terapéutico se puede incorporar en el alambre polimérico durante la formación del alambre a partir de soluciones del precursor polimérico.

En otras realizaciones, los dispositivos implantables o permanentes se pueden recubrir con recubrimientos poliméricos que incluyen el agente terapéutico. El recubrimiento polimérico se puede diseñar para controlar la velocidad de liberación del agente terapéutico. La liberación controlada de agentes terapéuticos puede utilizar diversas tecnologías. Se sabe que los dispositivos tienen una capa monolítica o recubrimiento que incorpora una solución heterogénea y/o la dispersión de un principio activo en una sustancia polimérica, donde la difusión del agente es limitante de la velocidad, a medida que el agente difunde a través del polímero hacia la interfase polímero-líquido y es liberado en el líquido circundante. En algunos dispositivos, también se disuelve o se dispersa una sustancia soluble en el material polimérico, de modo que se dejan poros o canales adicionales luego que el material se disuelve. Un dispositivo de matriz es asimismo generalmente de difusión limitada, pero los canales u otra geometría interna del dispositivo también juegan un papel en la liberación del agente al líquido. Los canales pueden ser canales preexistentes o canales dejados atrás por el agente liberado u otras sustancias solubles.

Los dispositivos erosionables o degradables tienen típicamente el principio activo físicamente inmovilizado en el polímero. El principio activo se puede disolver y/o dispersar a través del material polimérico. El material polimérico a menudo se degrada hidrolíticamente en el correr del tiempo a través de la hidrólisis de enlaces lábiles, permitiendo que el polímero se erosione en el líquido, liberando el principio activo en dicho líquido. Los polímeros hidrófilos

5 tienen una velocidad de erosión generalmente mayor que los polímeros hidrófobos. Se cree que los polímeros hidrófobos tienen una superficie casi netamente de difusión del principio activo, sufriendo una erosión desde la superficie hacia adentro. Se cree que los polímeros hidrófilos permiten que el agua penetre la superficie del polímero, permitiendo la hidrólisis de los enlaces lábiles por debajo de la superficie, lo que puede conducir a la erosión homogénea o en masa del polímero.

10 El recubrimiento de los dispositivos implantables o permanentes puede incluir una mezcla de polímeros cada uno con una diferente velocidad de liberación del agente terapéutico. Por ejemplo, el recubrimiento puede incluir un copolímero de ácido poliláctico/óxido de polietileno (PLA-PEO) y un copolímero de ácido poliláctico/policaprolactona (PLA-PCL). El copolímero de ácido poliláctico/óxido de polietileno (PLA-PEO) puede tener una mayor velocidad de liberación del agente terapéutico en comparación con el copolímero de ácido poliláctico/policaprolactona (PLA-PCL). Las cantidades relativas y las velocidades de dosificación del agente terapéutico administrado en el tiempo pueden ser controladas por cantidades relativas de los polímeros que liberan más rápidamente en relación con los polímeros que liberan más lentamente. Para velocidades de liberación iniciales superiores la proporción de polímero de liberación más rápida puede aumentarse con respecto a la del polímero de liberación más lenta. Si se desea que la mayor parte de la dosis se libere en un período de tiempo prolongado, la mayor parte del polímero puede ser del polímero de liberación lenta. El dispositivo se puede recubrir por pulverización de éste con una solución o dispersión de polímero, principio activo y solvente. El solvente se puede evaporar, dejando un recubrimiento de polímero y principio activo. El principio activo se puede disolver y/o dispersar en el polímero. En algunas realizaciones, los copolímeros se pueden extrudir sobre el dispositivo.

20 Niveles de dosis entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente entre 0.5 y aproximadamente 75 mg/kg de peso corporal por día y muy preferentemente entre aproximadamente 1 y 50 mg/kg de peso corporal por día del principio activo son útiles en una monoterapia para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas.

25 Generalmente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se administrarán entre aproximadamente 1 y 5 veces por día o alternativamente, como una infusión continua. Alternativamente, las composiciones de la presente invención se pueden administrar en una formulación pulsátil. Dicha administración se puede usar como una terapia crónica o aguda. La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo del huésped tratado y del modo específico de administración. Una preparación típica contendrá entre aproximadamente 5% y aproximadamente 95% del compuesto activo (p/p). Preferentemente, dichas preparaciones contienen entre aproximadamente 20% y aproximadamente 80% del principio activo.

30 Cuando las composiciones de esta invención comprenden una combinación de un compuesto de fórmula (I) y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional deben estar presentes en niveles de dosis entre aproximadamente 10% y 80% de la dosis administrada normalmente en un régimen de monoterapia.

35 Luego de la mejoría de la afección del paciente, se puede administrar, si fuera necesario, una dosis de mantenimiento de un compuesto, una composición o una combinación de esta invención. Posteriormente, la dosis o frecuencia de administración, o ambas, se pueden reducir en función de los síntomas hasta un nivel en que se mantenga la mejoría de la afección; cuando los síntomas se hayan aliviado hasta el nivel deseado, el tratamiento debe cesar. Sin embargo, los pacientes pueden necesitar un tratamiento intermitente a largo plazo, luego de cualquier recurrencia o síntomas de la enfermedad.

40 Como apreciará un experto en el área, pueden ser deseables dosis mayores o menores de las indicadas antes. La dosificación específica y el régimen de tratamiento para cualquier paciente particular dependerán de diversos factores, como la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el género, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el curso de la enfermedad, la disposición del paciente a la enfermedad y el juicio del médico tratante.

45 Según otra realización, la invención proporciona un compuesto, una composición farmacéutica o una combinación como las descritas en este documento para usar en métodos de tratamiento o prevención de una infección bacteriana, o un estado patológico, que comprende el paso de administrar a un paciente cualquier compuesto, composición farmacéutica o combinación descritas en este documento. El término "paciente" según se usa en este documento, significa un animal, preferentemente un mamífero, y muy preferentemente un humano.

50 Los compuestos de esta invención también son útiles como reactivos comerciales que se unen efectivamente a las enzimas girasa B y/o topoisomerasa IV. Como agentes comerciales, los compuestos de esta invención y sus derivados se pueden usar para bloquear la actividad de la girasa B y/o la topoisomerasa IV en ensayos bioquímicos o celulares para girasa B y/o topoisomerasa IV bacterianas o sus homólogos, o se pueden derivatizar para unirse a una resina estable como un sustrato anclado para aplicaciones de cromatografía de afinidad. Estos y otros usos que caracterizan a los inhibidores comerciales de la girasa B y/o la topoisomerasa IV serán evidentes para los expertos en el área.



5 Los compuestos de esta invención se pueden preparar de conformidad con los métodos generales conocidos por los expertos en el área para compuestos análogos, como enseñan la patente de Estados Unidos N° RE40245 E; la patente de Estados Unidos N° 7,495,014 B2; la patente de Estados Unidos N° 7,569,591 B2; la patente de Estados Unidos N° 7,582,641 B2; la patente de Estados Unidos N° 7,618,974 B2; y la patente de Estados Unidos N° 7,727,992 B2. Los detalles de las condiciones utilizadas para preparar los compuestos de la presente invención se indican en los ejemplos.

A fin de que esta invención se comprenda mejor, se dan a conocer los ejemplos siguientes.

Las definiciones siguientes describen los términos y abreviaturas (en inglés) utilizados en este documento:

Ac	acetilo
Bu	butilo
Et	etilo
Ph	fenilo
Me	metilo
THF	tetrahidrofurano
DCM	diclorometano
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
EtOAc	acetato de etilo
CH <sub>3</sub> CN	acetonitrilo
EtOH	etanol
Et <sub>2</sub> O	éter dietílico
MeOH	metanol
MTBE	metil <i>tert</i> -butil éter
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMA	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
DMSO	dimetilsulfóxido
HOAc	ácido acético
TEA	triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético
TFAA	anhídrido trifluoroacético
Et <sub>3</sub> N	triethylamina
DIPEA	diisopropyletilamina

ES 2 545 516 T3

DIEA	diisopropiletilamina
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de potasio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de sodio
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	tiosulfato de sodio
Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de cesio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sodio
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnesio
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de potasio
NH <sub>4</sub> Cl	cloruro de amonio
LC/MS	cromatografía líquida/espectro de masas
GCMS	cromatografía gaseosa espectro de masas
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
GC	cromatografía gaseosa
LC	cromatografía líquida
IC	cromatografía iónica
IM	intramuscular
CFU/cfu	unidades formadoras de colonia
MIC	concentración inhibitoria mínima
Hr o h	horas
atm	atmósferas
rt o RT	temperatura ambiente
TLC	cromatografía en capa delgada
HCl	ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> O	agua
EtNCO	isocianato de etilo

Pd/C	paladio sobre carbón
NaOAc	acetato de sodio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
N <sub>2</sub>	gas de nitrógeno
H <sub>2</sub>	gas de hidrógeno
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butil litio
DI	desionizada
Pd(OAc) <sub>2</sub>	acetato de paladio (II)
PPh <sub>3</sub>	trifenilfosfina
<i>i</i> -PrOH	alcohol isopropílico
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
Pd[(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> ]	tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)
PTFE	politetrafluoroetileno
rpm	revoluciones por minuto
SM	material de partida
Equiv.	equivalentes
<sup>1</sup> H-NMR	resonancia magnética nuclear de protón
HPMCAS	acetato de hidroxipropilmetilcelulosa
PVP	polivinilpirrolidona
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
K <sub>2</sub> EDTA	etilenodiaminotetraacetato dibásico de potasio
mCPBA	ácido meta-cloroperoxibenzoico
aq	acuoso
Boc <sub>2</sub> O	dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo;
DMAP	<i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
mL	mililitros
L	litros

## ES 2 545 516 T3

mol	moles
g	gramos
LCMS	cromatografía líquida-espectrometría de masas
MHz	megahertzios
CDCl <sub>3</sub>	deuterocloroformo
NEt <sub>3</sub>	trietilamina
mmol	milimoles
psi	libras por pulgada cuadrada
<i>i</i> PrOH	alcohol isopropílico
ppm	partes por millón
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	nitrato de amonio
Hz	hertzios
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	[1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaladio(II)
L	litros
MeOD	deutero-metanol
CD <sub>3</sub> OD	deutero-metanol
ee	exceso enantiomérico
min	minutos
Bn	bencilo
RBF	balón
MeCN	acetonitrilo
PES	poliétersulfona
mm	milímetros
μm	micrómetros
M	molar
N	normal
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo

## ES 2 545 516 T3

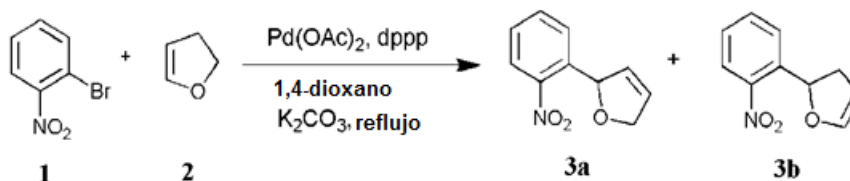
ESMS	espectrometría de masas con electronebulización
CV	volumen de la columna
D <sub>2</sub> O	óxido de deuterio
NH <sub>3</sub>	amoníaco
OBD	densidad óptima del lecho
mg	miligramos
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ATCC	American Type Culture Collection
MHII	Mueller Hinton II
µL	microlitros
WT	tipo silvestre
CGSC	Coli Genetic Stock Center
MS	espectrometría de masas
IS	estándar interno
APCI	ionización química a presión atmosférica
MRM	monitoreo de reacciones múltiples
m/z	relación masa a carga.
LLOQ	límite inferior de cuantificación
ng	nanogramos
UV	ultravioleta
SD	desviación estándar
% CV	coeficiente de variación
PO	perioral
MC	celulosa microcristalina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético o etilendiaminotetraacetato
PK	farmacocinética
IV	intravenosa

## ES 2 545 516 T3

D5W	5% de dextrosa en solución acuosa
HPMC-AS	acetil succinato de hidroxipropilmetilcelulosa
PVP	polivinilpirrolidona
CAPT	captisol
ATP	trifosfato de adenosina
ADP	difosfato de adenosina
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
mM	milimolar
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
KCl	cloruro de potasio
μM	micromolar
DTT	ditiotreitol
nM	nanomolar
K <sub>i</sub>	constante de disociación
IC <sub>50</sub>	media de la concentración inhibitoria máxima
μg	microgramos
BSA	seroalbúmina bovina
LDH	lactato deshidrogenasa
PVDF	fluoruro de polivinilideno
AcN	acetonitrilo
V <sub>MÁX</sub>	la velocidad inicial máxima o velocidad máxima de una reacción

### Ejemplo 1

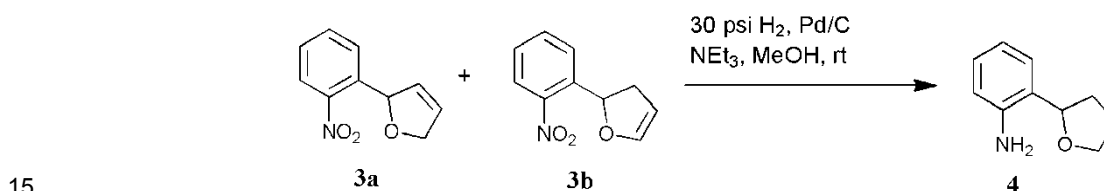
Preparación de 2-(2-nitrofenil)-2,5-dihidrofurano y 2-(2-nitrofenil)-2,3-dihidrofurano (3a y 3b).



Se mezclaron 1-bromo-2-nitro-benceno (1) (600 g, 99%, 2.941 mol, Alfa Aesar A11686), 1,3-bis(difenilfosfino)propano (62.50 g, 97%, 147.0 mmol, Alfa Aesar A12931), 1,4-dioxano (2.970 L, Sigma-Aldrich 360481), carbonato de potasio (812.9 g, 5.882 mol, JT-Baker 301201) y 2,3-dihidrofurano (2) (1.041 kg, 99%, 1.124 L, 14.70 mol, Aldrich 200018). Se hizo burbujear una corriente de nitrógeno a través de la mezcla en agitación durante 4 h, seguido de la adición de acetato de paladio (II) (16.51 g, 73.52 mmol, Strem 461780) y continuación de la desoxigenación durante otros 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó a reflujo en atmósfera de nitrógeno toda la noche (el análisis de NMR de una alícuota procesada mostró el consumo total de bromuro de arilo). Se dejó enfriar, se diluyó con hexano (1 L), se filtró a través de un taco corto de Florisil® (500 g, - 200 mesh) y se eluyó con EtOAc. El filtrado se concentró a presión reducida (2-(2-nitrofenil)-2,3-dihidrofurano es volátil en alto vacío y puede ser algo inestable a temperatura ambiente) dando una mezcla de (3a) y (3b) como un aceite marrón oscuro (654.0 g). El material crudo se almacenó en el refrigerador y se usó más adelante sin purificación adicional.

## Ejemplo 2

Preparación de 2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (4).



Se colocó 5% de paladio sobre carbón (16.3 g, 50% húmedo, 3.83 mmol, Aldrich 330116) en un frasco Parr en atmósfera de nitrógeno, seguido de MeOH (100 mL, JT-Baker 909333). Se agregó la mezcla cruda de 2-(2-nitrofenil)-2,5-dihidrofurano y 2-(2-nitrofenil)-2,3-dihidrofurano (3a y 3b) (163 g) se disolvió en MeOH (389 mL), seguido de NEt<sub>3</sub> (237.6 mL, 1.705 mol, Sigma-Aldrich 471283). Se colocó el recipiente en un agitador Parr y se saturó con H<sub>2</sub>. Se agregó H<sub>2</sub> a 30 psi y se agitó hasta consumo total (los análisis de LCMS y NMR mostraron reacción completa). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno, se filtró a través de Celite™ y se enjuagó con EtOAc. El filtrado se concentró en un rotavapor para dar un aceite marrón. La reacción se repitió tres veces más en la misma escala y los lotes se combinaron para purificación. El producto crudo se destiló al vacío (ca. 15 torr) recogiendo el destilado a 108 -129 °C para dar (4) como un aceite amarillo pálido transparente (427.9 g, el rendimiento promedio fue 84%; la pureza por GCMS 98%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 163.95 (1.46 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.15 - 7.04 (m, 2H), 6.77 - 6.62 (m, 2H), 4.85 - 4.77 (m, 1H), 4.18 (s, 2H), 4.12 - 4.02 (m, 1H), 3.94 - 3.85 (m, 1H), 2.25 - 1.95 (m, 4H) ppm.

## Ejemplo 2a

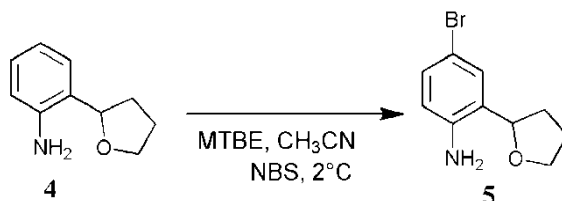
Preparación de (R)-2-(tetrahidrofuran-2-il)-anilina (4a).



Se disolvieron 33 g de compuesto (4) en MeOH (265 ml) lo que resultó en una concentración de aproximadamente 125 mg/ml. La mezcla se filtró a través de un filtro de membrana de 0.2 micrómetros después se le realizó una cromatografía en una columna ChiralPak® IC (30 mm X 150 mm, temperatura de la columna 35 °C, Chiral Technologies) a 100 bar empleando un sistema cromatográfico de fluidos supercríticos Berger multigram. La fase móvil fue CO<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (90:10) eluyendo a 350 ml/min con monitoreo UV a 220 nanómetros. Se obtuvieron 15.64 g del producto deseado (4a) como un aceite verde. La SFC analítica (CO<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH [90:10], a 5 ml/min en una columna ChiralPak IC (4.6 X 100 mm) mantenida a 35 °C y corrida a una presión de 100 bar con monitoreo UV a 220 nm) mostró 95.5% de ee con una pureza global de 95%.

## Ejemplo 3

Preparación de 4-bromo-2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (5).



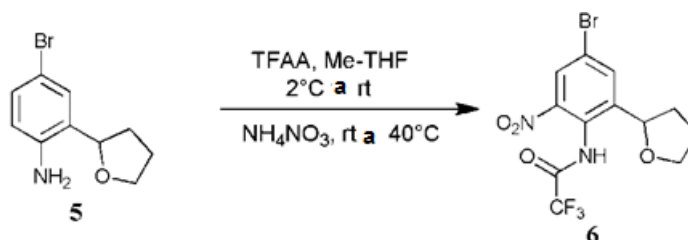
5 A una solución en agitación de 2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (4) (53.45 g, 327.5 mmol) en metil tert-butil éter (MTBE, 641.4 mL) y acetonitrilo (213.8 mL) enfriada a 2 °C se le agregó N-bromosuccinimida (58.88 g, 99%, 327.5 mmol, Aldrich B81255) en 4 porciones manteniendo la temperatura interna por debajo de aproximadamente 8 °C. La mezcla de reacción se agitó mientras se enfriaba con un baño de agua-hielo durante 30 minutos (el análisis de NMR de una alícuota procesada mostró el consumo total del material de partida). Se agregó Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O acuoso 1 N; (330 mL), se retiró el baño frío y se agitó durante 20 minutos. La mezcla se diluyó con EtOAc y las capas se separaron.

10 La fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (2 veces), agua y solución saturada de cloruro de sodio, se secó en MgSO<sub>4</sub>, se filtró a través de un taco corto de sílice, se eluyó con EtOAc, y se concentró a presión reducida para dar (5) como un aceite color ámbar muy oscuro (82.25 g, pureza por HPLC 77-94%). Se usó más adelante sin purificación adicional. LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 242.10 (2.89 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.22 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.79 - 4.73 (m, 1H), 4.15 (s, 2H), 4.10 - 4.01 (m, 1H), 3.93 - 3.85 (m, 1H), 2.26 - 2.13 (m, 1H), 2.12 - 1.97 (m, 3H) ppm.

15

## Ejemplo 4

Preparación de N-(4-bromo-2-nitro-6-tetrahidrofuran-2-il-fenil)-2,2,2-trifluoroacetamida (6).



20 A anhídrido trifluoroacético (455.3 mL, 3.275 mol, Sigma-Aldrich 106232) en agitación a 2 °C se le agregó lentamente 4-bromo-2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (5) (79.29 g, 327.5 mmol) como un aceite denso a través de un embudo de adición en el transcurso de 15 minutos (la temperatura de la reacción se elevó a 14 °C). El aceite restante se enjuagó en la mezcla de reacción con 2-metiltetrahidrofurano anhidro (39.6 mL, Sigma-Aldrich 414247). Se retiró el baño frío y se agregó nitrato de amonio (34.08 g, 425.8 mmol, Aldrich 467758). La temperatura de reacción se elevó a 40 °C en el transcurso de aproximadamente 30 minutos tiempo en el que se usó un baño de agua fría para controlar la reacción exotérmica y llevarla a temperatura ambiente. Después se retiró el baño frío y se continuó agitando durante otros 40 minutos (el análisis de HPLC mostró muy poco material sin nitrar restante).

25 La mezcla de reacción se vertió lentamente en una mezcla en agitación de hielo picado (800 g). El precipitado sólido se recogió por filtración, se lavó con agua, NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (hasta pH 8), agua de nuevo y hexano. El sólido húmedo se secó primero en una estufa de convección a 50 °C durante varias horas y después a presión reducida en una estufa a 40 °C toda la noche para dar (6) como un sólido marrón claro (77.86 g, rendimiento 62%; pureza por HPLC 98%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 383.19 (3.27 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.81 (s, 1H), 8.08 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.88 (dd, J = 9.0, 6.5 Hz, 1H), 4.17 - 4.08 (m, 1H), 4.03 - 3.95 (m, 1H), 2.45 - 2.34 (m, 1H), 2.17 - 2.06 (m, 2H), 1.96 - 1.83 (m, 1H) ppm.

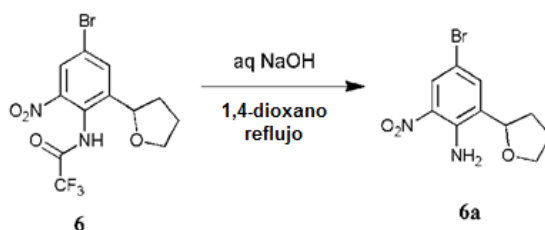
30

35

## Ejemplo 5

Preparación de 4-bromo-2-nitro-6-tetrahidrofuran-2-il-anilina (6a).

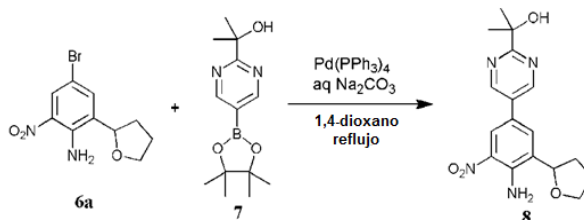




Se disolvió N-(4-bromo-2-nitro-6-tetrahydrofuran-2-il-fenil)-2,2,2-trifluoroacetamida (6) (54.00 g, 140.9 mmol) en 1,4-dioxano (162 mL) y se agregó NaOH acuoso 6 M (70.45 mL, 422.7 mmol, JT-Baker 567202). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 2 días (el análisis de HPLC mostró conversión completa), se dejó enfriar, se diluyó con MTBE (800 mL), se lavó con agua (2 x 200 mL), NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado, agua y solución saturada de cloruro de sodio. La mezcla se secó en MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a presión reducida para dar (6a) como un aceite ámbar oscuro (40.96 g, rendimiento 93%; pureza total HPLC más NMR 92%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de MeOH/agua 10-90% en 3-5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 287.28 (3.44 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.91 (s, 2H), 4.80 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.14 - 4.05 (m, 1H), 3.98 - 3.90 (m, 1H), 2.36 - 2.19 (m, 1H), 2.15 - 2.01 (m, 3H) ppm.

## Ejemplo 6

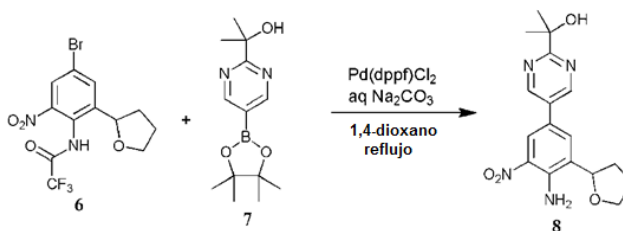
Preparación de 2-[5-(4-amino-3-nitro-5-tetrahydrofuran-2-il-fenil)pirimidin-2-il]propan-2-ol (8).



Se mezclaron 4-bromo-2-nitro-6-tetrahydrofuran-2-il-anilina (6a) (40.40 g, 92%, 129.5 mmol), 1,4-dioxano (260 mL, Sigma-Aldrich 360481), 2-[5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il]propan-2-ol (7) (41.05 g, 155.4 mmol), y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso 2.7 M (143.9 mL, 388.5 mmol). Se hizo burbujear una corriente de nitrógeno a través de la mezcla en agitación durante 1 h, seguido de la adición de tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (7.48 g, 6.47 mmol, Strem 462150). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 2 h (el análisis de HPLC mostró reacción completa), se dejó enfriar, se diluyó con EtOAc, se lavó con agua, NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado y solución saturada de cloruro de sodio, se secó en MgSO<sub>4</sub> y se filtró a través de un taco corto de Florisil® eluyendo con EtOAc. El filtrado se concentró a presión reducida para dar un aceite marrón oscuro. Se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se eluyó a través de un taco corto de gel de sílice con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y después EtOAc. La fracción deseada se concentró en un rotavapor hasta que se formó un precipitado para dar una lechada densa color marrón, que se trituró con MTBE. El sólido se recogió por filtración, se lavó con MTBE y se secó en alto vacío para dar (8) como un sólido amarillo (35.14 g, pureza por HPLC 99+%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 345.00 (2.69 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.88 (s, 2H), 8.36 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.09 (s, 2H), 4.92 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.20 - 4.11 (m, 1H), 4.03 - 3.94 (m, 1H), 2.39 - 2.26 (m, 1H), 2.23 - 2.08 (m, 3H), 1.64 (s, 6H) ppm. El filtrado se concentró y se purificó posteriormente por cromatografía en gel de sílice ISCO eluyendo con 0 a 80% de EtOAc/hexano para dar una segunda cosecha de producto (8) como un sólido color ámbar (4.46 g, rendimiento general 88%; pureza por HPLC 88%).

## Ejemplo 7

Preparación alternativa de 2-[5-(4-amino-3-nitro-5-tetrahydrofuran-2-il-fenil)pirimidin-2-il]propan-2-ol (8).

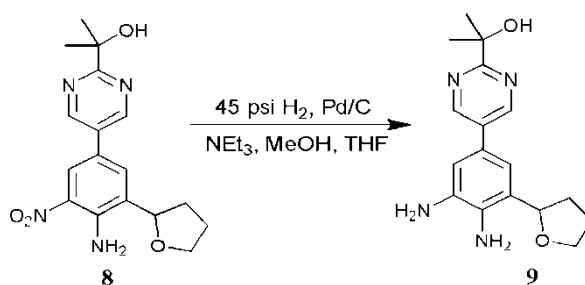


Se mezclaron N-(4-bromo-2-nitro-6-tetrahydrofuran-2-il-fenil)-2,2,2-trifluoroacetamida (6) (19.00 g, 49.59 mmol), 2-[5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il]propan-2-ol (7) (14.41 g, 54.55 mmol), carbonato de sodio acuoso 2.7 M (73.48 mL, 198.4 mmol) y 1,4-dioxano (190 mL, Sigma-Aldrich 360481). Se hizo burbujear una

corriente de nitrógeno a través de la mezcla en agitación durante 40 minutos, seguido de la adición de aducto de 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno dicloropaldio diclorometano (2.025 g, 2.480 mmol, Strem 460450). La mezcla de reacción se agitó a reflujo en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 7 h, se agregaron otros 50 mL de carbonato de sodio acuoso saturado, y se calentó a reflujo durante otras 16 h. La mezcla se dejó enfriar, después se diluyó con EtOAc (500 mL) y agua (200 mL). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (200 mL). La fase orgánica combinada se lavó con agua (500 mL), solución saturada de cloruro de sodio (500 mL), se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró a través de un tapón de Florisil® y se concentró en un rotavapor para dar (8) crudo como un aceite anaranjado. El producto crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice ISCO eluyendo con 20-90% de EtOAc/hexano para dar (8) como un sólido anaranjado (15.00 g, rendimiento 87%; pureza 81-88%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 345.35 (2.68 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.88 (s, 2H), 8.36 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.09 (s, 2H), 4.92 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.20 - 4.11 (m, 1H), 4.03 - 3.94 (m, 1H), 2.39 - 2.26 (m, 1H), 2.23 - 2.08 (m, 3H), 1.64 (s, 6H) ppm.

## Ejemplo 8

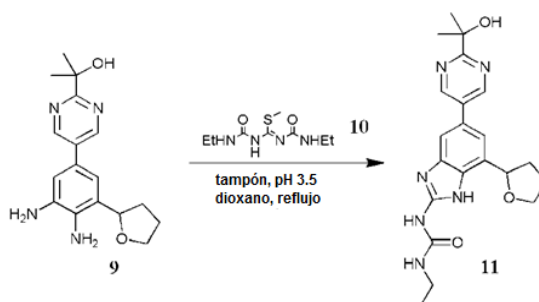
Preparación de 2-[5-(3,4-diamino-5-tetrahidrofuran-2-il-fenil)pirimidin-2-il]propan-2-ol (9).



A una suspensión de 2-[5-(4-amino-3-nitro-5-tetrahidrofuran-2-il-fenil)pirimidin-2-il]propan-2-ol (8) (30.10 g, 87.41 mmol) y THF (90 mL) en un frasco Parr en atmósfera de nitrógeno se le agregó una lechada de 5% de paladio sobre carbón (3.01 g, 50% húmedo, 0.707 mmol, Aldrich 330116) en MeOH (90 mL, JT-Baker 909333), seguido de NEt<sub>3</sub> (24.37 mL, 174.8 mmol, Sigma-Aldrich 471283). Se colocó el recipiente en un agitador Parr y se saturó con H<sub>2</sub>. Se agregó H<sub>2</sub> a 45 psi y se agitó hasta consumo total (el análisis por HPLC mostró conversión completa). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno, se filtró a través de Celite™ y se enjuagó con EtOAc. El filtrado se volvió a filtrar a través de papel de filtro de fibra de vidrio de 0.5 micrómetros en sándwich entre 2 papeles P5, y se concentró a presión reducida para dar (9) como una espuma de color marrón claro (28.96 g, rendimiento 98%; pureza por NMR 93%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 315.32 (1.54 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.83 (s, 2H), 6.92 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 4.90 (dd, J = 7.9, 6.2 Hz, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.18 (s, 2H), 4.17 - 4.08 (m, 1H), 3.99 - 3.89 (m, 1H), 3.46 (s, 2H), 2.34 - 2.19 (m, 1H), 2.17 - 2.05 (m, 3H), 1.63 (s, 6H) ppm.

## Ejemplo 9

Preparación de 1-etil-3-[5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-tetrahidrofuran-2-il-1H-bencimidazol-2-il]urea (11).

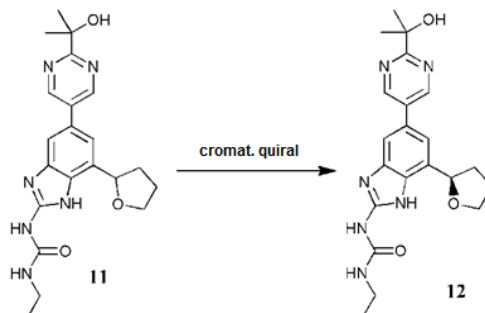


A una solución en agitación de 2-[5-(3,4-diamino-5-tetrahidrofuran-2-il-fenil)pirimidin-2-il]propan-2-ol (9) (32.10 g, 102.1 mmol) en 1,4-dioxano (160.5 mL, Sigma-Aldrich 360481) se le agregó un tampón de pH 3.5 (240.8 mL), preparado disolviendo NaOAc trihidratado (34.5 g) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso 1 N (240 mL). Se agregó 1-etil-3-(N-etilcarbamoyl)-C-metilsulfanil-carbonimidoylurea (10) (28.46 g, 122.5 mmol, CB Research and Development) y se agitó a reflujo durante toda la noche (el análisis de HPLC mostró 99% de consumo de la diamina de partida). La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se vertió en porciones (espumando) en una solución en agitación de NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (480 mL) y agua (120 mL) que dio pH 8-9. Esto se agitó durante 30 minutos, el sólido se recogió por filtración, se lavó copiosamente con agua hasta pH neutro, y después más moderadamente con EtOH. El sólido se secó a presión reducida para dar (11) como un sólido blancuzco (34.48 g, rendimiento 82%; pureza por HPLC 99.4%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con

modificador de ácido fórmico) M+1: 411.41 (1.73 min).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, MeOD)  $\delta$  9.02 (s, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.23 (dd,  $J = 14.5, 7.3$  Hz, 1H), 4.01 (dd,  $J = 15.0, 7.1$  Hz, 1H), 3.38 - 3.28 (m, 2H), 2.58 - 2.46 (m, 1H), 2.16 - 2.05 (m, 2H), 2.02 - 1.88 (m, 1H), 1.63 (s, 6H), 1.22 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H) ppm.

## Ejemplo 10

- 5 Aislamiento cromatográfico quiral de 1-etil-3-[5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (12).



10 Una muestra racémica de 1-etil-3-[5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (11) (24.60 g) se resolvió en una columna CHIRALPAK® IC® (por Chiral Technologies) eluyendo con DCM/MeOH/TEA (60/40/0.1) a 35 °C para dar el enantiómero deseado (12) como un sólido blanco (11.35 g, rendimiento 45%; pureza por HPLC 99+%, 99+% de ee). El tiempo de retención de la HPLC analítica quiral fue de 6.2 min (columna CHIRALPAK® IC® 4.6 x 250 mm, velocidad de flujo 1 mL/min, 30 °C).

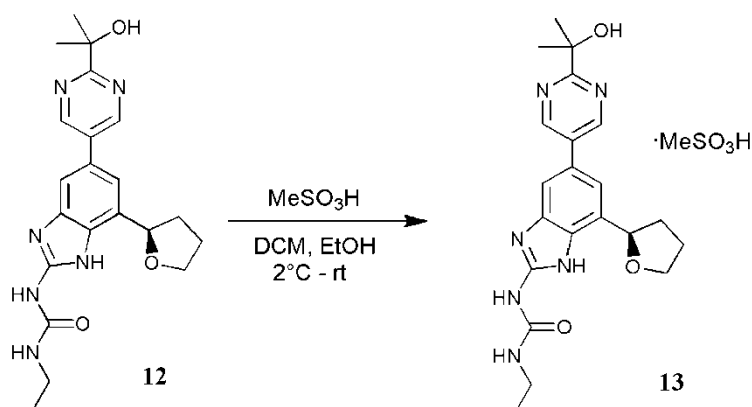
15 La estructura y la estereoquímica absoluta de 12 se confirmaron por análisis de difracción de rayos X de un solo cristal. Los datos de difracción de un solo cristal se obtuvieron en un difractómetro Bruker Apex II equipado con una fuente de Cu K-alfa con tubo sellado (radiación Cu K $\alpha$ ,  $\gamma = 1.54178$  Å) y un detector Apex II CCD. Se eligió un cristal con dimensiones de  $\frac{1}{2} \times 0.05 \times 0.05$ , se limpió con aceite mineral, se montó en un MicroMount y se centró en un sistema Bruker APEXII. Se obtuvieron tres lotes de 40 marcos separados en espacio recíproco para proporcionar una matriz de orientación y parámetros de celda iniciales. Los parámetros de celda finales se obtuvieron y se refinaron una vez que se completó la obtención de datos basándose en el conjunto de datos total. Basándose en las ausencias sistemáticas y las estadísticas de las intensidades la estructura se resolvió y se refinó en un grupo espacial  $P2_1$  acéntrico.

25 Se obtuvo un conjunto de datos de difracción de espacio recíproco a una resolución de 0.9 Å usando pasos de 0.5° y exposición de 60 s para cada marco. Los datos se recogieron a 100 (2) K. La integración de las intensidades y el refinamiento de los parámetros de la celda se llevaron a cabo con el software APEXII. La observación del cristal después de la obtención de los datos mostró que no había signos de descomposición. Como se muestra en la figura 1, hay dos moléculas de simetría independiente en la estructura y ambas moléculas de simetría independiente son isómeros *R*.

30 Los datos se obtuvieron, se refinaron y se redujeron usando el software Apex II. La estructura se resolvió usando el o los programas *SHELXS97* (Sheldrick, 1990); y la estructura se refinó usando el programa *SHELXL97* (Sheldrick, 1997). Los cristales muestran una celda monoclinica con grupo espacial  $P2_1$ . Los parámetros de la red son  $a = 9.8423(4)$  Å,  $b = 10.8426(3)$  Å,  $c = 19.4441(7)$  Å,  $\beta = 102.966(3)^\circ$ . Volumen =  $2022.09(12)$  Å $^3$ .

## Ejemplo 11

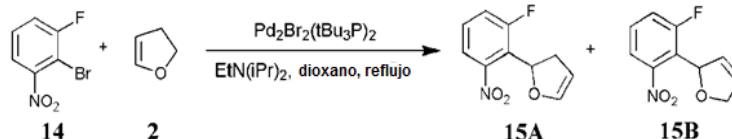
Preparación de la sal del ácido metanosulfónico de 1-etil-3-[5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (13).



Una suspensión en agitación de 1-etil-3-[5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-benzimidazol-2-il]urea (12) (9.32 g, 22.71 mmol) en etanol absoluto (93.2 mL) se enfrió en un baño de agua-hielo. Se agregó ácido metanosulfónico (1.548 mL, 23.85 mmol, Sigma-Aldrich 471356), se retiró el baño frío y se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se concentró en un rotavapor a 35 °C hasta una lechada densa, se diluyó con EtOAc, el sólido se recogió por filtración, se lavó con EtOAc y se secó a presión reducida para dar una cosecha inicial de (13) como un sólido blanco (8.10 g). El filtrado se concentró en un rotavapor para dar una espuma cristalina amarillenta, que se disolvió en EtOH, se concentró hasta una lechada sólida, se trituró con EtOAc/Et<sub>2</sub>O y se recogió por filtración. El sólido se lavó con EtOAc/Et<sub>2</sub>O, se combinó con la primera cosecha, y se secó a presión reducida para dar (13) como un sólido blanco (9.89 g, rendimiento 86%; pureza por HPLC 99+%, 99+% de ee). La HPLC analítica quiral muestra un enantiómero con tiempo de retención de 6.3 min que eluye con DCM/MeOH/TEA (60/40/0.1) en una columna CHIRALPAK® IC® 4.6 x 250 mm con velocidad de flujo de 1 mL/min a 30 °C. LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 411.53 (1.74 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, MeOD) δ 9.07 (s, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 5.30 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 14.6, 7.3 Hz, 1H), 4.04 (dd, J = 15.0, 7.6 Hz, 1H), 3.40 - 3.30 (m, 2H), 2.72 (s, 3H), 2.65 - 2.54 (m, 1H), 2.20 - 2.07 (m, 2H), 2.04 - 1.90 (m, 1H), 1.64 (s, 6H), 1.23 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm.

## Ejemplo 12

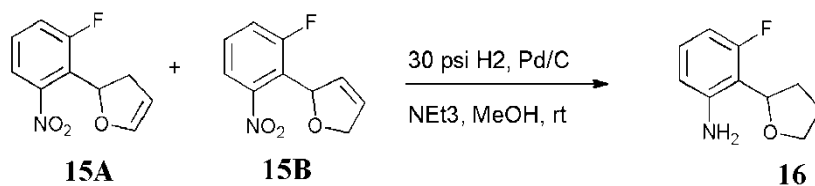
Preparación de 2-(2-fluoro-6-nitro-fenil)-2,3-dihidrofurano (15A) y 2-(2-fluoro-6-nitro-fenil)-2,5-dihidrofurano (15B).



Se cargaron 2-Bromo-1-fluoro-3-nitro-benceno (14) (200.3 g, 98%, 892.3 mmol, Bosche F6657), 1,4-dioxano (981.5 mL, Sigma-Aldrich 360481) y 2,3-dihidrofurano (2) (341.1 mL, 99%, 4.462 mol, Aldrich 200018) en un matraz de reacción, seguido de N,N-diisopropiletilamina (155.4 mL, 892.3 mmol, Sigma-Aldrich 550043) y dímero de bromo(tri-tert-butilfosfina)paladio(I) (6.936 g, 8.923 mmol, Johnson Matthey C4099). La mezcla se agitó a reflujo durante 2 h (el análisis de HPLC mostró 98% de consumo del bromuro de arilo de partida). Se dejó enfriar, el precipitado se eliminó por filtración, se enjuagó con EtOAc y se concentró al vacío hasta un aceite semisólido marrón rojizo oscuro. Éste se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se eluyó a través de un taco de sílice con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y se concentró al vacío para dar una mezcla de 15A y 15B como un aceite color ámbar oscuro (291.3 g). El producto crudo se usó sin purificación posterior. El producto principal fue 2-(2-fluoro-6-nitro-fenil)-2,3-dihidrofurano (15A) (96%): LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 210.23 (3.13 min); <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.54 (dt, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.43 (td, J = 8.2, 5.2 Hz, 1H), 7.32 (ddd, J = 9.7, 8.3, 1.3 Hz, 1H), 6.33 (dd, J = 4.9, 2.4 Hz, 1H), 5.80 (t, J = 10.9 Hz, 1H), 5.06 (c, J = 2.4 Hz, 1H), 3.18 - 3.07 (m, 1H), 2.94 - 2.82 (m, 1H) ppm. El producto menor fue 2-(2-fluoro-6-nitro-fenil)-2,5-dihidrofurano (15B) (4%): GCMS (columna Agilent HP-5MS 30 m x 250 μm x 0.25 μm calentada a 60 °C durante 2 min hasta 300 °C en 15 min con una velocidad de flujo de 1 mL/min) M+1: 210 (11.95 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.43 - 7.34 (m, 1H), 7.30 - 7.23 (m, 1H), 6.21 - 6.15 (m, 1H), 6.11 - 6.06 (m, 1H), 5.97 - 5.91 (m, 1H), 4.89 - 4.73 (m, 2H) ppm.

## Ejemplo 13

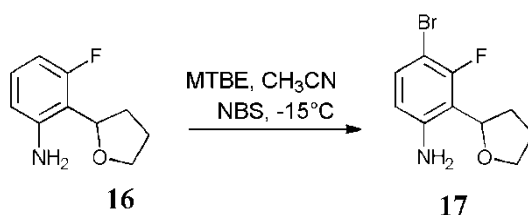
Preparación de 3-fluoro-2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (16).



Se colocó 5% de paladio sobre carbón (37.3 g, 50% húmedo, 8.76 mmol, Aldrich 330116) en un frasco Parr en atmósfera de nitrógeno, seguido de MeOH (70 mL, JT-Baker 909333). Se agregó la mezcla cruda de 2-(2-fluoro-6-nitro-fenil)-2,3-dihidrofurano y 2-(2-fluoro-6-nitro-fenil)-2,5-dihidrofurano (15A y 15B) (186.6 g, 892.1 mmol) se disolvió en MeOH (117 mL), seguido de NEt<sub>3</sub> (124.3 mL, 892.1 mmol, Sigma-Aldrich 471283). Se colocó el recipiente en un agitador Parr y se saturó con H<sub>2</sub>. Después de agregar H<sub>2</sub> a 45 psi, la mezcla de reacción se agitó hasta que el consumo del material de partida fue total (los análisis de HPLC y LCMS mostraron reacción completa). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno, se filtró a través de Celite™ y se enjuagó con EtOAc. El filtrado se concentró en rotavapor para dar un aceite marrón, que se disolvió en Et<sub>2</sub>O y se lavó con agua (2 veces). La fase etérea se extrajo con HCl acuoso 1 N (5 x 250 mL), que se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 veces) y después se basificó con NaOH 6 N hasta pH 12-14. La fase acuosa básica se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 veces) y los extractos orgánicos combinados se lavaron con NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado, se secaron en MgSO<sub>4</sub> y se filtraron a través de una almohadilla de sílice eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 25% de EtOAc/hexano. El filtrado deseado se concentró a presión reducida para dar 16 como un aceite marrón claro (121.8 g, pureza por GCMS más NMR 84%). GCMS (columna Agilent HP-5MS 30 m x 250 μm x 0.25 μm calentada a 60 °C durante 2 min hasta 300 °C en 15 min con una velocidad de flujo de 1 mL/min) M+1: 182.0 (11.44 min). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 182.10 (2.61 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.97 (td, J = 8.1, 6.3 Hz, 1H), 6.43 - 6.35 (m, 2H), 5.21 - 5.13 (m, 1H), 4.54 (s, 2H), 4.16 - 4.07 (m, 1H), 3.90 - 3.81 (m, 1H), 2.23 - 2.00 (m, 4H) ppm. Otras cosechas se obtuvieron de la manera siguiente: la fase etérea combinada se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y solución saturada de cloruro de sodio, se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se decantó y se concentró a presión reducida. El aceite se destiló al vacío (ca. 15 torr) recojiéndose el destilado a 101 -108 °C. A una solución en agitación del aceite destilado en EtOH (1 volumen) a 2 °C se le agregó lentamente HCl 5 M (1 eq.) en iPrOH. La suspensión resultante se llevó hasta temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc (3 volúmenes, vol/vol), y se agitó durante 2 h. El sólido blanco se recogió por filtración, se lavó con EtOAc y se secó a presión reducida dando una segunda cosecha de producto como la sal de HCl. El licor madre se concentró hasta una lechada, se diluyó con EtOAc y el sólido se recogió por filtración, se lavó con EtOAc y se secó al vacío para dar la sal de HCl como una tercera cosecha del producto. LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 182.10 (2.58 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.73 (s a, 3H), 7.66 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.33 (td, J = 8.2, 5.9 Hz, 1H), 7.13 - 7.05 (m, 1H), 5.26 (dd, J = 9.0, 6.5 Hz, 1H), 4.38 - 4.28 (m, 1H), 4.00 - 3.91 (m, 1H), 2.59 - 2.46 (m, 1H), 2.30 - 1.95 (m, 3H) ppm. El rendimiento global de las tres cosechas fue de 76%.

## Ejemplo 14

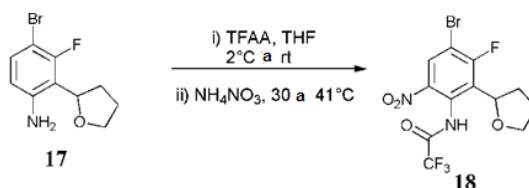
Preparación de 4-bromo-3-fluoro-2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (17).



A una solución en agitación de 3-fluoro-2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (16) (131.9 g, 92%, 669.7 mmol) en metil *tert*-butil éter (1.456 L) y acetonitrilo (485 mL) enfriada -20 °C se le agregó N-bromosuccinimida (120.4 g, 99%, 669.7 mmol, Aldrich B81255) en 3 porciones manteniendo una temperatura de reacción por debajo de aproximadamente -15 °C. Después de la adición total se continuó la agitación a una temperatura entre -15 y -10 °C durante 30 minutos. El análisis de <sup>1</sup>H NMR de una alícuota procesada mostró 96% de consumo de la anilina de partida por lo tanto se agregaron otros 4.82 g de NBS y se agitó a -10 °C durante otros 30 minutos. Se agregó Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acuoso 1 N (670 mL) a la mezcla de reacción. Se retiró el baño frío, la mezcla se agitó durante 20 minutos y después se diluyó con EtOAc. Se separaron las capas y la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (2 veces), agua y solución saturada de cloruro de sodio, se secó en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se decantó y se concentró a presión reducida para dar un aceite color ámbar oscuro. El residuo se diluyó con hexano y se eluyó a través de un taco corto de sílice eluyendo con 25% de EtOAc/hexano a 50% de EtOAc/hexano. El filtrado deseado se concentró al vacío para dar 17 como un aceite color ámbar oscuro (182.9 g, rendimiento 90%; pureza por NMR 86%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 260.12 (3.20 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.15 (dd, J = 8.6, 7.6 Hz, 1H), 6.30 (dd, J = 8.7, 1.3 Hz, 1H), 5.19 - 5.12 (m, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.16 - 4.07 (m, 1H), 3.90 - 3.81 (m, 1H), 2.23 - 1.99 (m, 4H) ppm.

## Ejemplo 15

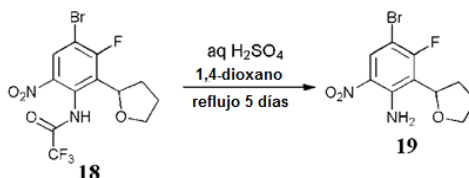
Preparación de N-(4-bromo-3-fluoro-6-nitro-2-tetrahidrofuran-2-il-fenil)-2,2,2-trifluoro-acetamida (18).



5 A anhídrido trifluoroacético (565.3 mL, 4.067 mol, Sigma-Aldrich 106232) en agitación a 2 °C se le agregó lentamente 4-bromo-3-fluoro 2-tetrahidrofuran-2-il-anilina pura (17) (123.0 g, 86%, 406.7 mmol) como un aceite  
 10 denso a través de un embudo de adición en el transcurso de 20 minutos (la temperatura de la reacción se elevó a 13 °C). El aceite restante se enjuagó en la mezcla de reacción con THF anhidro (35 mL). Se retiró el baño frío y la reacción se calentó hasta 35 °C, seguido de la adición en porciones de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (4.88 g x 20 porciones, 1.22 mol, Sigma-Aldrich A7455) en 2.5 h manteniendo la temperatura de la reacción entre 30 y 41 °C empleando un baño de  
 15 agua-hielo sólo cuando fue necesario para controlar la reacción exotérmica. Después de la adición total la mezcla de reacción se agitó otros 10 minutos (el análisis de HPLC mostró una reacción 99% completa). Se vertió lentamente sobre hielo picado (1.23 kg) y se agitó durante 1 h para permitir la formación de un precipitado sólido que se pudiera filtrar, el cual se recogió y se lavó con agua, moderadamente con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado, y nuevamente con agua (hasta pH 7). El producto se secó en una estufa de convección toda la noche a 40 °C y después a presión reducida en una estufa a 50 °C toda la noche para dar 18 como un sólido beige (152.5 g, rendimiento 90%; pureza por HPLC 96%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 401.30 (3.41 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.56 (s, 1H), 8.19 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 5.22 (dd, J = 10.3, 6.4 Hz, 1H), 4.22 (dd, J = 15.8, 7.2 Hz, 1H), 3.99 (dd, J = 16.1, 7.5 Hz, 1H), 2.50 - 2.38 (m, 1H), 2.22 - 2.11 (m, 2H), 1.86 - 1.71 (m, 1H) ppm.

## 20 Ejemplo 16

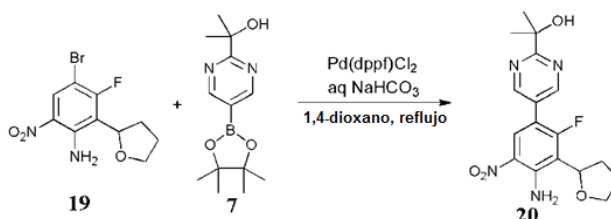
Preparación de 4-bromo-3-fluoro-6-nitro-2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (19).



25 Se cargó un matraz de reacción con N-(4-bromo-3-fluoro-6-nitro-2-tetrahidrofuran-2-il-fenil)-2,2,2-trifluoro-acetamida (18) (242.3 g, 604.1 mmol), 1,4-dioxano (1.212 L), ácido sulfúrico acuoso 2 M (362.4 mL, 724.9 mmol) y se agitó a reflujo durante 5 días (el análisis por HPLC mostró 98% de conversión). Se dejó enfriar, se diluyó con EtOAc, se neutralizó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado, se separaron las capas, y se volvió a extraer la capa acuosa con EtOAc (2 veces). La fase orgánica combinada se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (2 veces), se secó en MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío para dar 19 como un sólido marrón verdoso (181.7 g, rendimiento 94%; pureza por HPLC 95%). El producto se usó en el paso siguiente sin purificación adicional. LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 305.20 (3.63 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.35 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.45 (s, 2H), 5.23 - 5.16 (m, 1H), 4.23 - 4.14 (m, 1H), 3.93 - 3.84 (m, 1H), 2.31 - 1.96 (m, 4H) ppm.

## Ejemplo 17

Preparación de 2-[5-(4-amino-2-fluoro-5-nitro-3-tetrahidrofuran-2-il-fenil)pirimidin-2-il]propan-2-ol (20).

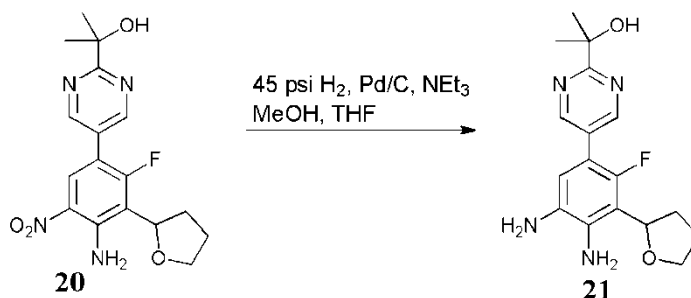


35 A una solución en agitación de 4-bromo-3-fluoro-6-nitro-2-tetrahidrofuran-2-il-anilina (19) (525.0 g, 1.721 mol, Bridge Organics Co.) en 1,4-dioxano (4.20 L, Sigma-Aldrich 360481) se le agregó una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> 1.2 M (4.302 L, 5.163 mol). Se hizo burbujear una corriente de nitrógeno a través de la mezcla en agitación durante 2 h,

seguido de la adición de 2-[5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)pirimidin-2-il]propan-2-ol (7) (545.4 g, 2.065 mol, Bridge Organics Co.) y aducto de 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno dicloropaladio diclorometano (42.16 g, 51.63 mmol, Strem 460450). La mezcla de reacción se agitó a reflujo toda la noche, se dejó enfriar, se diluyó con EtOAc (8.4 L) y se separaron las capas. La fase orgánica se lavó con NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado y después con solución saturada de cloruro de sodio. La fase acuosa se volvió a extraer con EtOAc (4 L) y se lavó este extracto orgánico con solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica combinada se secó en MgSO<sub>4</sub>, se filtró a través de un taco corto de Florisil®, se eluyó con EtOAc, y el filtrado se concentró en un rotavapor para dar un sólido húmedo de color marrón oscuro. Esto se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se cargó en una almohadilla de gel de sílice, se diluyó con hexano, después 25% de EtOAc/hexano, y después 50% de EtOAc/hexano. El filtrado deseado se concentró en un rotavapor hasta obtener una suspensión densa, el sólido se recogió por filtración, se trituroó con MTBE, y se secó al vacío para dar 20 como un sólido amarillo brillante (rendimiento 55.8%; pureza por HPLC 90-97%). El filtrado se concentró y la purificación anterior se repitió para dar una segunda cosecha de 20 como un sólido amarillo brillante (rendimiento 19.7%). El filtrado se volvió a concentrar para dar un aceite marrón oscuro y éste se cargó en una columna de sílice con tolueno y el mínimo de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se eluyó con EtOAc/hexano (0% a 50%). Las fracciones deseadas se concentraron hasta obtener una lechada y se diluyeron con MTBE/hexano. El sólido se recogió por filtración y se lavó con el mínimo de MTBE para dar una tercera cosecha de 20 como un sólido amarillo brillante (rendimiento 4.9%) con un rendimiento total de 80% de las tres cosechas. LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 363.48 (2.95 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.84 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 8.27 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.62 (s, 2H), 5.31 - 5.24 (m, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.27 - 4.18 (m, 1H), 3.97 - 3.87 (m, 1H), 2.33 - 2.05 (m, 4H), 1.64 (s, 6H) ppm.

## Ejemplo 18

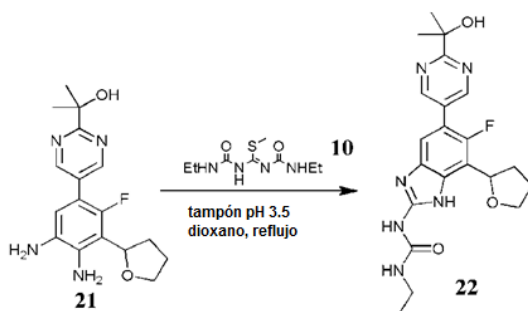
Preparación de 2-[5-(4,5-diamino-2-fluoro-3-tetrahidrofuran-2-il-fenil)pirimidin-2-il]propan-2-ol (21).



Se colocó 5% de paladio sobre carbón (14.21 g, 50% húmedo, 3.339 mmol, Aldrich 330116) en un frasco Parr en atmósfera de nitrógeno, seguido de MeOH (242 mL, JT-Baker 909333) y NEt<sub>3</sub> (46.54 mL, 333.9 mmol, Sigma-Aldrich 471283). Se disolvió 2-[5-(4-amino-2-fluoro-5-nitro-3-tetrahidrofuran-2-il-fenil)pirimidin-2-il]propan-2-ol (20) (121.0 g, 333.9 mmol) en THF caliente (360 mL), se dejó enfriar, se agregó a la mezcla de reacción y se enjuagó con otra porción de THF (124 mL). Se colocó el recipiente en un agitador Parr y se saturó con H<sub>2</sub>. Se agregó H<sub>2</sub> a 45 psi y se agitó hasta consumo total (el análisis por HPLC y LCMS mostró reacción completa). La mezcla de reacción se purgó con nitrógeno, se filtró a través de Celite™ y se enjuagó con EtOAc. Se volvió a filtrar a través de papel (microfibra de vidrio) y el filtrado se concentró al vacío. La reacción se repitió tres veces más en la misma escala y los lotes se combinaron para dar 21 como un aceite marrón (447 g, 99% de rendimiento; pureza por HPLC 93%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 333.46 (1.79 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.81 (d, J = 1.4 Hz, 2H), 6.69 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.27 - 5.20 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.23 - 4.14 (m, 1H), 3.94 - 3.86 (m, 1H), 3.22 (s, 2H), 2.32 - 2.22 (m, 1H), 2.18 - 1.99 (m, 3H), 1.63 (s, 6H) ppm.

## Ejemplo 19

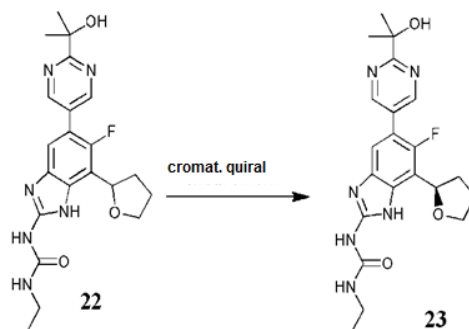
Preparación de 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-tetrahidrofuran-2-il-1H-benzimidazol-2-il]urea (22).



5 A una suspensión en agitación de 2-[5-(4,5-diamino-2-fluoro-3-tetrahydrofuran-2-yl)fenil]pirimidin-2-il]propan-2-ol (21) (111.3 g, 334.9 mmol) y 1,4-dioxano (556.5 mL, Sigma-Aldrich 360481) se le agregó 1-etil-3-(N-(etilcarbamoil)-C-metilsulfanil-carbonimidoil)urea (10) (93.36 g, 401.9 mmol, CB Research and Development) seguido de un tampón de pH 3.5 (1.113 L), preparado disolviendo NaOAc trihidratado (158.1 g) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso 1 N (1.100 L). La mezcla de reacción se agitó a reflujo toda la noche (el análisis de HPLC mostró conversión completa), se enfrió hasta temperatura ambiente y se vertió en porciones (espumando) en una solución en agitación de NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (2.23 L) que dio un pH 8-9. Esto se agitó durante 30 minutos, el sólido se recogió por filtración, se lavó copiosamente con agua hasta pH neutro, y después más moderadamente con EtOH. El sólido se secó a presión reducida para dar 22 como un sólido blancuzco amarillento (135.2 g, rendimiento 94%; pureza por HPLC 99%). LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 429.58 (2.03 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, MeOD) δ 8.95 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 5.38 (s a, 1H), 4.27 (dd, J = 14.9, 7.1 Hz, 1H), 4.01 (dd, J = 15.1, 7.0 Hz, 1H), 3.37 - 3.29 (m, 2H), 2.55 (s a, 1H), 2.19 - 2.07 (m, 2H), 2.02 - 1.82 (s a, 1H), 1.63 (s, 6H), 1.21 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm.

15 Ejemplo 20

Aislamiento cromatográfico quiral de 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahydrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (23).



20 Una muestra racémica de 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-tetrahydrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (22) (133.60 g) se resolvió en una columna CHIRALPAK® IC® (por Chiral Technologies) eluyendo con DCM/MeOH/TEA (60/40/0.1) a 25 °C para dar el enantiómero deseado (23) como un sólido blancuzco (66.8 g, rendimiento 45%; pureza por HPLC 99.8%, 99+% de ee). El tiempo de retención de la HPLC analítica quiral fue de 7.7 min (columna CHIRALPAK® IC® 4.6 x 250 mm, velocidad de flujo 1 mL/min, 30 °C). El sólido se suspendió en EtOH/Et<sub>2</sub>O 2:1 (5 volúmenes), se agitó durante 10 minutos, se recogió por filtración, se lavó con EtOH/Et<sub>2</sub>O 2:1 y se secó a presión reducida para dar un sólido blanco (60.6 g).

30 La estructura y la estereoquímica absoluta de 23 se confirmaron por análisis de difracción de rayos X de un solo cristal. Los datos de difracción de un solo cristal se obtuvieron en un difractómetro Bruker Apex II equipado con una fuente de Cu K-alfa con tubo sellado (radiación Cu Kα, γ = 1.54178 Å) y un detector Apex II CCD. Se eligió un cristal con dimensiones de 0.15 x 0.15 x 0.10 mm, se limpió con aceite mineral, se montó en un MicroMount y se centró en un sistema Bruker APEXII. Se obtuvieron tres lotes de 40 marcos separados en espacio recíproco para proporcionar una matriz de orientación y parámetros de celda iniciales. Los parámetros de celda finales se obtuvieron y se refinaron una vez que se completó la obtención de datos basada en el conjunto de datos total. Basándose en las ausencias sistemáticas y las estadísticas de las intensidades la estructura se resolvió y se refinó en un grupo espacial P2<sub>1</sub> acéntrico.

35 Se obtuvo un conjunto de datos de difracción de espacio recíproco a una resolución de 0.85 Å usando pasos de 0.5° y exposición de 30 s para cada marco. Los datos se recogieron a 100 (2) K. La integración de las intensidades y el refinamiento de los parámetros de la celda se llevaron a cabo con el software APEXII. La observación del cristal después de la obtención de los datos mostró que no había signos de descomposición. Como se muestra en la figura



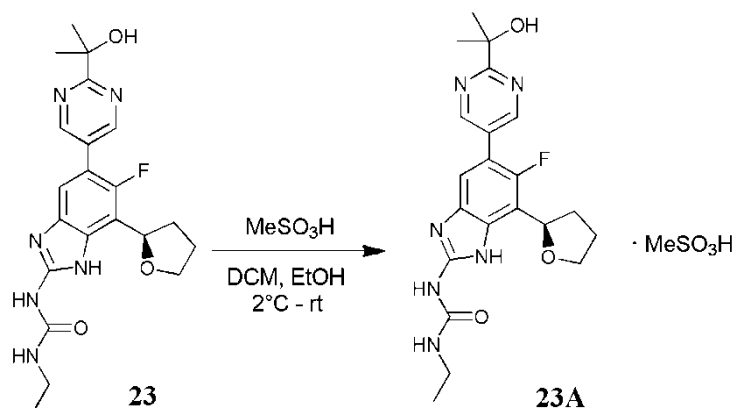
2, hay dos moléculas de simetría independiente en la estructura y ambas moléculas de simetría independiente son isómeros *R*.

Los datos se obtuvieron, se refinaron y se redujeron usando el software Apex II. La estructura se resolvió usando el o los programas *SHELXS97* (Sheldrick, 1990); y la estructura se refinó usando el programa *SHELXL97* (Sheldrick, 1997). Los cristales muestran una celda monoclinica con grupo espacial  $P2_1$ . Los parámetros de la red son  $a = 9.9016(2)$  Å,  $b = 10.9184(2)$  Å,  $c = 19.2975(4)$  Å,  $\beta = 102.966(1)^\circ$ . Volumen =  $2034.19(7)$  Å<sup>3</sup>.

#### Ejemplo 21

Preparación de la sal del ácido metanosulfónico de 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahydrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (23A).

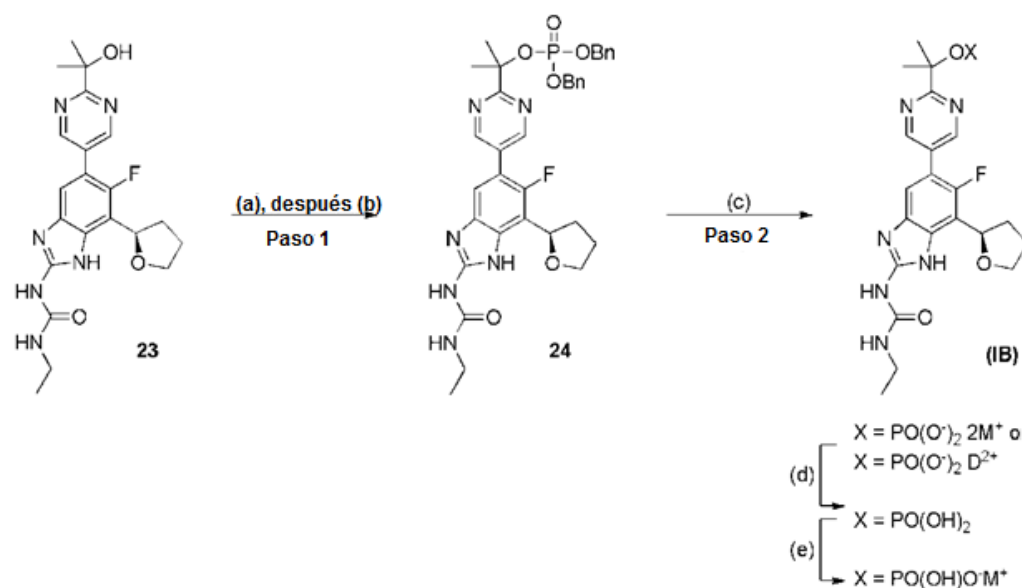
10



A una suspensión en agitación de 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahydrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (23) (15.05 g, 35.13 mmol) en diclorometano (60 mL, J.T. Baker 931533) y etanol absoluto (15 mL, Pharmco-AAPER 111000200) se le agregó ácido metanosulfónico (2.392 mL, 36.89 mmol, Sigma-Aldrich 471356). Se agitó a temperatura ambiente hasta que se observó una solución transparente. Se agregó heptano (300 mL) lentamente en aproximadamente 1 h y se recogió el precipitado sólido por filtración (usando un papel Whatman cualitativo N° 3 sobre un papel de microfibras de vidrio Whatman GF/F). Se secó a presión reducida en una estufa de vacío (se desecó con sulfato de calcio e hidróxido de potasio) toda la noche a 40 °C para dar 23A como un sólido blanco (13.46 g, pureza por HPLC 99+%, 99+ de ee). La HPLC analítica quiral mostró un enantiómero con tiempo de retención de 8.6 min que eluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/TEA (60/40/0.1) en una columna CHIRALPAK® IC® 4.6 x 250 mm con velocidad de flujo de 1 mL/min a 30 °C. Se obtuvo una segunda cosecha de producto sólido blanco 23A (4.36 g, pureza por HPLC 98%, 99+ de ee) del filtrado. LCMS (columna C18 eluyendo con gradiente de CH<sub>3</sub>CN/agua 10-90% en 5 minutos con modificador de ácido fórmico) M+1: 429.58 (2.03 min). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, MeOD) δ 9.00 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 5.39 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 14.9, 6.9 Hz, 1H), 4.03 (dd, J = 14.8, 7.7 Hz, 1H), 3.40 - 3.31 (m, 2H), 2.72 (s, 3H), 2.70 - 2.60 (m, 1H), 2.21 - 2.08 (m, 2H), 1.98-1.84 (m, 1H), 1.65 (s, 6H), 1.22 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm.

La (R)-1-etil-3-(6-fluoro-5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahydrofuran-2-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-il)urea 23 se puede convertir después en los profármacos de fosfato o sal de fosfato según los esquemas indicados a continuación.

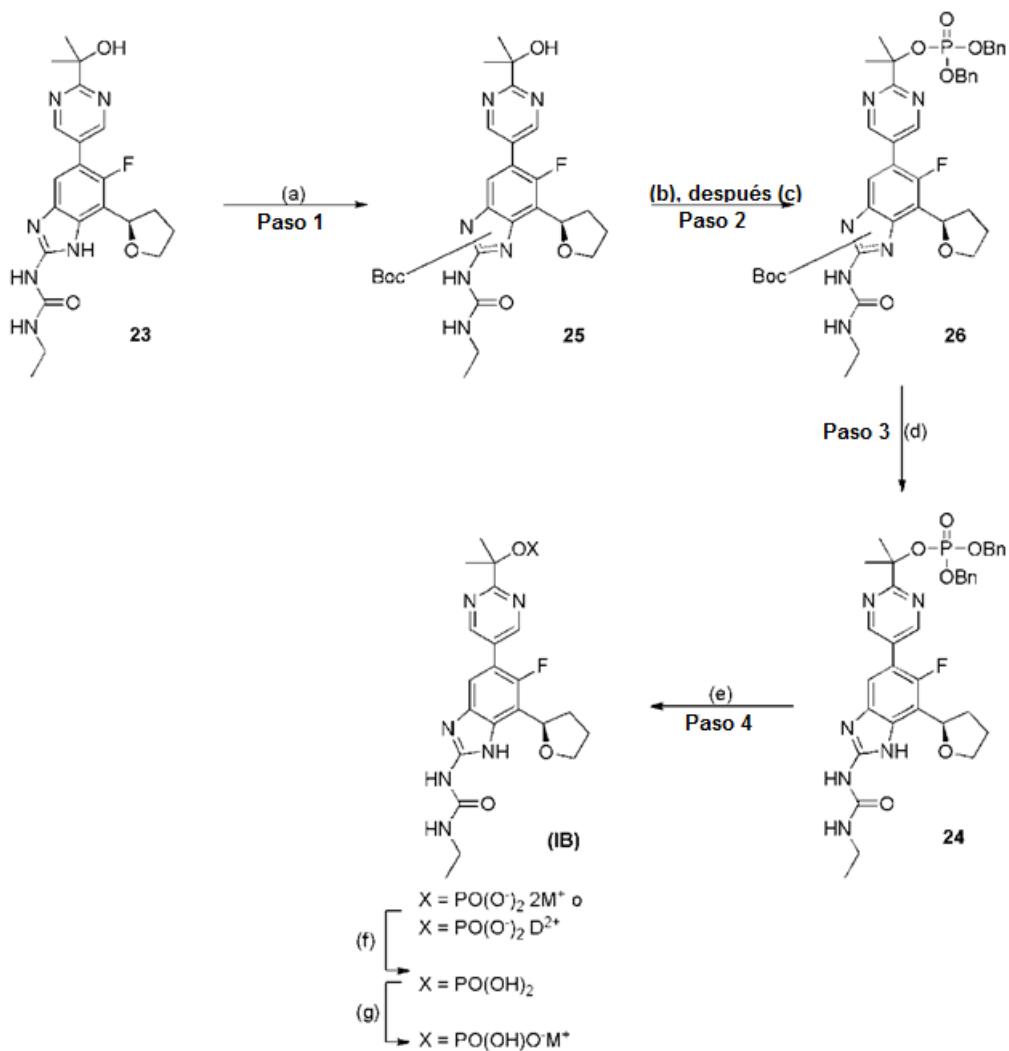
Esquema 1



Reactivos y condiciones: (a) dibencil N,N-diisopropilfosforamidita, tetrazol, 23 °C, DMF; (b) mCPBA, 0-23 °C, DMF; (c) H<sub>2</sub>, Pd/C, M<sup>+</sup>OH<sup>-</sup> o D<sup>2+</sup>(OH)<sup>-</sup><sub>2</sub>, EtOH, H<sub>2</sub>O; (d) H<sup>+</sup> aq; (e) M<sup>+</sup>OH<sup>-</sup> aq

- 5 Los compuestos de fórmula (IB) se pueden preparar a partir del compuesto 23 como se muestra en el esquema 1. En el paso 1, el compuesto 23 se trata con dibencil N,N-diisopropilfosforamidita y tetrazol, seguido de ácido metacloroperoxibenzoico (mCPBA), para obtener fosfato de dibencilo 24. En el paso 2, la hidrogenólisis de 24 en presencia de M<sup>+</sup>OH<sup>-</sup> o D<sup>2+</sup>(OH)<sup>-</sup><sub>2</sub> produce la forma dianiónica del compuesto de fórmula (IB) (X = -PO(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>•2M<sup>+</sup> o -PO(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>•D<sup>2+</sup>). La forma ácido libre del compuesto de fórmula (IB) (X = PO(OH)<sub>2</sub>) se puede obtener tratando la forma dianiónica con ácido acuoso. La forma monoaniónica del compuesto de fórmula (IB) (X = PO(OH)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>) se puede obtener tratando la forma ácido libre con un equivalente de M<sup>+</sup>OH<sup>-</sup>.
- 10

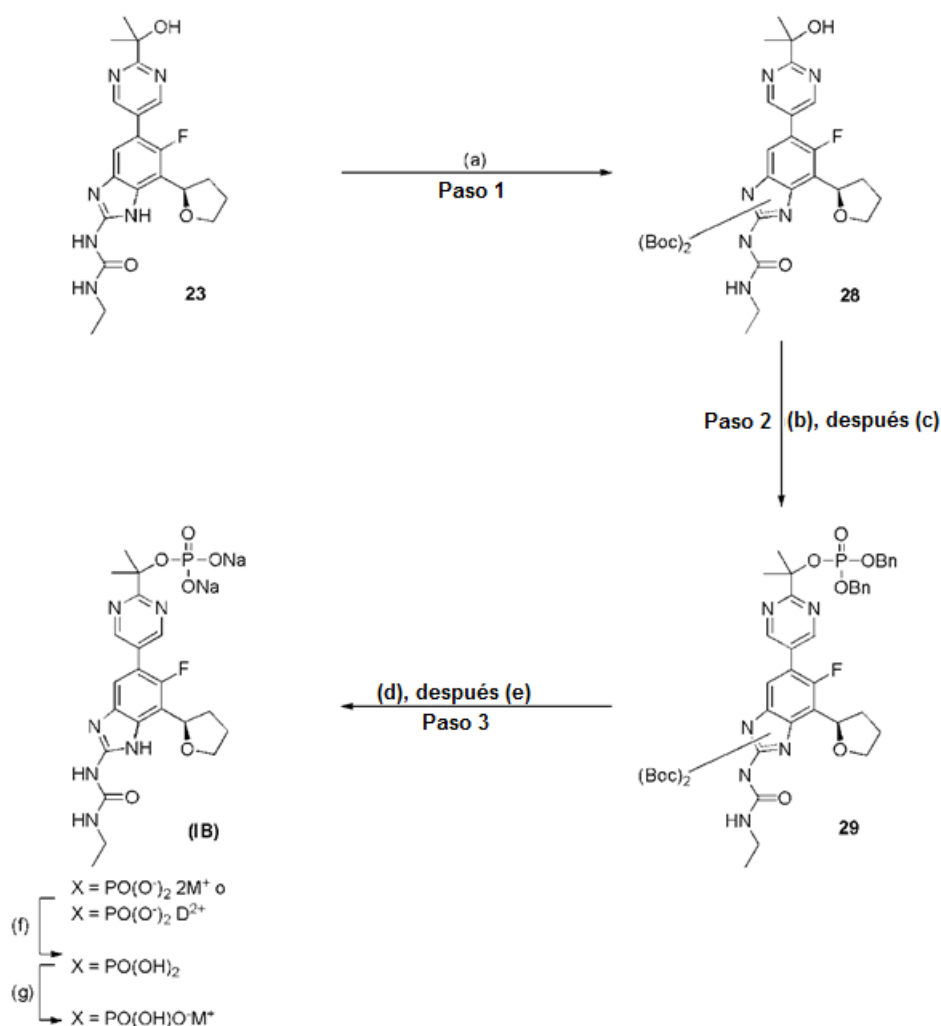
Esquema 2



Reactivos y condiciones : (a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , DMF, 23 °C; (b) dibencil N,N-diisopropilfosforamidita, tetrazol, 23 °C, DMF; (c) mCPBA, 0-23 °C, DMF; (d) TFA,  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, DCM, 23 °C; (e)  $\text{H}_2$ , Pd/C,  $\text{M}^+\text{OH}^-$  o  $\text{D}^{2+}(\text{OH})_2$ , EtOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ; (f)  $\text{H}^+$  aq; (g)  $\text{M}^+\text{OH}^-$  aq.

- 5 Alternativamente, los compuestos de fórmula (IB) se pueden preparar a partir del compuesto 23 como se muestra en el esquema 2. En el paso 1, el compuesto 23 se trata con dicarbonato de di-tert-butilo ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) para producir el compuesto de bencimidazol protegido 25. En el paso 2, el compuesto 25 se trata con dibencil N,N-diisopropilfosforamidita y tetrazol, seguido de mCPBA, para producir el fosfato de dibencilo protegido 26. En el paso 3, el compuesto 26 se trata con ácido trifluoroacético (TFA) para eliminar el grupo protector y producir fosfato de dibencilo 24. En el paso 4, la hidrogenólisis de 24 en presencia de  $\text{M}^+\text{OH}^-$  o  $\text{D}^{2+}(\text{OH})_2$  produce la forma dianiónica del compuesto de fórmula (IB) ( $X = -\text{PO}(\text{O}^-)_2 \cdot 2\text{M}^+$  o  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2 \cdot \text{D}^{2+}$ ). La forma ácido libre del compuesto de fórmula (IB) ( $X = \text{PO}(\text{OH})_2$ ) se puede obtener tratando la forma dianiónica con ácido acuoso. La forma monoaniónica del compuesto de fórmula (I) ( $X = \text{PO}(\text{OH})\text{O}^-\text{M}^+$ ) se puede obtener tratando la forma ácido libre con un equivalente de  $\text{M}^+\text{OH}^-$ .
- 10

Esquema 3

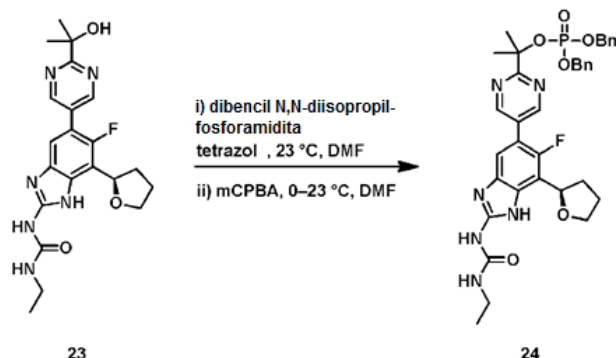


Reactivos y condiciones : (a) Boc<sub>2</sub>O DMAP, DMF, 23 °C; (b) dibencil N,N-diisopropilfosforamidita, tetrazol, 23 °C, DMF; (c) mCPBA, 0-23 °C, DMF; (d) TFA, DCM; (e) M<sup>+</sup>OH<sup>-</sup> aq o D<sup>2+</sup>(OH<sup>-</sup>)<sub>2</sub>, (f) H<sup>+</sup> aq; (g) M<sup>+</sup>OH<sup>-</sup> aq.

Los compuestos de fórmula (IB) también se pueden preparar a partir del compuesto 23 como se muestra en el esquema 3. En el paso 1, el compuesto 23 se trata con 2 equivalentes de Boc<sub>2</sub>O en presencia de N,N-dimetilamino piridina (DMAP) para producir el compuesto bis-protegido 28. En el paso 2, el compuesto 28 se trata con dibencil N,N-diisopropilfosforamidita y tetrazol, seguido de mCPBA, para producir el fosfato de dibencilo bis-protegido 29. En el paso 3, el compuesto 29 se trata con TFA para eliminar los grupos protectores. El tratamiento con el producto intermedio resultante con M<sup>+</sup>OH<sup>-</sup> o D<sup>2+</sup>(OH<sup>-</sup>)<sub>2</sub> acuoso produce la forma dianiónica del compuesto de fórmula (IB) (X = -PO(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>•2M<sup>+</sup> o -PO(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>•D<sup>2+</sup>). La forma ácido libre del compuesto de fórmula (IB) (X = PO(OH)<sub>2</sub>) se puede obtener tratando la forma dianiónica con ácido acuoso. La forma monoaniónica del compuesto de fórmula (I) (X = PO(OH)O<sup>-</sup>•M<sup>+</sup>) se puede obtener tratando la forma ácido libre con un equivalente de M<sup>+</sup>OH<sup>-</sup>.

## Ejemplo 22

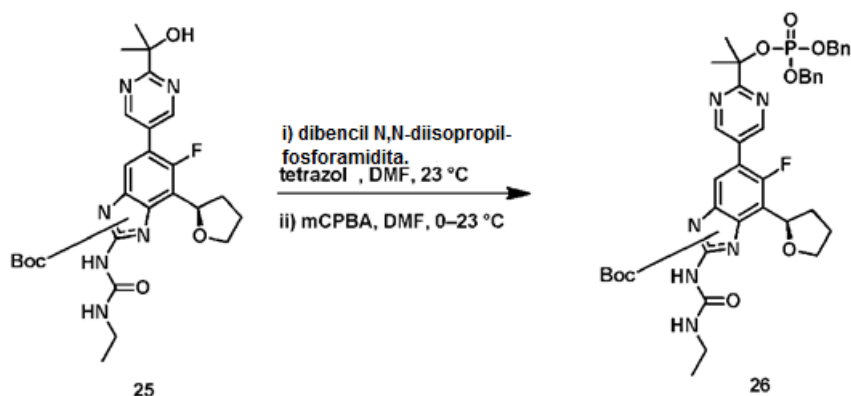
Preparación de (R)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato de dibencilo (24).



A 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahidrofuran-2-il]-1*H*-benzimidazol-2-il]urea (23) (10.24 g, 23.66 mmol) en un balón de 1 L en atmósfera de N<sub>2</sub> a 23 °C se le agregó DMF (200 mL) seguido de una solución de tetrazol (105.2 mL de 0.45 M en MeCN, 47.32 mmol) seguido de N-dibenciloxifosfanil-N-isopropilpropan-2-amina (12.26 g, 11.93 mL, 35.49 mmol). Después de 4.5 h se agregó más N-dibenciloxifosfanil-N-isopropilpropan-2-amina (4 mL). Después de agitar otras 16 h la reacción se enfrió hasta 0 °C (baño de agua-hielo) y después se trató con mCPBA (15.17 g, 61.52 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min después a 23 °C durante 30 min, luego de lo cual la mezcla de reacción se particionó entre agua (400 mL) y EtOAc (700 mL). Se separó la capa orgánica, se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (500 mL), bisulfito de sodio acuoso al 10% (500 mL), bicarbonato de sodio acuoso saturado (500 mL) y solución saturada de cloruro de sodio (500 mL), después se secó (sulfato de magnesio), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por MPLC usando un sistema de purificación de cromatografía por desorción súbita ISCO marca COMBIFLASH (columna de 330 g) eluyendo con un gradiente lineal de 0-10% de EtOH en DCM en 16.5 volúmenes de columna a una velocidad de flujo de 200 mL/min. Después de la concentración al vacío, se obtuvo (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato de dibencilo (24) (13.89 g, 20.17 mmol, 85.27%) como un sólido blanco. ESMS (M + 1) = 689.5; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.88 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 6 Hz, 1H), 7.30 (m, 10H), 5.38 - 5.33 (m, 1H), 5.12 - 5.01 (m, 4H), 4.24 (dd, J = 6.8, 14.9 Hz, 1H), 3.98 (dd, J = 6.9, 15.1 Hz, 1H), 3.35 - 3.27 (m, 3H), 2.52 (c, J = 5.9 Hz, 1H), 2.14 - 2.05 (m, 2H), 1.91 (s, 6H) y 1.22 - 1.14 (m, 3H) ppm.

## Ejemplo 23

20 Preparación de (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato disódico (W).

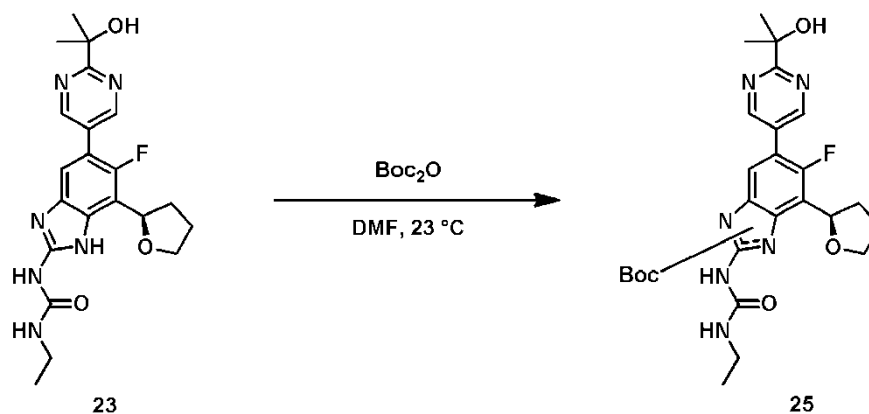


Se cargó un recipiente Parr de 1 L con agua (200 mL), Pd/C (4 g, 10% en peso en base seca, húmedo, tipo Degussa), (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato de dibencilo (24) (13.89 g, 20.17 mmol), EtOH (400 mL) y NaOH acuoso 1 M (40.34 mL, 40.34 mmol). La mezcla resultante se hidrogenó en atmósfera de H<sub>2</sub> a 50 psi en un agitador Parr durante 40 min. La mezcla de reacción se filtró a través de una membrana de poliétersulfona (PES) de 0.22 μm para dar un filtrado de color oscuro. Un enjuague con agua resultó en material más oscuro atravesando la membrana de filtración. El filtrado resultante se pasó a través de una almohadilla de Celite y el material oscuro no eluyó hasta que la almohadilla se enjuagó con agua. La solución oscura resultante (aprox. 700 mL) se diluyó con tres volúmenes de EtOH (2100 mL), se filtró a través de una membrana PES de 0.22 μm (usando 4 sistemas de filtro de poliestireno Corning desechables, N° 431098) y el filtrado se concentró al vacío. El residuo resultante se disolvió en agua (100 mL) y EtOH (300 mL), se filtró a través de la membrana PES de 0.22 μm para dar una solución amarillo transparente, después se pasó a través de un taco de Celite (26 mm diámetro x 60 mm de altura, humedecido previamente con

EtOH) se enjuagó con EtOH (50 mL) y después el filtrado se concentró. El residuo resultante se disolvió en agua (250 mL) en un balón de 1 L, después se agregó lentamente HCl acuoso 1 M (40 mL) en 15 min con agitación para dar una lechada de sólido blanco. Veinte minutos después de completarse la adición de HCl, el sólido se recogió por filtración a través de la membrana PES de 0.22  $\mu\text{m}$ . El sólido recogido se lavó con agua (100 mL), después se transfirió (aún húmedo) a un balón de 1 L y se suspendió en MeOH (150 mL) durante 30 min. El precipitado blanco fino resultante se recogió por filtración y después se secó al vacío toda la noche. El ácido libre resultante (9.17 g, 18.0 mmol) se trató con agua (80 mL) y después con NaOH aq 1.0 N (36.0 mL, 2 equiv). La solución resultante se congeló y se liofilizó para dar [1-[5-[2-(etilcarbamoylamino)-6-fluoro-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-5-il]pirimidin-2-il]-1-metil-etil] fosfato disódico (W) (10.206 g, 18.08 mmol, 89.66%) como un sólido color crema pálido con datos analíticos compatibles. ESMS ( $M + 1$ ) = 509.4;  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.58 (s, 2H), 6.92 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 5.13 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.98 - 3.81 (m, 2H), 3.04 (c,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.26 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 1.97 - 1.92 (m, 2H), 1.67 (s, 6H) y 1.01 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H) ppm.

## Ejemplo 24

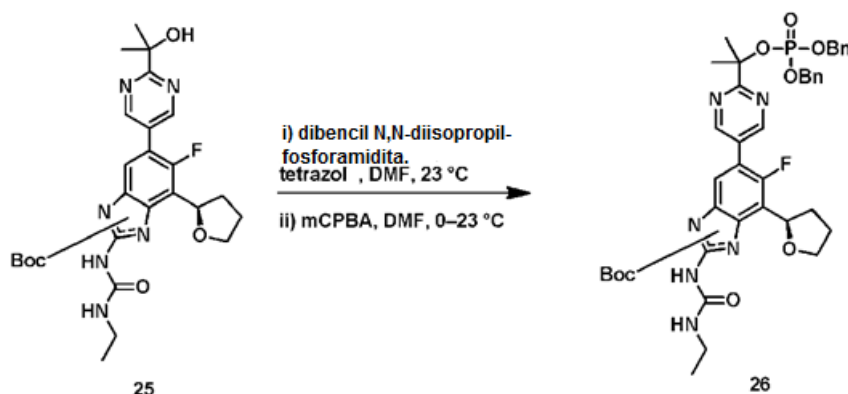
Preparación de Boc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (25).



A una solución/suspensión de 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (23) (10.72 g, 25.02 mmol) en DMF (250 mL) a  $23^\circ\text{C}$  se le agregó  $\text{Boc}_2\text{O}$  (6.11 g, 28.00 mmol). Después de 2 horas, se le agregó amoníaco 2 M en MeOH (2 mL) para detener cualquier exceso de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . La mezcla de reacción detenida se particionó entre EtOAc y agua (400 mL de cada uno), se separó la capa orgánica, se lavó con agua (2 x 400 mL) y solución saturada de cloruro de sodio (400 mL), después se secó en  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se concentró para dar Boc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (25) (12.69 g, 23.58 mmol, 94.26%) que se usó sin purificación posterior. ESMS ( $M + 1$ ) = 529.3;  $^1\text{H}$  RMN (300.0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.50 (s, 1H), 9.02 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 8.91 (d,  $J = 1.6$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 5.58 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.64 (s, 1H), 4.22 (c,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.05 (td,  $J = 7.8, 4.3$  Hz, 1H), 3.47 (td,  $J = 7.2, 4.3$  Hz, 2H), 2.42 - 2.35 (m, 2H), 2.28 - 2.16 (m, 2H), 1.75 (s, 9H), 1.68 (s, 6H) y 1.31 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H) ppm.

## Ejemplo 25

Preparación de fosfato de dibencil Boc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (26).

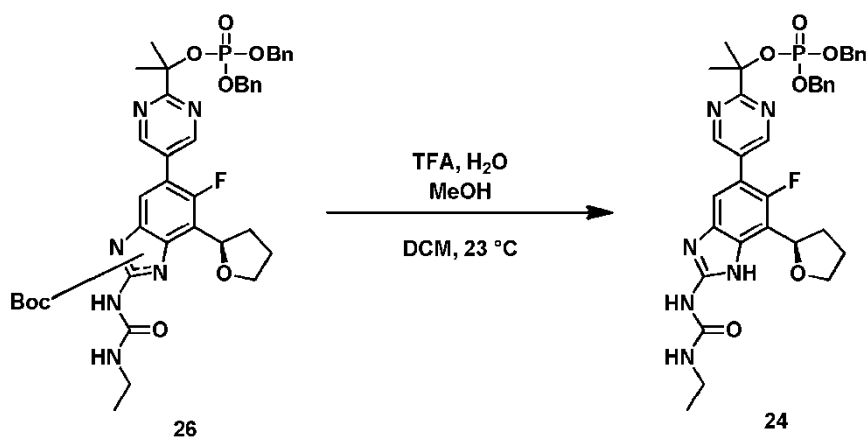


5 A Boc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahidrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (25) (12.69 g, 23.58 mmol) y tetrazol (3.304 g, 47.16 mmol) en atmósfera de N<sub>2</sub> a 23 °C se le agregó DCM (240 mL) seguido de *N*-dibenciloxifosfanil-*N*-isopropil-propan-2-amina (9.775 g, 9.509 mL, 28.30 mmol). Después de 3 horas a  
 10 23 °C, la reacción se enfrió hasta 0 °C y después se le agregó mCPBA (6.977 g, 28.30 mmol). La solución resultante se agitó durante 45 min a 0 °C, después durante 20 min a 23 °C. Luego la mezcla de reacción se particionó entre DCM (50 mL) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (400 mL). Se separó la capa orgánica, después se lavó sucesivamente con bisulfito de sodio acuoso (63 g en 350 mL de agua) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (400 mL), después se secó en sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por MPLC usando sistema de purificación de cromatografía por desorción súbita ISCO marca COMBIFLASH (columna de sílice de 330 g) eluyendo con un gradiente lineal de 0-100% de EtOAc en hexanos en 16 volúmenes de columna a 200 mL/min. Las fracciones que contenían producto se evaporaron al vacío para dar fosfato de dibencil Boc-1-etil-3-[6-  
 15 fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahidrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (26) (11.92 g, 15.11 mmol, 64.09%). ESMS (M + 1) = 789.2; <sup>1</sup>H RMN (300.0 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.51 (s, 1H), 9.03 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 8.91 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 7.73 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.37 - 7.28 (m, 10H), 5.58 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.17 - 5.05 (m, 4H), 4.23 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 4.05 (td, J = 7.8, 4.3 Hz, 1H), 3.53 - 3.44 (m, 2H), 2.39 (dd, J = 7.9, 14.5 Hz, 2H), 2.28 - 2.15 (m, 2H), 1.98 (s, 6H), 1.72 (m, 9H) y 1.31 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm.

## Ejemplo 26

Preparación de (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato de dibencilo (24).

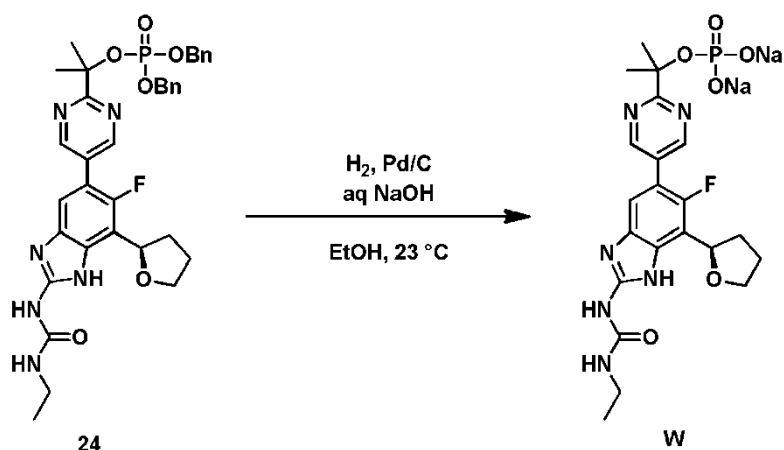
20



25 A una solución de fosfato de dibencil Boc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahidrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (26) (11.9 g, 15.09 mmol) en DCM (300 mL) a 23 °C se le agregó agua (2.325 mL, 129.1 mmol) y después TFA (3.441 g, 2.325 mL, 30.18 mmol). Luego de 1 h, sólo se observó conversión parcial por tlc, por consiguiente se agregó más TFA (3.441 g, 2.325 mL, 30.18 mmol). Luego de otras 2.5 h, se agregó MeOH (2 mL) y la mezcla se agitó otras 18 horas. La mezcla de reacción se lavó con solución saturada de cloruro de sodio:bicarbonato de sodio acuoso saturado 1:1 (200 mL). La capa acuosa se volvió a extraer con DCM (150 mL), las capas orgánicas se combinaron, después se secaron (en sulfato de magnesio), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo resultante se volvió a disolver en EtOAc (200 mL) se lavó con agua (150 mL) y  
 30 solución saturada de cloruro de sodio (100 mL), después se secó (sulfato de magnesio) se filtró y se concentró para dar (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato de dibencilo (24) (10.21 g, 14.83 mmol, 98.27%) como un sólido blanco. ESMS (M + 1) = 689.4; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.88 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 6 Hz, 1H), 7.30 (m, 10H), 5.38 - 5.33 (m, 1H), 5.12 - 5.01 (m, 4H), 4.24 (dd, J = 6.8, 14.9 Hz, 1H), 3.98 (dd, J = 6.9, 15.1 Hz, 1H), 3.35 - 3.27 (m, 3H), 2.52 (c, J = 5.9 Hz, 1H), 2.14 - 2.05 (m, 2H), 1.91 (s, 6H) y 1.22 - 1.14 (m, 3H) ppm.  
 35

## Ejemplo 27

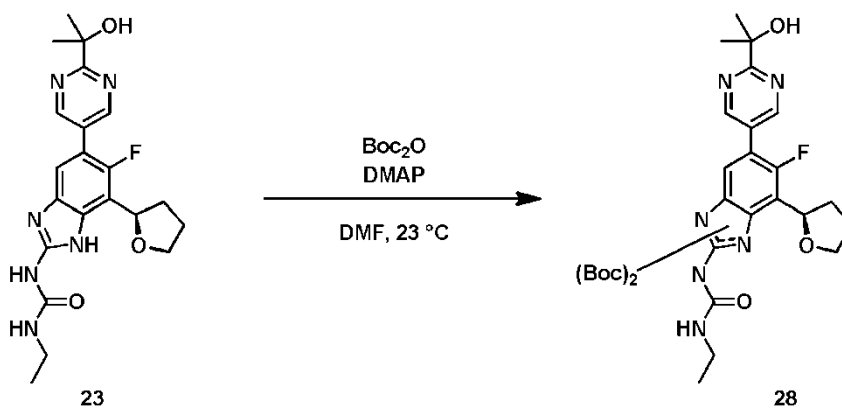
Preparación de (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato disódico (W).



Se cargó un balón de 1 L con (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahydrofuran-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato de dibencilo (24) (9.37 g, 13.61 mmol), EtOH (300 mL), agua (150 mL), Pd/C (10% en peso en base seca, húmedo, tipo Degussa, 3 g) y NaOH acuoso 1 M (27.22 mL, 27.22 mmol). La suspensión se evacuó durante 3 minutos (aguja a bomba) después se colocó bajo una atmósfera de gas de hidrógeno (balón). Luego de agitar 2.5 h a 23 °C, la reacción se filtró a través de una membrana PES de 0.22 μm (sistema de filtración Corning desechable, 1 L, poliestireno, N° 431098) para eliminar el catalizador y se lavó con EtOH (50 mL). La solución resultante se concentró, el residuo se disolvió en agua (80 mL), se trató con MeCN (80 mL), después se congeló y se liofilizó para dar (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahydrofuran-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato disódico (W) (7.10 g, 12.81 mmol, 94.12%) como un sólido blanco. ESMS (*M* + 1) = 509.3; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.58 (s, 2H), 6.92 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.98 - 3.81 (m, 2H), 3.04 (c, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.26 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 1.97 - 1.92 (m, 2H), 1.67 (s, 6H) y 1.01 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H) ppm.

## Ejemplo 28

Preparación de diBoc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahydrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (28).

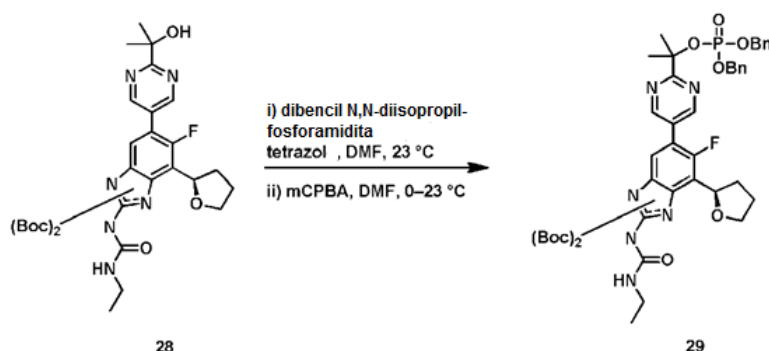


A una solución/suspensión de 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahydrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (23) (1.333 g, 3.111 mmol) en DMF (30 mL) se le agregó DMAP (38.01 mg, 0.3111 mmol) seguido de Boc<sub>2</sub>O (1.426 g, 1.501 mL, 6.533 mmol). Después de 30 min, la mezcla de reacción se diluyó con agua y EtOAc (300 mL de cada uno), se separó la capa orgánica, se lavó con agua y solución saturada de cloruro de sodio (300 mL de cada una), después se secó en sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por MPLC usando un sistema de purificación de cromatografía por desorción súbita ISCO marca COMBIFLASH (columna de sílice de 80 g) eluyendo con un gradiente lineal de 0-60% de EtOAc en hexanos en 20 volúmenes de columna a una velocidad de flujo de 60 mL/min. Las fracciones de producto deseadas se combinaron y evaporaron para dar diBoc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahydrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (28) (1.43 g, 2.275 mmol, 73.11%) como una espuma transparente. ESMS (*M* + 1) = 629.3; <sup>1</sup>H RMN (300.0 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.95 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 8.31 - 8.27 (m, 1H), 8.05 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 5.80 - 5.68 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.21 - 4.09 (m, 1H), 3.98 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.42 - 3.37 (m, 2H), 2.45 - 2.00 (m, 4H), 1.65 (s, 6H), 1.62 (s, 9H), 1.37 (s, 9H) y 1.28 - 1.21 (m, 3H) ppm.

## Ejemplo 29



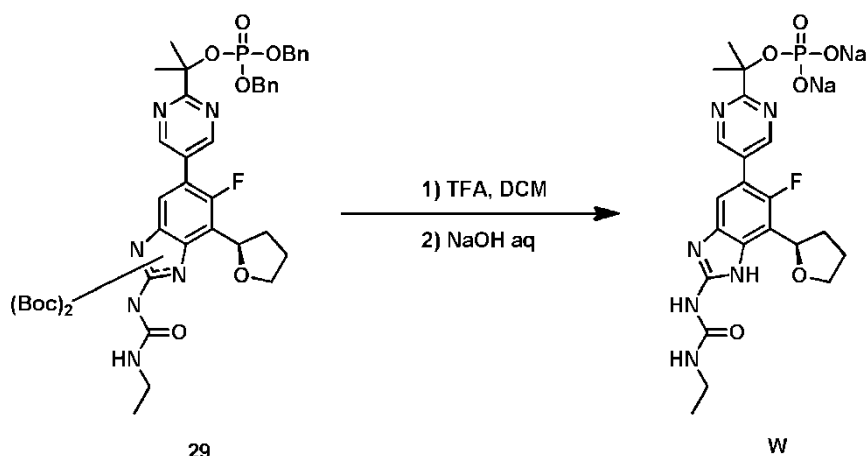
Preparación de fosfato de dibencil diBoc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahidrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (29).



A diBoc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahidrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (28) (1.13 g, 1.797 mmol) y tetrazol (251.8 mg, 3.594 mmol) a 23 °C en atmósfera de N<sub>2</sub> se le agregó DCM (30 mL) seguido de N-dibenciloxifosfanil-N-isopropil-propan-2-amina (744.7 mg, 724.4 µL, 2.156 mmol). Después de agitar durante 18 h, la reacción se enfrió hasta 0 °C después se trató con mCPBA (531.5 mg, 2.156 mmol). La reacción se agitó durante 15 min a 0 °C, después durante 30 min a 23 °C. Luego la solución resultante se particionó entre EtOAc y bicarbonato de sodio acuoso saturado (300 mL de cada uno), la capa orgánica se separó, después se lavó con bisulfito de sodio acuoso al 10%, bicarbonato de sodio acuoso saturado y solución saturada de cloruro de sodio (300 mL de cada uno), después se secó en sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por MPLC usando un sistema de purificación de cromatografía por desorción súbita ISCO marca COMBIFLASH (columna de sílice de 80 g) eluyendo con un gradiente lineal de 0-80% de EtOAc en hexanos en 20 volúmenes de columna a una velocidad de flujo de 60 mL/min. Las fracciones de producto deseadas se combinaron y evaporaron para dar fosfato de dibencil diBoc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahidrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (29) (1.03 g, 1.159 mmol, 64.50%) como un aceite cristalino transparente. ESMS (M + 1) = 889.5; <sup>1</sup>H RMN (300.0 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.93 (d, J = 1.5 Hz, 2H), 8.31 (s, 1H), 8.04 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.36 - 7.26 (m, 10H), 5.83 - 5.70 (m, 1H), 5.16 - 5.05 (m, 4H), 4.24 - 4.18 (m, 1H), 4.03 - 3.97 (m, 1H), 3.42 - 3.36 (m, 2H), 2.43 - 2.05 (m, 4H), 1.98 (s, 6H), 1.64 (s, 9H), 1.40 (s, 9H) y 1.26 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm.

### Ejemplo 30

Preparación de (*R*)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato de sodio (W).



A una solución de fosfato de dibencil diBoc-1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2*R*)-tetrahidrofuran-2-il]-1*H*-bencimidazol-2-il]urea (29) (121 mg, 0.1361 mmol) en DCM (10 mL) a 23 °C se le agregó TFA (5 mL). Después de 2 h, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se disolvió en MeOH (6 mL) y se trató con aprox 0.5 mL de NH<sub>3</sub> 2 M en MeOH (para disolver completamente el material). La solución resultante se purificó en 6 inyecciones de HPLC preparativa, en fase reversa, columna Sunfire prep C18 OBD de 5 µm 19 × 100 mm; eluyendo con un gradiente lineal de 10-90% de MeCN aq/0.1% de tampón de TFA en 15 min, a una velocidad de flujo de 20 mL/min. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron. El material resultante se suspendió en MeOH (3 mL), se agitó a 23 °C durante 30 min y luego el precipitado se recogió por filtración a través de una frita de plástico. El sólido blanco resultante se volvió a someter a una lechada de MeOH (3

mL), después se recogió por filtración para dar 68 mg de sólido blanco después de secar. El sólido blanco se trató con NaOH aq 0.10 M (2.68 mL, 2 equiv de NaOH) para dar una solución que después se pasó a través de un filtro de jeringa Acrodisc CR de 13 mm con una membrana de PTFE de 0.45 µm, enjuagando con agua (2 mL). La solución resultante se trató con MeCN (3 mL), se congeló y se liofilizó para dar (R)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato de sodio (W) como un polvo blanco. ESMS (M + 1) = 509.2; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.58 (s, 2H), 6.92 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 5.13 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 3.98 - 3.81 (m, 2H), 3.04 (c, J = 7.2 Hz, 2H), 2.26 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 1.97 - 1.92 (m, 2H), 1.67 (s, 6H) y 1.01 (t, J = 7.2 Hz, 3H) ppm.

## Ejemplo 31

## 10 Prueba de sensibilidad en medio líquido

Se probó la actividad antimicrobiana de los compuestos de esta invención mediante prueba de sensibilidad en medio líquido. Dichos ensayos se realizaron según los lineamientos del último documento CLSI que regula dichas prácticas: "M07-A8 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-Octava Edición (2009)". Otras publicaciones como "Antibiotics in Laboratory Medicine" (editado por V. Lorian, Publishers Williams y Wilkins, 1996) proporcionaron técnicas prácticas esenciales de la prueba de antibiograma en el laboratorio. Los protocolos específicos utilizados fueron los siguientes:

15 Protocolo N° 1: Determinación de MIC de la girasa de los compuestos, utilizando el método de microdilución en caldo

## Materiales:

## 20 Placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (Costar 3788)

Placas de agar Mueller Hinton II (MHII; BBL premix)

Caldo líquido Mueller Hinton II (MHII; BBL premix)

Sistema de inoculación BBL Prompt (Fisher B26306)

Espejo de lectura (Fisher)

## 25 Placas de agar con bacterias estriadas hasta colonias individuales, recién preparadas

DMSO estéril

Suero humano (U.S. Biologicals S1010-51)

Sangre de caballo lacada (Quad Five 270-100)

Resazurina al 0.01%

## 30 Suero de rata Sprague Dawley (U.S. Biologicals 1011-90B o Valley BioMedical AS3061SD)

Suero de ratones combinado (Valley BioMedical AS3054)

Cepas (medios, caldo y agar):

1. *Staphylococcus aureus* ATCC N° 29213

a. MHII

## 35 b. MHII + 50% de suero humano

c. MHII + 50% de suero de rata

d. MHII + 50% de suero de ratón

2. *Staphylococcus aureus* ATCC N° 29213 GyrB T173I (MHII)3. *Staphylococcus aureus*, cepas de la colección JMI; véase la tabla 5 (MHII)40 4. *Staphylococcus epidermidis*, cepas de la colección JMI; véase la tabla 5 (MHII)5. *Enterococcus faecalis* ATCC N° 29212 (MHII + 3% de sangre de caballo lacada)6. *Enterococcus faecium* ATCC N° 49624 (MHII + 3% de sangre de caballo lacada)

## ES 2 545 516 T3

7. *Enterococcus faecalis*, cepas de la colección JMI; véase la tabla 5 (MHII + 3% de sangre de caballo lacada)
8. *Enterococcus faecium*, cepas de la colección JMI; véase la tabla 5 (MHII + 3% de sangre de caballo lacada)
9. *Streptococcus pneumoniae* ATCC N° 10015 (MHII + 3% de sangre de caballo lacada)
- 5 10. *Streptococcus pneumoniae*, cepas de la colección JMI; véase la tabla 5 (MHII + 3% de sangre de caballo lacada)
11. Estreptococos  $\beta$ -hemolíticos, grupos A, B, C, G) cepas de la colección JMI; véase la tabla 5 (MHII + 3% de sangre de caballo lacada)
12. *Bacillus cereus* ATCC 10987 (MHII)
13. *Bacillus cereus* ATCC 14579 (MHII)
- 10 14. *Bacillus subtilis* ATCC 6638 (MHII)
15. *Bacillus subtilis* (168) ATCC 6051 (MHII)

Preparación del inóculo (para todas las cepas excepto *S. aureus* + 50% de sueros):

- 15 1. Empleando el kit BBL Prompt, se picaron 5 colonias grandes o 10 pequeñas, bien separadas del cultivo crecido en el medio de agar adecuado según se indicó antes y se inocularon en 1 mL de solución salina estéril provista en el kit.
2. Los pocillos se agitaron en vórtex durante ~ 30 s para proporcionar una suspensión de  $\sim 10^8$  células/mL. La densidad real se pudo confirmar sembrando en placas las diluciones de esta suspensión.
- 20 3. Se diluyó la suspensión 1/100 transfiriendo 0.15 mL de células a 15 mL ( $\sim 10^6$  células/mL) de caldo estéril (o véase más adelante) para cada placa de los compuestos analizados, y después se mezcló por rotación. Cuando se analizó más de 1 placa de los compuestos (> 8 compuestos), los volúmenes se incrementaron concordantemente.
  - a. Para *E. faecalis*, *E. faecium* y *S. pneumoniae*: Se usaron 14.1 mL de MHII + 0.9 mL de sangre de caballo lacada.
- 25 4. Se usaron 50  $\mu$ L de células ( $\sim 5 \times 10^4$  células) para inocular cada pocillo de microtitulación que contenía 50  $\mu$ L del fármaco diluido en caldo (véase más adelante).

Diluciones del fármaco, inoculación, determinación de MIC:

1. Todas las soluciones madre de fármaco/compuesto se prepararon a una concentración de 12.8 mg/mL, usualmente en 100% de DMSO.
- 30 2. Las soluciones madre de fármaco/compuesto se diluyeron a 200x la concentración final deseada en 50  $\mu$ L de DMSO. Si la concentración de partida de las MIC era de 8  $\mu$ g/mL de concentración final, entonces se necesitaban 6.25  $\mu$ L de solución madre + 43.75  $\mu$ L de DMSO. Cada solución madre 200x se colocó en una fila separada de la columna 1 de una nueva placa de microtitulación de 96 pocillos.
- 35 3. Se agregaron 25  $\mu$ L de DMSO a las columnas 2 -12 de todas las filas de la placa de microtitulación que contenían soluciones madre 200x de los compuestos y se diluyeron en serie 25  $\mu$ L desde la columna 1 hasta la columna 11, se cambiaron los tips después de cada columna, es decir 25  $\mu$ L de compuesto + 25  $\mu$ L de DMSO = dilución 2x. Se dejó un pocillo con DMSO "sin compuesto" al final de cada serie para control.
4. Para cada cepa analizada (excepto *S. aureus* + 50% de suero humano), se prepararon dos placas de microtitulación con 50  $\mu$ L de caldo MHII usando un pipeteador Matrix.
- 40 5. Se transfirieron 0.5  $\mu$ L de cada dilución (mediante el pipeteador automático Matrix) a 50  $\mu$ L de medio/pocillo de microtitulación antes de la adición de 50  $\mu$ L de células. La concentración de partida habitual del compuesto fue de 8  $\mu$ g/mL luego de la dilución 1/200 en medio + células - las concentraciones del compuesto disminuyeron en pasos de 2x a lo largo de las filas de la placa de microtitulación. Todas las MIC se hicieron por duplicado.
6. Todos los pocillos se inocularon con 50  $\mu$ L de suspensión de células diluida (véase antes) hasta un volumen final de 100  $\mu$ L.
- 45 7. Después que se agregó el inóculo, se mezcló bien cada pocillo con un pipeteador multicanal manual; se usaron los mismos tips yendo de la concentración más baja a la más alta del fármaco en la misma placa de microtitulación.

## ES 2 545 516 T3

8. Las placas se incubaron a 37 °C durante al menos 18 horas.

9. Las placas se observaron con el espejo de lectura después de 18 horas y se registró la MIC como la menor concentración de fármaco en la que no se observó crecimiento (transparencia óptica en el pocillo).

5 Preparación de *S. aureus* + 50% de suero humano, *S. aureus* + 50% de suero de rata o *S. aureus* + 50% de suero de ratón.

1. Se prepararon medios con 50% de suero combinando 15 mL de MHII + 15 mL de suero humano - total 30 mL. Se aumentó el volumen en incrementos de 30 mL cuando se analizó más de 1 placa de compuesto.

10 2. Se usó el mismo inóculo BBL Prompt de *S. aureus* ATCC N° 29213 descrito antes, se diluyó 1/200 transfiriendo 0.15 mL de células a 30 mL (~5 x 10<sup>5</sup> células/mL) del medio con 50% de suero humano preparado antes y se mezcló por rotación.

3. Se llenaron todos los pocillos de prueba del número deseado de placas de microtitulación con 100 µL de células en medio con 50% de suero.

15 4. Se transfirieron 0.5 µL de cada dilución del compuesto (mediante el pipeteador automático Matrix) a 100 µL de células/medios. La concentración de partida habitual del compuesto fue de 8 µg/mL luego de la dilución 1/200 en medio + células -las concentraciones del compuesto disminuyeron en pasos de 2x a lo largo de las filas de la placa de microtitulación. Todas las MIC se hicieron por duplicado.

5. Se mezcló bien cada pocillo con un pipeteador multicanal manual; se usaron los mismos tips yendo de la concentración más baja a la más alta del fármaco en la misma placa de microtitulación.

20 6. Las placas se incubaron a 37 °C durante al menos 18 horas. Después de la incubación, se agregaron 25 µL de resazurina al 0.01% a cada pocillo y se continuó la incubación a 37 °C durante al menos 1 hora más o hasta que cambió el color de la resazurina.

7. Las placas se observaron con un espejo de lectura y se registró la MIC. Cuando se usó resazurina, el color de la tintura cambió de un azul oscuro a un rosado brillante en los pocillos en los que no había crecimiento. La menor concentración de fármaco que tornó la tintura rosada fue la MIC.

25 Protocolo N° 2: Determinación de MIC de la girasa de los compuestos frente a bacterias gramnegativas, utilizando el método de microdilución en caldo

Materiales:

Placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (Costar 3788)

Placas de agar Mueller Hinton II (MHII; BBL premix)

30 Caldo líquido Mueller Hinton II (MHII; BBL premix)

Sistema de inoculación BBL Prompt (Fisher b26306)

Espejo de lectura (Fisher)

Placas de agar con bacterias estriadas hasta colonias individuales, recién preparadas

DMSO estéril

35 Cepas (medios MHII para todas; caldo y agar):

1. *Escherichia coli* ATCC N° 25922

2. *Escherichia coli*, cepas de la colección JMI, véase la tabla 5

3. *Escherichia coli* AG100 WT

4. *Escherichia coli* AG100 tolC

40 5. *Acinetobacter baumannii* ATCC N° BAA-1710

6. *Acinetobacter baumannii* ATCC N° 19606

7. *Acinetobacter baumannii*, cepas de la colección JMI, véase la tabla 5

8. *Klebsiella pneumoniae* ATCC N° BAA-1705

9. *Klebsiella pneumoniae* ATCC N° 700603
10. *Klebsiella pneumoniae*, cepas de la colección JMI, véase la tabla 5
11. *Moraxella catarrhalis* ATCC N° 25238
12. *Moraxella catarrhalis* ATCC N° 49143
- 5 13. *Moraxella catarrhalis*, cepas de la colección JMI, véase la tabla 5
14. *Haemophilus influenzae* ATCC 49247
15. *Haemophilus influenzae* (Rd1 KW20) ATCC 51907
16. *Haemophilus influenzae* Rd0894 (AcrA-)
17. *Haemophilus influenzae*, cepas de la colección JMI, véase la tabla 5
- 10 18. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
19. *Pseudomonas aeruginosa*, cepas de la colección JMI, véase la tabla 5
20. *Proteus mirabilis*, cepas de la colección JMI, véase la tabla 5
21. *Enterobacter cloacae*, cepas de la colección JMI, véase la tabla 5
22. *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC BAA-84
- 15 23. *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC13637

Preparación del inóculo:

1. Empleando el kit BBL Prompt, se picaron 5 colonias grandes o 10 pequeñas, bien separadas del cultivo crecido en el medio de agar y se inocularon en 1 mL de solución salina estéril provista en el kit.
- 20 2. Los pocillos se agitaron en vórtex durante ~ 30 s para dar una suspensión de  $\sim 10^8$  células/mL. La densidad real se pudo confirmar sembrando en placas las diluciones de esta suspensión.
3. Se diluyó la suspensión 1/100 transfiriendo 0.15 mL de células a 15 mL ( $\sim 10^6$  células/mL) de caldo estéril (véase más adelante) para cada placa de los compuestos analizados, y después se mezcló por rotación. Cuando se analizó más de 1 placa de los compuestos (> 8 compuestos), los volúmenes se incrementaron concordantemente.
- 25 4. Se usaron 50  $\mu$ L de células ( $\sim 5 \times 10^4$  células) para inocular cada pocillo de microtitulación que contenía 50  $\mu$ L del fármaco diluido en caldo (véase más adelante).

Diluciones del fármaco, inoculación, determinación de MIC:

1. Todas las soluciones madre de fármaco/compuesto se prepararon a una concentración de 12.8 mg/mL, usualmente en 100% de DMSO.
- 30 2. Las soluciones madre de fármaco/compuesto se diluyeron a 200x la concentración final deseada en 50  $\mu$ L de DMSO. Si la concentración de partida de las MIC era de 8  $\mu$ g/mL de concentración final, entonces se necesitaban 6.25  $\mu$ L de solución madre + 43.75  $\mu$ L de DMSO. Cada solución madre 200x se colocó en una fila separada de la columna 1 de una nueva placa de microtitulación de 96 pocillos.
- 35 3. Se agregaron 25  $\mu$ L de DMSO a las columnas 2 -12 de todas las filas de la placa de microtitulación que contenían soluciones madre 200x de los compuestos y se diluyeron en serie 25  $\mu$ L desde la columna 1 hasta la columna 11, se cambiaron los tips después de cada columna, es decir 25  $\mu$ L de compuesto + 25  $\mu$ L de DMSO = dilución 2x. Se dejó un pocillo con DMSO "sin compuesto" al final de cada serie para control.
4. Para cada cepa analizada, se prepararon dos placas con 50  $\mu$ L de caldo MHII usando un pipeteador Matrix.
- 40 5. Se transfirieron 0.5  $\mu$ L de cada dilución (mediante el pipeteador automático Matrix) a 50  $\mu$ L medio/pocillo de microtitulación antes de la adición de 50  $\mu$ L de células. La concentración de partida habitual del compuesto fue de 8  $\mu$ g/mL luego de la dilución 1/200 en medio + células -las concentraciones del compuesto disminuyeron en pasos de 2x a lo largo de las filas de la placa de microtitulación. Todas las MIC se hicieron por duplicado.
6. Todos los pocillos se inocularon con 50  $\mu$ L suspensión de células diluida (véase antes) hasta un volumen final de 100  $\mu$ L.

## ES 2 545 516 T3

7. Después que se agregó el inóculo, se mezcló bien cada pocillo con un pipeteador multicanal manual; se usaron los mismos tips yendo de la concentración más baja a la más alta del fármaco en la misma placa de microtitulación.

8. Las placas se incubaron a 37 °C durante al menos 18 horas.

- 5 9. Las placas se observaron con el espejo de lectura después de 18 horas y se registró la MIC como la menor concentración de fármaco a la que no se observó crecimiento (transparencia óptica en el pocillo).

Protocolo N° 3: Determinación de MIC de la girasa de los compuestos utilizando el método de dilución en agar

Placas de Petri de 60 x 15 mm (Thermo Scientific Cat. N° 12567100)

- 10 Tubos de centrifuga, 15 mL (Costar)

Sistema de inoculación BBL Prompt (Fisher b26306)

Placas de agar con bacterias estriadas hasta colonias individuales, recién preparadas

DMSO estéril

Recipientes de incubación GasPak™ (BD Cat. N° 260672)

- 15 Sachets para el recipiente del sistema GasPak™ EZ Anaerobe (BD Cat. N° 260678)

Sachets para el recipiente del sistema GasPak™ EZ C02 (BD Cat. N° 260679)

Sachets para el recipiente del sistema GasPak™ EZ Campy (BD Cat. N° 260680)

Cepas:

1. *Clostridium difficile* ATCC BAA-1382;
- 20 2. *Clostridium difficile*, cepas de la colección CMI, véase tabla 4
3. *Clostridium perfringens*, cepas de la colección CMI, véase tabla 4
4. *Bacteroides fragilis* y *Bacteroides spp.*, cepas de la colección CMI, véase tabla 4
5. *Fusobacterium spp.*, cepas de la colección CMI, véase tabla 4
6. *Peptostreptococcus, spp.*, cepas de la colección CMI, véase tabla 4
- 25 7. *Prevotella spp.*, cepas de la colección CMI, véase tabla 4
8. *N. gonorrhoeae* ATCC 35541
9. *N. gonorrhoeae* ATCC 49226
10. *Neisseria gonorrhoeae*, cepas de la colección JMI, véase tabla 4
11. *Neisseria meningitidis*, cepas de la colección JMI, véase tabla 4

- 30 Preparación de los medios y condiciones de cultivo:

El medio de cultivo recomendado para cada especie microbiana se preparó según la publicación de CLSI 'M11-A7 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Séptima edición (2007)' con la excepción de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* para los cuales los medios se prepararon según "M07-A8 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard— Octava Edición (2009)".

35

Vertido en placa:

1. Se prepararon soluciones madre 100x del fármaco de cada compuesto de prueba como se describe en la tabla 1. Se usó un tubo de centrifuga de 15 mL, se agregaron 100 µL de cada solución madre de fármaco a 10 mL de agar fundido (enfriado hasta ~ 55 °C en baño de agua). Se mezclaron invirtiendo los tubos 2 a 3 veces y después se vertieron en placas de Petri de 60 x 15 mm rotuladas individualmente.
- 40 2. Las concentraciones de prueba de rutina fueron: 0.002 µg/mL - 16 µg/mL (14 placas).

3. Se prepararon 4 placas sin fármaco: 2 como control positivo y 2 como control aeróbico.
4. Se dejaron secar las placas. Se usaron el mismo día o se almacenaron toda la noche a temperatura ambiente o se almacenaron hasta 3 días a 4 °C.
5. Las placas se rotularon de acuerdo con la concentración del fármaco y la colocación de la cepa.

5 El cultivo de las células requirió el mantenimiento de un ambiente anaeróbico:

1. Todo el trabajo realizado con bacterias anaeróbicas se hizo lo más rápido posible; el trabajo llevado a cabo en gabinetes de bioseguridad (es decir ambiente aeróbico) se completó en menos de 30 minutos antes de retornar las células a cámaras de anaerobiosis.

10 2. La incubación de bacterias anaeróbicas se realizó usando cámaras GasPak™. Las cámaras grandes estilo box (VWR 90003-636) requirieron 2 sachets de anaerobiosis (VWR 90003-642), mientras que las cámaras estilo cilindro alto (VWR 90003-602) sólo requirieron 1 sachet.

Inoculación de las placas (realizada en gabinetes de bioseguridad):

1. Se estrió cada cepa en placas de agar individuales como se describió antes. Se incubaron durante el tiempo y las condiciones ambientales requeridos (es decir, anaerobiosis, microaerofilia, etc.).

15 2. Se usó el método directo de suspensión de colonias para suspender ansadas de células recién estriadas ~ 4 mL de NaCl<sub>2</sub> al 0.9% y se agitaron en vórtex.

3. La suspensión se ajustó a una D.O.<sub>600</sub> de 0.05 ( $5 \times 10^7$  cfu/mL). Se agitó en vórtex para mezclar.

20 4. Se transfirieron 0.2 mL de cultivos mezclados ajustados a una placa de 96 pocillos. Cuando se analizaron  $\leq 5$  cepas, todas las cepas se alinearon juntas en una sola fila. Cuando se analizaron  $> 5$  cepas, las cepas se transfirieron a una placa con no más de 5 cepas en una sola fila. Esto fue necesario para adaptarse a las placas pequeñas.

25 5. Usando el pipeteador multicanal, se colocaron manchas de 0.002 mL de cada cepa de las placas preparadas de 96 pocillos en cada placa de la prueba de MIC. Esto resultó en  $\sim 1 \times 10^5$  cfu/mancha. Cuando se analizó *C. difficile*, las cepas se apiñaron al crecer, aunque la distancia entre las manchas depositadas por el pipeteador multicanal era suficiente para que las células apiñadas no arruinaran los resultados del ensayo.

30 a. Primero se inocularon 2 placas sin fármaco, mientras otras 2 placas sin fármaco se inocularon después que las placas de la prueba de MIC. Las primeras y las últimas sirvieron como controles de crecimiento e inoculación. Se incubó una placa de cada conjunto de controles sin fármaco con las placas de MIC en las condiciones atmosféricas requeridas, y un conjunto se incubó aeróbicamente para probar la contaminación con bacterias aeróbicas. El cultivo aeróbico fue negativo para el crecimiento cuando se trabajó con cepas anaerobias estrictas o microaerofílicas. Algo de crecimiento fue visible con *N. gonorrhoeae*.

6. Se dejó secar el inóculo (durante el menor tiempo necesario), después se colocaron boca abajo en GasPak con el número adecuado de sachets y se incubaron.

35 7. *Neisseria* spp. se incubó a 37 °C en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h.

Determinación de MIC:

Se examinaron las placas de prueba después del tiempo de incubación correcto y se leyó el punto final de la MIC a la concentración a la que se produjo una marcada reducción en la aparición de crecimiento en las placas de prueba en comparación con el crecimiento de las placas de control positivo.

40 Tabla 1 Diluciones de los compuestos para la determinación de MIC usando el método de dilución en agar.

Paso	Madre (µg/ml)	Procedencia	Volumen de madre (µL)	Diluyente, DMSO (µL)**	Conc. intermedia (µg/µL)	Conc. final a 1:100 (µg/mL)	Volumen (µL) agregado a 10 mL de agar
1	1,600*	Madre			1,600	16	100
2	1,600	Madre	75	75	800	8	100

## ES 2 545 516 T3

Paso	Madre (µg/ml)	Procedencia	Volumen de madre (µL)	Diluyente, DMSO (µL)**	Conc. intermedia (µg/µL)	Conc. final a 1:100 (µg/mL)	Volumen (µL) agregado a 10 mL de agar
3	1,600	Madre	75	225	400	4	100
4	1,600	Madre	75	525	200	2	100
5	200	Paso 4	75	75	100	1	100
6	200	Paso 4	75	225	50	0.5	100
7	200	Paso 4	75	525	25	0.25	100
8	25	Paso 7	75	75	12.5	0.125	100
9	25	Paso 7	75	225	6.25	0.06	100
10	25	Paso 7	75	525	3.1	0.03	100
11	3	Paso 10	75	75	1.6	0.016	100
12	3	Paso 10	75	225	0.8	0.008	100
13	3	Paso 10	75	525	0.4	0.004	100
14	0.4	Paso 13	75	75	0.2	0.002	100

\*1600 µg/ml = 64 µl (10 mg/ml de madre) + 336 µl de DMSO; 400 µl de volumen total para empezar

\*\*el compuesto se disolvió y se diluyó en 100% de DMSO

### Protocolo 4. Procedimiento de determinación de MIC para especies de *Mycobacterium*

#### Materiales

Placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo (Costar 3788) o similares

Película para sellar placas (PerkinElmer, TopSeal-A N° 6005250 o similar)

5 Caldo Middlebrook 7H10 con 0.2% de glicerol

Agar Middlebrook 7H10 con 0.2% de glicerol

Enriquecimiento Middlebrook OADC

Preparación del inóculo para *M. tuberculosis*:

10 1. Se usó una solución madre de *M. tuberculosis* preparada, congelada y almacenada a -70 °C. Se cultivo *M. tuberculosis* en caldo 7H10 broth + 10% de OADC, después se congeló a una concentración de 100 Klett o  $5 \times 10^7$  cfu/ml,

2. Se preparó una dilución 1:20 mediante extracción de 1 ml del caldo madre congelado que se agregó a 19 ml de caldo 7H10 + 10% de OADC (concentración final  $2.5 \times 10^6$  cfu/ml).

15 3. A partir de esta dilución se preparó una segunda dilución 1:20, se extrajo 1 ml y se agregó a 19 ml de caldo recién preparado. Éste fue el inóculo final que se agregó a las placas de 96 pocillos.

Preparación del inóculo para Inoculum *M. kansasii*, *M. avium*, *M. abscessus* y *Nocardia* spc.:

1. Se usó una solución madre congelada de cultivo o un cultivo recién preparado en caldo 7H10 a una concentración de 10 Klett o  $5 \times 10^7$ /ml.



## ES 2 545 516 T3

2. Se preparó una dilución 1:20 mediante extracción de 1.0 ml de la solución madre de cultivo que se agregó a 19 ml de caldo 7H10 (concentración final  $2.5 \times 10^6$  cfu/ml).

3. A partir de esta dilución se preparó una segunda dilución 1:20, se extrajo 1 ml que se agregó a 19 ml de caldo recién preparado (suspensión final).

### 5 Preparación de las placas:

1. Se rotularon las placas.

2. Se agregaron 50  $\mu$ l de caldo 7H10 + 10% de OADC a los pocillos que se estaban utilizando para la determinación de MIC empleando un pipeteador electrónico multicanal.

3. Se prepararon soluciones madre de los fármacos (por ej. concentración de 1 mg/ml) a analizar.

10 4. Se descongelaron y diluyeron las soluciones madre usando caldo 7H10 + 10% de OADC para obtener una solución de trabajo 4x la máxima concentración probada (por ej. concentración final 32  $\mu$ g/ml, la mayor concentración probada fue 8  $\mu$ g/ml). Las diluciones se hicieron a partir de la solución madre. Para comenzar a una concentración de 1  $\mu$ g/ml, los fármacos se prepararon a una concentración de 4  $\mu$ g/ml, de modo que la concentración de partida fue de 1  $\mu$ g/ml. Se extrajeron 25  $\mu$ l de la solución madre de 1 mg/ml y se agregaron 6.2 ml de caldo. Todas las diluciones de fármacos se hicieron en caldo.

15 5. Se agregaron 50  $\mu$ l de la solución de trabajo 4x al primer pocillo de la fila designada. Se continuó con todos los compuestos que se iban a probar. Empleando un pipeteador electrónico multicanal, se mezclaron los compuestos 4x y se diluyeron en serie hasta el pocillo 11. Se desecharon los 50  $\mu$ l restantes. Se usó el pocillo 12 como control positivo.

20 6. Las placas se incubaron a 37 °C para *M. tuberculosis* durante ~18 días; para *M. avium* y *M. kansasii* durante ~7 días; para *Nocardia* y *M. abscessus* durante ~4 días; selladas con película.

7. Se leyeron visualmente y se registraron los resultados. La MIC se registró como la menor concentración de fármaco a la que no se observó crecimiento (transparencia óptica en el pocillo).

Protocolo 5. Protocolo para el ensayo de MIC para *Mycobacterium tuberculosis* en presencia de suero

### 25 Materiales y reactivos:

Placas de microtitulación de 96 pocillos fondo plano, fondo negro Costar N° 3904

Caldo Middlebrook 7H9 (BD271310) con 0.2% de glicerol

Enriquecimiento Middlebrook OADC

Suero fetal bovino

30 Catalasa (Sigma C1345)

Dextrosa

NaCl<sub>2</sub>

Sistema de inoculación BBL Prompt (Fisher b26306)

35 Placas de agar (Middlebrook 7H11 con 0.2% de glicerol y enriquecimiento OADC) con bacterias estriadas hasta colonias individuales

DMSO estéril

### Preparación de los medios:

40 1. Para determinar las MIC en presencia de suero, se necesitaron tres medios diferentes y todos tenían una base de 7H9 + 0.2% de glicerol. Fue importante que todos los medios y complementos fueran esterilizados antes de determinar las MIC.

2. Se prepararon todos los medios siguientes y se inocularon como se describe en la próxima sección. Se probaron todo los compuestos contra Mtb usando cada medio.

a. 7H9 + 0.2% de glicerol + 10% de OADC (medio "estándar" para MIC).

b. 7H9 + 0.2% de glicerol + 2 g/L de dextrosa + 0.85 g/L de NaCl + 0.003 g/L de catalasa (0% de FBS).

c. 2x 7H9 + 0.2% de glicerol + 2 g/L de dextrosa + 0.85 g/L de NaCl + 0.003 g/L de catalasa combinado con un volumen igual de suero fetal bovino (50% de FBS).

Preparación del inóculo:

- 5 1. Usando BBL Prompt, se picaron 5-10 colonias bien separadas y se inocularon en 1 ml de solución salina estéril provista en el kit. Habitualmente las placas tenían dos a tres semanas de preparadas cuando se usaron para este ensayo debido al lento crecimiento de este microorganismo en cultivo.
2. Se agitó bien con vórtex, después se sometió a ultrasonido en baño de agua durante 30 s para obtener una suspensión de  $\sim 10^8$  células/ml. La densidad real se pudo confirmar sembrando en placas las diluciones de esta suspensión.
- 10 3. Se preparó el inóculo en cada una de las 3 formulaciones de medios diluyendo la suspensión de BBL Prompt 1/200 (por ejemplo: se transfirieron 0.2 ml de células a 40 ml de medio) para obtener una densidad celular de partida de  $\sim 10^6$  células/ml.
4. Se usaron 100  $\mu$ l de células ( $\sim 5 \times 10^4$  células) para inocular cada pocillo de microtitulación que contenía 1  $\mu$ l del fármaco en DMSO (véase más adelante).

15 Diluciones de los fármacos, inoculación, determinación de MIC:

1. Se prepararon soluciones madre de control de los fármacos, Isoniazid y Novobiocina a una concentración 10 mM en DMSO al 100% en tanto para Ciprofloxacina y Rifampin se prepararon a 1 mM en DMSO al 50% y DMSO al 100%, respectivamente. Se prepararon las diluciones- se dispensaron 100  $\mu$ l de la solución madre en la primera columna de la placa de 96 pocillos. Se prepararon diluciones seriadas 2 veces, 11 pasos, a lo largo de la fila para cada compuesto transfiriendo 50  $\mu$ l de la columna 1 a 50  $\mu$ l de DMSO en la columna 2. Se continuó transfiriendo 50  $\mu$ l desde la columna 2 hasta la columna 11 mezclando y cambiando tips en cada columna. La columna 12 se dejó con DMSO solo como control.
2. Se transfirió 1  $\mu$ l de cada dilución a un pocillo de microtitulación vacío antes de la adición de 100  $\mu$ l de células. La concentración de partida de Isoniazid y Novobiocina fue 100  $\mu$ M después de la dilución en el medio + células; la concentración de partida de Ciprofloxacina y Rifampin fue 10  $\mu$ M después de la dilución en el medio + células. Las concentraciones del compuesto disminuyeron en pasos de 2x a lo largo de las filas de la placa de microtitulación. Todas las MIC se hicieron por duplicado a cada una de las tres condiciones de medio.
3. Los parámetros de prueba de los compuestos fueron generalmente 10 mM y 50  $\mu$ L de volumen.
4. Se usó un pipeteador multicanal, se extrajo todo el volumen de cada columna de la placa maestra y se transfirió a la primera columna de una nueva placa de microtitulación de 96 pocillos. Se repitió para cada columna de compuestos de la placa maestra, transfiriendo a la columna 1 de una nueva placa de 96 pocillos.
5. Como se describió antes para los compuestos de control, se generaron 11 puntos de diluciones de 2 veces de cada compuesto usando DMSO como diluyente. En todos los casos, se dejó la columna 12 como DMSO solo para control. Una vez que se completaron todas las diluciones, se transfirió nuevamente 1  $\mu$ l de cada dilución a un pocillo de microtitulación vacío antes de la adición de 100  $\mu$ l de células como se hizo para los compuestos de control.
6. Todos los pocillos se inocularon con 100  $\mu$ l de la suspensión de células diluida (véase antes).
7. Después de la adición del inóculo, las placas se mezclaron golpeando suavemente los lados de la placa.
8. Las placas se incubaron en una cámara húmeda a 37 °C durante 9 días.
9. A los 9 días se agregaron 25  $\mu$ l de resazurina al 0.01% estéril a cada pocillo. Se midió la fluorescencia de fondo a una excitación de 492 nm y una emisión de 595 nm, y la placa se retornó a la estufa durante otras 24 horas.

Después de 24 horas se midió la fluorescencia de cada pocillo a una excitación de 492 nm y una emisión de 595 nm.

- 45 El porcentaje de inhibición para un determinado compuesto se calculó de la manera siguiente: Porcentaje de inhibición =  $100 - \left( \frac{\text{fluorescencia en el pocillo} - \text{fluorescencia de fondo promedio}}{\text{control de DMSO} - \text{fluorescencia de fondo promedio}} \right) \times 100$ . Las MIC se registraron para las 3 condiciones de medios como la menor concentración de compuesto que inhibió la reducción de la resazurina ('% de inhibición') señal  $\geq 70\%$  a una condición de medio determinada.

La tabla 2 muestra los resultados del ensayo de MIC para los compuestos elegidos de esta invención.

5 En la tabla 2 y en las tablas y ejemplos siguientes, el "compuesto 12" corresponde a 1-etil-3-[5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea y el "compuesto 13" se refiere a la sal de mesilato del compuesto 12. Análogamente, el "compuesto 23" corresponde a 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea y el "compuesto 23A" se refiere a la sal de mesilato del compuesto 23. Estos son los mismos números utilizados para identificar dichos compuestos y sales utilizados en los ejemplos anteriores.

Tabla 2 - Valores de MIC de los compuestos elegidos

Cepa/Condición especial	Protocolo	MIC (µg/ml)	
		Compuesto 13	Compuesto 23A
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1	0.13	0.021
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 con suero humano	1	0.31	0.15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 con suero de rata	1	0.53	0.18
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 con suero de ratón	1	2	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 GyrB T173I	1	1.29	0.3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, con sangre de caballo lacada			
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 49624 con sangre de caballo lacada	1	0.39	0.11
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 49624	1	0.25	0.11
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 10015, con sangre de caballo lacada	1	0.022	0.01
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	1	0.5	0.031
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	1	0.5	0.031
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6638	1	>8	2
<i>Bacillus subtilis</i> (168) ATCC 6051	1	>8	4
<i>Clostridium difficile</i> ATCC BAA-1382	3	1	0.38
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247	2	1	0.5
<i>Haemophilus influenzae</i> (Rd1 KW20) ATCC 51907	2	2.5	1.3
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd0894 (AcrA-)	2	0.14	0.041
<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 25238	2	0.071	≤0.016
<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 49143	2	0.04	≤0.016
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 35541	3	1.3	0.42

ES 2 545 516 T3

Cepa/Condición especial	Protocolo	MIC (µg/ml)	
		Compuesto 13	Compuesto 23A
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	3	2.3	1
<i>Escherichia coli</i> AG100 WT	2	>16	4
<i>Escherichia coli</i> AG100 <i>tolC</i>	2	0.11	0.063
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2	16	12
<i>Escherichia coli</i> CHE30	2	>16	8
<i>Escherichia coli</i> CHE30 <i>tolC</i>	2	0.5	0.125
<i>Escherichia coli</i> MC4100	2	>16	>16
<i>Escherichia coli</i> MC4100 <i>tolC</i>	2	1	0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	2	>16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	2	>16	12
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	2	>16	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-1710	2	>16	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	2	>16	>16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO750	2	0.33	0.25
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC BAA-84	2	No se hizo	>8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC13637	2	No se hizo	>8
<i>Mycobacterium avium</i> 103	4	0.47	0.18
<i>M. avium</i> Far	4	0.94	0.23
<i>M. avium</i> 3404.4	4	0.94	0.23
<i>Nocardia caviae</i> 2497	4	2	0.125
<i>N. asteroides</i> 2039	4	8	1
<i>N. nova</i> 10	4	8	1
<i>M. kansasii</i> 303	4	No se hizo	0.03
<i>M. kansasii</i> 316	4	No se hizo	0.06
<i>M. kansasii</i> 379	4	No se hizo	<0.015

ES 2 545 516 T3

Cepa/Condición especial	Protocolo	MIC (µg/ml)	
		Compuesto 13	Compuesto 23A
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 25618	4	0.37	0.015
<i>M. tuberculosis</i> Erdman ATCC 35801	4	0.25	0.06
<i>M. tuberculosis</i> Erdman ATCC 35801	5	0.045	0.03
<i>M. tuberculosis</i> Erdman ATCC 35801 con suero de ratón	5	2	0.5
<i>M. abscessus</i> BB2	4	No se hizo	1
<i>M. abscessus</i> MC 6005	4	No se hizo	1
<i>M. abscessus</i> MC 5931	4	No se hizo	0.5
<i>M. abscessus</i> MC 5605	4	No se hizo	1.5
<i>M. abscessus</i> MC 6025	4	No se hizo	0.75
<i>M. abscessus</i> MC 5908	4	No se hizo	1.5
<i>M. abscessus</i> BB3	4	No se hizo	0.5
<i>M. abscessus</i> BB4	4	No se hizo	2
<i>M. abscessus</i> BB5	4	No se hizo	0.5
<i>M. abscessus</i> MC 5922	4	No se hizo	0.25
<i>M. abscessus</i> MC 5960	4	No se hizo	0.5
<i>M. abscessus</i> BB1	4	No se hizo	2
<i>M. abscessus</i> MC 5812	4	No se hizo	1
<i>M. abscessus</i> MC 5901	4	No se hizo	1
<i>M. abscessus</i> BB6	4	No se hizo	0.5
<i>M. abscessus</i> BB8	4	No se hizo	0.5
<i>M. abscessus</i> MC 5908	4	No se hizo	1
<i>M. abscessus</i> LT 949	4	No se hizo	1
<i>M. abscessus</i> BB10	4	No se hizo	0.015
<i>M. abscessus</i> MC 6142	4	No se hizo	0.5
<i>M. abscessus</i> MC 6136	4	No se hizo	0.5

ES 2 545 516 T3

Cepa/Condición especial	Protocolo	MIC (µg/ml)	
		Compuesto 13	Compuesto 23A
<i>M. abscessus</i> MC 6111	4	No se hizo	0.5
<i>M. abscessus</i> MC 6153	4	No se hizo	1

La tabla 3 muestra los resultados del ensayo de MIC90 para los compuestos elegidos de esta invención.

Tabla 3 - Valores de MIC90 de los compuestos elegidos con grupos de microorganismos grampositivos, gramnegativos y patógenos anaeróbicos

Microorganismo	Número de cepas probadas	Protocolo	Compuesto 13		Compuesto 23A	
			Intervalo (µg/ml)	MIC90 (µg/ml)	Intervalo (µg/ml)	MIC90 (µg/ml)
<i>Aeróbicos grampositivos</i>						
<i>Staphylococcus aureus</i>	67	1	0.03-0.5	0.25	0.008-0.06	0.03
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35	1	0.03-0.25	0.12	0.008-0.03	0.03
<i>Enterococcus faecalis</i>	34	1	0.03-0.25	0.25	0.015-0.12	0.06
<i>Enterococcus faecium</i>	33	1	0.12-0.5	0.5	0.003-0.25	0.12
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	67	1	0.015-0.06	0.06	0.008-0.03	0.015
Estreptococos β-hemolíticos (grupos A, B, C y G)	28	1	0.06-0.5	0.25	0.015-0.12	0.12
<i>Aeróbicos gramnegativos</i>						
<i>Haemophilus influenzae</i>	55	2	0.25- 8	2	0.06- 2	1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	26	2	0.015-0.12	0.12	<0.004-0.03	0.03
<i>Acinetobacter baumannii</i>	12	2	>8- >8	>8	4 - >8	>8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	2	>8- >8	>8	>8- >8	>8
<i>Escherichia coli</i>	12	2	>8- >8	>8	2 - >8	>8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	2	>8- >8	>8	2 - >8	>8
<i>Proteus mirabilis</i>	12	2	>8- >8	>8	4 - >8	>8
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	2	>8- >8	>8	>8- >8	>8
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	13	3	0.5- 1	1	0.12-0.25	0.25
<i>Neisseria meningitidis</i>	12	3	0.015-0.25	0.12	0.008-0.06	0.03

<i>Anaerobios</i>						
<i>Bacteroides y Parabacter spp.</i>	26	3	2- >16	>16	0.12- 16	16
<i>Bacteroides fragilis</i>	25	3	8- >16	>16	1- 16	16
<i>Clostridium difficile</i>	16	3	0.5- 16	1	0.06- 4	0.25
<i>Clostridium perfringens</i>	12	3	0.12-0.5	0.5	0.12-0.5	0.5
<i>Fusobacterium spp.</i>	16	3	1-4	2	0.015->16	>16
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	11	3	0.06->16	>16	0.03->16	>16
<i>Prevotella spp.</i>	13	3	0.5- >16	>16	0.06- 16	16

5 La tabla 3A también muestra los resultados del ensayo de MIC para los compuestos elegidos de esta invención. En la tabla 3A, el "compuesto 23A" corresponde a la sal del ácido metanosulfónico de 1-etil-3-[6-fluoro-5-[2-(1-hidroxi-1-metil-etil)pirimidin-5-il]-7-[(2R)-tetrahidrofuran-2-il]-1H-bencimidazol-2-il]urea (23A). Análogamente, el "compuesto W" corresponde a (R)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato disódico (W). Estos son los mismos números utilizados para identificar dichos compuestos en los ejemplos de síntesis anteriores.

Tabla 3A Valores de MIC de los compuestos elegidos

Cepa/Condición especial	Procedencia de la cepa	Protocolo	MIC (µg/ml)	
			Compuesto 23A	Compuesto W
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ATCC <sup>1</sup>	1	0.021	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 con suero humano	ATCC	1	0.15	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 con suero de rata	ATCC	1	0.18	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 con suero de ratón	ATCC	1	0.5	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 GyrB T173I	Vertex <sup>2</sup>	1	0.3	>8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, con sangre de caballo lacada	ATCC	1	0.028	1
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 49624 con sangre de caballo lacada	ATCC	1	0.11	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 10015, con sangre de caballo lacada	ATCC	1	0.01	0.25
<i>Haemophilus influenzae</i> (Rd1 KW20) ATCC 51907	ATCC	2	1.3	8

ES 2 545 516 T3

Cepa/Condición especial	Procedencia de la cepa	Protocolo	MIC (µg/ml)	
			Compuesto 23A	Compuesto W
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd0894 (AcrA-)	Hiroshi Nikaido	2	0.041	0.25
<i>Escherichia coli</i> AG100 WT	CGSC <sup>3</sup>	2	4	>16
<i>Escherichia coli</i> AG100 <i>tolC</i> <sup>4</sup>	Vertex	2	0.063	8

<sup>1</sup>American Type Culture Collection  
<sup>2</sup>Construido por Vertex  
<sup>3</sup>Coli Genetic Stock Center  
<sup>4</sup>todos los constructos *tolC* son *tolC*::Tn10 derivados de CAG12184 (Coli Genetic Stock Center)

En la tabla 4 siguiente, el término "CMI" corresponde a las siglas de The Clinical Microbiology Institute ubicado en Wilsonville, Oregon.

Tabla 4 Grupos de microorganismos anaeróbicos utilizados para generar datos de MIC90

CMI N°	MICROORGANISMO
A2380	<i>B. fragilis</i>
A2381	<i>B. fragilis</i>
A2382	<i>B. fragilis</i>
A2486	<i>B. fragilis</i>
A2487	<i>B. fragilis</i>
A2489	<i>B. fragilis</i>
A2527	<i>B. fragilis</i>
A2529	<i>B. fragilis</i>
A2562	<i>B. fragilis</i>
A2627	<i>B. fragilis</i>
A2802	<i>B. fragilis</i>
A2803	<i>B. fragilis</i>
A2804	<i>B. fragilis</i>
A2805	<i>B. fragilis</i>
A2806	<i>B. fragilis</i>



ES 2 545 516 T3

CMI N°	MICROORGANISMO
A2807	<i>B. fragilis</i>
A2808	<i>B. fragilis</i>
A2809	<i>B. fragilis</i>
A2810	<i>B. fragilis</i>
A2811	<i>B. fragilis</i>
A2812	<i>B. fragilis</i>
A2813	<i>B. fragilis</i>
A2814	<i>B. fragilis</i>
A2460	<i>B. thetaiotaomicron</i>
A2462	<i>B. thetaiotaomicron</i>
A2463	<i>B. thetaiotaomicron</i>
A2464	<i>B. thetaiotaomicron</i>
A2536	<i>B. thetaiotaomicron</i>
A2591	<i>B. uniformis</i>
A2604	<i>B. vulgatus</i>
A2606	<i>B. vulgatus</i>
A2613	<i>B. ovatus</i>
A2616	<i>B. ovatus</i>
A2815	<i>Bacteroides tectum</i>
A2816	<i>B. ureolyticus</i>
A2817	<i>Bacteroides capillosus</i>
A2818	<i>B. ureolyticus</i>
A2824	<i>Parabacter distasonis</i>
A2825	<i>B. ovatus</i>
A2826	<i>B. uniformis</i>
A2827	<i>B. uniformis</i>

ES 2 545 516 T3

CMI N°	MICROORGANISMO
A2828	<i>B. vulgatus</i>
A2829	<i>B. vulgatus</i>
A2830	<i>B. ovatus</i>
A2831	<i>B. thetaiotaomicron</i>
A2832	<i>Parabacter distasonis</i>
A2833	<i>B. thetaiotaomicron</i>
A2767	<i>C. difficile</i>
A2768	<i>C. difficile</i>
A2769	<i>C. difficile</i>
A2770	<i>C. difficile</i>
A2771	<i>C. difficile</i>
A2772	<i>C. difficile</i>
A2773	<i>C. difficile</i>
A2774	<i>C. difficile</i>
A2775	<i>C. difficile</i>
A2776	<i>C. difficile</i>
A2777	<i>C. difficile</i>
A2778	<i>C. difficile</i>
A2779	<i>C. difficile</i>
A2780	<i>C. difficile</i>
A2140	<i>C. perfringens</i>
A2203	<i>C. perfringens</i>
A2204	<i>C. perfringens</i>
A2227	<i>C. perfringens</i>
A2228	<i>C. perfringens</i>
A2229	<i>C. perfringens</i>

ES 2 545 516 T3

CMI N°	MICROORGANISMO
A2315	<i>C. perfringens</i>
A2332	<i>C. perfringens</i>
A2333	<i>C. perfringens</i>
A2334	<i>C. perfringens</i>
A2389	<i>C. perfringens</i>
A2390	<i>C. perfringens</i>
A864	<i>F. necrophorum</i>
A871	<i>F. nucleatum</i>
A1667	<i>F. necrophorum</i>
A1666	<i>F. necrophorum</i>
A2249	<i>F. nucleatum</i>
A2716	<i>Fusobacterium species</i>
A2717	<i>Fusobacterium species</i>
A2719	<i>Fusobacterium species</i>
A2721	<i>Fusobacterium species</i>
A2722	<i>Fusobacterium species</i>
A2710	<i>Fusobacterium species</i>
A2711	<i>Fusobacterium species</i>
A2712	<i>Fusobacterium species</i>
A2713	<i>Fusobacterium species</i>
A2714	<i>Fusobacterium species</i>
A2715	<i>Fusobacterium species</i>
A1594	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
A2158	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
A2168	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
A2170	<i>Peptostreptococcus magnus</i>

ES 2 545 516 T3

CMI N°	MICROORGANISMO
A2171	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
A2575	<i>Peptostreptococcus spp.</i>
A2579	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
A2580	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
A2614	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
A2620	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
A2629	<i>Peptostreptococcus spp.</i>
A2739	<i>Prevotella denticola</i>
A2752	<i>Prevotella bivia</i>
A2753	<i>Prevotella intermedia</i>
A2754	<i>Prevotella intermedia</i>
A2756	<i>Prevotella bivia</i>
A2759	<i>Prevotella bivia</i>
A2760	<i>Prevotella denticola</i>
A2761	<i>Prevotella intermedia</i>
A2762	<i>Prevotella melaninogenica</i>
A2765	<i>Prevotella melaninogenica</i>
A2766	<i>Prevotella melaninogenica</i>
A2821	<i>Prevotella bivia</i>
A2822	<i>Prevotella bivia</i>
QCBF	<i>B. fragilis</i>
QCBT	<i>B. thetaiotaomicron</i>
QCCD	<i>C. difficile</i>
QCBF	<i>B. fragilis</i>
QCBT	<i>B. thetaiotaomicron</i>
QCCD	<i>C. difficile</i>

## ES 2 545 516 T3

En la tabla 5 siguiente, el término "JMI" corresponde a las siglas de The Jones Microbiology Institute ubicado en North Liberty, Iowa.

Tabla 5: Grupos de microorganismos grampositivos y gramnegativos utilizados para generar datos de MIC90

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
394	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
2166	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
3060	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
3170	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
9328	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
9922	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
13618	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
14308	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
17086	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
17176	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
30554	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
32007	ACB	<i>Acinetobacter baumannii</i>
1192	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
3096	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
5534	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
6487	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
9592	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
11680	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
12573	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
12735	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
13057	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
18048	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
25173	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>
29443	ECL	<i>Enterobacter cloacae</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
44	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
355	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
886	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
955	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
1000	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
1053	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
1142	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
1325	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
1446	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
2014	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
2103	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
2255	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
2978	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
2986	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
5027	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
5270	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
5874	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
7430	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
7904	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
8092	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
8691	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
9090	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
10795	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
14104	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
16481	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
18217	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
22442	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
25726	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
26143	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
28131	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
29765	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
30279	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
31234	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
31673	EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
115	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
227	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
414	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
712	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
870	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
911	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
2356	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
2364	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
2762	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
3062	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
4464	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
4473	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
4653	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
4679	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
6803	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
6836	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
8280	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
8702	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
9855	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
10766	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
12799	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
13556	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
13783	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
14687	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
15268	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
15525	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
15538	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
18102	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
18306	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
19967	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
22428	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
23482	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
29658	EFM	<i>Enterococcus faecium</i>
597	EC	<i>Escherichia coli</i>
847	EC	<i>Escherichia coli</i>
1451	EC	<i>Escherichia coli</i>
8682	EC	<i>Escherichia coli</i>
11199	EC	<i>Escherichia coli</i>
12583	EC	<i>Escherichia coli</i>
12792	EC	<i>Escherichia coli</i>
13265	EC	<i>Escherichia coli</i>
14594	EC	<i>Escherichia coli</i>
22148	EC	<i>Escherichia coli</i>
29743	EC	<i>Escherichia coli</i>



ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
30426	EC	<i>Escherichia coli</i>
470	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
2965	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
3112	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
3637	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
4393	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
4546	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
4615	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
5848	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
6194	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
8816	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
11814	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
16977	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
18083	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
18821	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
25178	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
30704	BSA	<i>Streptococcus</i> Grupo A
12	BSB	<i>Streptococcus</i> Grupo B
10366	BSB	<i>Streptococcus</i> Grupo B
10611	BSB	<i>Streptococcus</i> Grupo B
16786	BSB	<i>Streptococcus</i> Grupo B
18833	BSB	<i>Streptococcus</i> Grupo B
30225	BSB	<i>Streptococcus</i> Grupo B
10422	BSC	<i>Streptococcus</i> Grupo C
14209	BSC	<i>Streptococcus</i> Grupo C
29732	BSC	<i>Streptococcus</i> Grupo C

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
8544	BSG	<i>Streptococcus</i> Grupo C
18086	BSG	<i>Streptococcus</i> Grupo C
29815	BSG	<i>Streptococcus</i> Grupo C
147	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
180	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
934	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
970	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
1298	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
1819	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
1915	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
2000	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
2562	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
2821	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
3133	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
3140	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
3497	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
3508	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
3535	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
4082	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
4108	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
4422	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
4868	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
4872	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
5858	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
6258	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
6875	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
7063	HI	<i>Haemophilus influenza</i>
7600	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
8465	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
10280	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
10732	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
10850	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
11366	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
11716	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
11724	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
11908	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
12093	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
12107	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
13424	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
13439	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
13672	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
13687	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
13792	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
13793	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
14440	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
15351	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
15356	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
15678	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
15800	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
17841	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
18614	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
25195	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
27021	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
28326	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
28332	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
29918	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
29923	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
31911	HI	<i>Haemophilus influenzae</i>
428	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
791	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
836	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1422	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1674	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1883	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6486	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8789	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10705	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
11123	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
28148	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
29432	KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
937	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
1290	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
1830	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
1903	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
4346	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
4880	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
6241	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
6551	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
7074	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
7259	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
7544	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
8142	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
8451	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
9246	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
9996	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
12158	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
13443	MCAT	<i>Moraxella ccatarrhalis</i>
13692	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
13817	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
14431	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
14762	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
14842	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
15361	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
15741	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
17843	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
18639	MCAT	<i>Moraxella catarrhalis</i>
241	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
291	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
293	GC	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
344	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
451	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
474	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
491	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
493	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
503	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
521	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
552	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
573	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
592	GC	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
25	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
813	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
1725	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
2747	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
3201	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
3335	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
7053	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
9407	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
10447	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
12685	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
12841	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
14038	NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
1127	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
3049	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
4471	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
8793	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
10702	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
11218	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
14662	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
17072	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
19059	PM	<i>Proteus mirabilis</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
23367	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
29819	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
31419	PM	<i>Proteus mirabilis</i>
1881	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5061	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
7909	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8713	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
14318	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
14772	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
15512	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
17093	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
17802	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
19661	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
29967	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
31539	PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
82	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
99	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
138	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
139	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
140	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
141	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
142	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
272	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
287	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
354	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
382	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
1112	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
1687	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
1848	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
2031	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
2159	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
2645	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
3256	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
3276	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4044	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4214	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4217	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4220	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4231	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4240	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4262	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4370	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4665	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4666	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
4667	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
5026	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
5666	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
6792	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
7023	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
7461	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
7899	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
7901	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>



ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
8714	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
9374	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
9437	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
10056	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
10110	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
11379	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
11629	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
11659	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
12788	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
12789	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
13043	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
13086	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
13721	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
13742	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
13932	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
14210	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
14384	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
15428	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
15430	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
17721	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
18688	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
19095	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
20195	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
22141	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
22689	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
27398	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
29048	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
29051	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
30491	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
30538	SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
25	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
53	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
385	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
398	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
701	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
713	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1381	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2174	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2286	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2969	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3417	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3447	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
4753	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
7241	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
9366	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
10665	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
11792	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
12311	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
13036	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
13227	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
13243	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
13621	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
13638	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
13800	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
14078	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
14392	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
15007	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
16733	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
18871	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
23285	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
27805	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
29679	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
29985	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
30259	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
31444	SEPI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
268	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1264	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
2482	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
2653	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
2994	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
3123	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
3124	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
4336	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
4858	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
5606	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
5881	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
5897	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
5900	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
6051	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
6216	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
6556	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
7270	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
7584	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
8479	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
8501	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
9256	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
9257	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
10246	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
10467	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
10886	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
11217	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
11228	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
11238	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
11757	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
11768	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
12121	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
12124	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
12149	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
12767	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
12988	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
13321	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
13393	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
13521	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
13544	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

ES 2 545 516 T3

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
13700	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
13704	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
13822	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
13838	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
14131	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
14413	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
14744	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
14808	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
14827	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
14835	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
14836	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
15832	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
17336	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
17343	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
17349	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
17735	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
18060	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
18567	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
18595	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
19082	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
19826	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
22174	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
22175	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
27003	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
28310	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
28312	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Cepa JMI N°	Código JMI del microorganismo	Microorganismo
29890	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
29910	SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

Ejemplo 32

Modelo de infección renal por *S. aureus* en ratón

5 Animales: se obtuvieron ratones hembras CD-1 (8-10 semanas de vida; 6/grupo), de Charles River Laboratories y se alojaron y mantuvieron de conformidad con la Guía para el cuidado y uso de los animales experimentales (*Guide to the Care and Use of Experimental Animals*).

Cepas bacterianas y soluciones madre

10 Se obtuvo *S. aureus* sensible a la metilina (MSSA) cepa ATCC 29213 de American Type Culture Collection. Para preparar las soluciones madre para los estudios en animales el *S. aureus* se sembró en placas de agar Mueller Hinton Agar y se incubó toda la noche a 37 °C. Se usaron 3-4 colonias de la placa para inocular 5 mL de caldo Mueller Hinton (MHB) que luego se incubó durante 8 horas a 37 °C con agitación a 300 rpm. Los 5 mL de cultivo de 8 horas se diluyeron 20 veces en 100 mL y se incubaron toda la noche (12-14 horas). Las bacterias se sedimentaron durante 20 minutos a 3000 x y se lavaron 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 0.5% de seroalbúmina bovina (BSA). Se congelaron alícuotas (1 mL) que contenían  $\sim 1 \times 10^{10}$  cfu en PBS/20% de glicerol y se almacenaron a -80 °C hasta el día de uso. Se confirmaron los títulos de las soluciones madre mediante dilución seriada y siembra en placas de agar Mueller Hinton.

Modelo de infección renal por *S. aureus* en ratón

20 Antes de la inoculación, las soluciones madre bacterianas se descongelaron y se lavaron una vez con PBS/BSA. Después las soluciones madre se diluyeron con PBS/BSA hasta una concentración final de  $1 \times 10^9$  cfu/mL para dar un inóculo de aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  cfu por ratón en un volumen de 100  $\mu$ L. Se encontró que este inóculo era óptimo en experimentos preliminares que utilizaron dosis de provocación de  $10^6-10^9$  de microorganismos *S. aureus*/ratón para establecer una carga de  $\sim 10^6$  cfu/riñones 26 horas post infección sin mortalidad (no se muestran los datos). En estos estudios preliminares la provocación con *S. aureus* a menos de  $10^7$  cfu/ratón indujo infecciones no constantes o no crónicas, en tanto una dosis de  $10^9$  cfu/ratón resultó en una enfermedad rápida y una mortalidad en alto porcentaje de los ratones. Las inyecciones se administraron por vía intravenosa en la vena de la cola usando una aguja estéril de calibre 30. Una vez completadas las infecciones en los ratones, las soluciones madre bacterianas utilizadas para provocar a los ratones se sembraron en placas y se contaron para verificar la concentración del inóculo.

30 Para evaluar la carga bacteriana a los tiempos indicados post infección (muy comúnmente 2 a 26 horas), los ratones se sacrificaron, se les extrajeron los riñones asépticamente y se colocaron en PBS/BSA estéril (5 mL/par de riñones). Los riñones se homogeneizaron en condiciones asépticas, usando un homogeneizador manual (Powergen 125; Fisher Scientific). Durante la recolección y homogeneización todas las muestras se mantuvieron en hielo y el homogeneizador se lavó bien y se esterilizó entre cada muestra. Los homogeneizados se diluyeron serialmente en PBS/BSA estéril y se sembraron en placas de agar MH para determinar el recuento de bacterias por par de riñones.

35 Tabla 6. El compuesto 23A reduce las cargas de *S. aureus* en el modelo de infección renal por *S. aureus* en ratones

	Tiempo de tratamiento					
	30 minutos		6 Horas		24 Horas	
	Mediana de la carga renal (log cfu/riñones)	Diferencia log vs. control del vehículo	Mediana de la carga renal (log cfu/riñones)	Diferencia log vs. control de vehículo	Mediana de la carga renal (log cfu/riñones)	Diferencia log vs. control de vehículo
Vehículo	4.97		5.21		6.35	
10 mg/kg de compuesto	4.84	-0.14	4.84	-0.37	4.48	-1.87

## ES 2 545 516 T3

	Tiempo de tratamiento					
	30 minutos		6 Horas		24 Horas	
	Mediana de la carga renal (log cfu/riñones)	Diferencia log vs. control del vehículo	Mediana de la carga renal (log cfu/riñones)	Diferencia log vs. control de vehículo	Mediana de la carga renal (log cfu/riñones)	Diferencia log vs. control de vehículo
23A						
30 mg/kg de compuesto 23A	4.97	0.00	4.62	-0.59	3.44	-2.90
100 mg/kg de compuesto 23A	4.89	-0.08	4.55	-0.66	3.49	-2.86

- 5 Se provocaron ratones CD-1 (6/grupo) por vía IV con *S. aureus* (ATCC 29213) a una concentración de  $2 \times 10^8$  cfu/ratón. Dos horas después de la provocación los ratones se trataron por sonda oral con vehículo (10% de VitE TPGS) a una concentración de 10 ml/kg o compuesto 23A a una concentración de 10, 30 y 100 mg/kg. Los grupos de tratamiento de 30 minutos y 6 horas se trataron una sola vez, mientras que el grupo de 24 horas recibió un segundo tratamiento 10 horas después de la primera dosis. Después de aumentar los tiempos post tratamiento (30 minutos, 6 horas o 24 horas), los ratones se sacrificaron y se les extrajeron los riñones, que se homogeneizaron y se sembraron en placas para cuantificar las cargas de *S. aureus*. Se calcularon las cargas de los pares de riñones para cada ratón y la mediana para cada grupo de ratones.
- 10 Resultados: El compuesto 23A administrado por vía oral mostró eficacia *in vivo* contra la infección renal por MSSA (SA 29213) inducida experimentalmente. Treinta minutos después del tratamiento inicial no hubo diferencia en la carga renal entre los ratones tratados con compuesto y con vehículo. El grupo de 30 minutos tratado con vehículo sirvió como control temprano para la comparación de los efectos del compuesto a tiempos posteriores. A las 6 horas de la primera dosis, todos los tratamientos con compuesto redujeron las cargas bacterianas renales en 0.4-0.6 log
- 15 versus el control de vehículo emparejado por tiempo. Además, el compuesto 23A administrado a una concentración de 30 y 100 mg/kg proporcionó una reducción de 0.3-0.4 log versus el control temprano de 30 minutos.
- 20 Luego de un período de tratamiento de 24 horas (que incluyó una segunda dosis de tratamiento administrada a las 10 horas), se observó una disminución en la densidad bacteriana en comparación con el control de vehículo emparejado por tiempo para todos los grupos de tratamiento. El compuesto 23A administrado a una concentración de 30 y 100 mg/kg BID proporcionó una reducción de 2.8-2.9 log, en tanto el compuesto 23A a una concentración de 10 mg/kg BID fue más variable y proporcionó una reducción de 1.8 log versus el control tratado con vehículo de 24 horas. Además, el compuesto 23A administrado a una concentración de 30 y 100 mg/kg mostró aproximadamente reducciones de 1.5 log versus el control tratado con vehículo de 30 minutos, indicativo de actividad bactericida.
- 25 En resumen y como se muestra antes en la tabla 6, la dosificación BID de 30 y 100 mg/kg del compuesto 23A disminuyó la proliferación bacteriana de *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA) cepa ATCC 29213 en comparación con el grupo de control de 30 minutos, tanto a los tiempos de evaluación de 6 horas como de 24 horas, mientras que el tratamiento con 10 mg/kg de compuesto 23A limitó la proliferación bacteriana a las 6 horas pero fue menos eficaz que otros grupos de tratamiento a las 24 horas.

Tabla 7. Una única dosis de compuesto 23A reduce las cargas de *S. aureus* en el modelo de infección renal por *S. aureus* en ratones

Grupo de tratamiento	Mediana de la carga renal (log cfu/riñones)	Reducción log vs. control temprano	Reducción log vs. control tardío
Control temprano	4.73		
Control tardío	6.63	1.90	

Tabla 7. Una única dosis de compuesto 23A reduce las cargas de *S. aureus* en el modelo de infección renal por *S. aureus* en ratones

Grupo de tratamiento	Mediana de la carga renal (log cfu/riñones)	Reducción log vs. control temprano	Reducción log vs. control tardío
10 mg/kg de compuesto 23A	4.73	0.00	-1.90
30 mg/kg de compuesto 23A	4.32	-0.40	-2.31
60 mg/kg de compuesto 23A	3.52	-1.21	-3.11
100 mg/kg de compuesto 23A	3.31	-1.42	-3.32

Se provocaron ratones CD-1 (6/grupo) por vía IV con *S. aureus* (ATCC 29213) a una concentración de  $2 \times 10^8$  cfu/ratón. Después de 2 horas se sacrificó un único grupo de ratones (control temprano (EC)), se les extrajeron los riñones que se homogeneizaron y se sembraron en placas para cuantificar las cargas de *S. aureus*. Los otros dos grupos de ratones infectados se trataron por sonda oral con vehículo a una dosis de 10 ml/kg (10% de VitE TPGS; control tardío, LC) o compuesto 23A a una dosis de 10, 30, 60 y 100 mg/kg. A las 24 horas los grupos de ratones tratados se sacrificaron, se les extrajeron los riñones que se homogeneizaron y se sembraron en placas para cuantificar las cargas de *S. aureus*. Se resumieron las cargas de los pares de riñones para cada ratón y la mediana para cada grupo de ratones.

5 Resultados: En resumen y como se muestra antes en la tabla 7, una única dosis oral de compuesto 23A mostró eficacia *in vivo* contra una infección renal por MSSA (SA 29213) inducida experimentalmente. Después de 24 horas todos los tratamientos mostraron disminución en la densidad bacteriana en comparación con el control tratado con vehículo emparejado por tiempo. El compuesto 23A demostró reducciones dependientes de la dosis de 1.9, 2.3, 3.1 y 3.3 log versus el control tratado con vehículo cuando se lo administró a una dosis de 10, 30, 60 o 100 mg/kg. Además, las dosis de 60 y 100 mg/kg del compuesto 23A redujeron las cargas bacterianas versus el control temprano en 1.2-1.4 logs lo que sugiere que compuesto 23A tiene actividad bactericida.

Tabla 7A Una única dosis de compuesto W reduce las cargas bacterianas en el modelo de infección renal por MSSA en ratones

Grupo de tratamiento (Compuesto W equivalente a una única dosis)	Mediana de la carga renal ( $\log_{10}$ CFU/riñones)	Diferencia $\log_{10}$ vs. control temprano	Diferencia $\log_{10}$ vs. control tardío
Control temprano	4.40		
Control tardío	5.94	1.54	
16 (10) mg/kg de compuesto W	3.69	-0.71	-2.25
49 (30) mg/kg de compuesto W	3.22	-1.18	-2.72
99 (60) mg/kg de compuesto W	3.32	-1.08	-2.62
166 (100) mg/kg de compuesto W	2.94	-1.46	-3.00

20 Se provocaron ratones CD-1 (8/grupo) por vía IV con *S. aureus* (ATCC 29213) a una concentración de  $2 \times 10^8$  cfu/ratón. Después de 2 horas se sacrificó un único grupo de ratones (control temprano (EC)), se les extrajeron los



riñones que se homogeneizaron y se sembraron en placas para cuantificar las cargas de *S. aureus*. Los otros grupos de ratones infectados se trataron por sonda oral con vehículo a una dosis de 10 ml/kg (agua; control tardío, LC), el compuesto W se administró a niveles de dosis nominales de 16, 49, 99 o 166 mg/kg que se esperaba que suministrarán 10, 30, 60 o 100 mg/kg de compuesto 23A, los equivalentes de la porción activa de dosis luego de la conversión completa a 10, 30, 60, 100 mg/kg. Después de 24 horas se sacrificaron los grupos de ratones tratados, se les extrajeron los riñones que se homogeneizaron y se sembraron en placa para cuantificar las cargas de *S. aureus*. Se resumieron las cargas de los pares de riñones para cada ratón y la mediana para cada grupo de ratones.

Resultados: En resumen y como se muestra antes en la tabla 8, una única dosis oral de compuesto W mostró eficacia *in vivo* contra una infección renal por MSSA (SA 29213) inducida experimentalmente. Después de 24 horas todos los tratamientos mostraron disminución en la densidad bacteriana en comparación con el control tratado con vehículo emparejado por tiempo. El compuesto W demostró reducciones dependientes de la dosis de 1.9, 2.3, 2.7, 2.6 y 3.0 log versus el control tratado con vehículo cuando se lo administró a una dosis de 16, 49, 99 y 166 mg/kg que proporcionaron exposiciones equivalentes de 10, 30, 60 o 100 mg/kg de compuesto 24. Además, dosis de 16, 49, 99 y 166 mg/kg del compuesto W redujeron las cargas bacterianas versus el control temprano en 0.7-1.5 logs lo que sugiere que el compuesto 23A tiene actividad bactericida.

Ejemplo 33

Modelo de infección de muslo de rata neutropénica

**Animales:** Se obtuvieron ratas Sprague Dawley machos, exentas de patógeno específico, que pesaban entre 76 y 100 g de Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA) y se utilizaron en este experimento. Se permitió que los animales se aclimataran por un mínimo de siete (7) días antes del comienzo del estudio.

**Bacterias:** Se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MSSA) ATCC 29213 para la experimentación *in vivo*. La cepa de prueba se subcultivó dos veces en medio agar microbiológico estándar (tripticosa soja agar con 5% de sangre ovina). La segunda transferencia se hizo menos de 24 horas antes de usar en la preparación del inóculo del modelo de infección del muslo.

**Modelo de infección de muslo de rata neutropénica.** Para inducir neutropenia, las ratas se trataron con el inmunosupresor ciclofosfamida en una dosis de 150 mg/kg, administrada en una inyección intraperitoneal (IP) de 1 ml, tres días antes de la infección. Las ratas se infectaron con un inyección intramuscular (IM) de 0.2 ml en ambos muslos traseros con una suspensión en solución salina normal de  $10^7$  cfu/ml de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina 29213. Luego de cantidades crecientes de tiempo (2-26 horas) se tomaron los dos muslos traseros de cada animal, se enjuagaron con solución salina estéril, se pesaron, después se colocaron en 50 ml de solución salina normal estéril y se colocaron en hielo hasta la homogeneización. Aproximadamente la mitad del volumen total de la muestra homogeneizada se pasó a través de un filtro de poro grande (para eliminar el cartílago y piezas de tejido aglutinadas grandes), se diluyó en solución salina y se cultivó en placas de agar (tripticosa soja agar con 5% de sangre ovina). Todas las placas de cultivo se incubaron a aproximadamente 37 °C durante 18-24 horas. Se enumeraron las unidades formadoras de colonia (en cfu/ml de homogeneizado) y se calculó la mediana para cada grupo de tratamiento y de control. Generalmente cada grupo tuvo n = 6; cada muslo se consideró un número discreto. La mediana de cfu/ml por grupo se comparó con la densidad bacteriana inicial a las 2 horas (control temprano) o con la del grupo de control tratado con vehículo emparejado por tiempo (control tardío; LC) grupo cosechado simultáneamente.

Tabla 8. El compuesto 23A demuestra las reducciones relacionadas con la dosis y dependientes del tiempo en las cargas de *S aureus* en muslos de ratas neutropénicas

Grupo de tratamiento	Tiempo de tratamiento					
	8 Horas			24 Horas		
	Mediana de la carga de los muslos (log cfu/mL)	Diferencia log vs. control temprano	Reducción log vs. control tardío (8 horas)	Mediana de la carga de los muslos (log cfu/mL)	Diferencia log vs. control temprano	Diferencia log vs. control tardío (24 horas)
Control temprano	5.37			5.37		
Control tardío	6.77	1.41		6.99	1.62	

Tabla 8. El compuesto 23A demuestra las reducciones relacionadas con la dosis y dependientes del tiempo en las cargas de *S aureus* en muslos de ratas neutropénicas

Grupo de tratamiento	Tiempo de tratamiento					
	8 Horas			24 Horas		
	Mediana de la carga de los muslos (log cfu/mL)	Diferencia log vs. control temprano	Reducción log vs. control tardío (8 horas)	Mediana de la carga de los muslos (log cfu/mL)	Diferencia log vs. control temprano	Diferencia log vs. control tardío (24 horas)
10 mg/kg de compuesto 23A	5.42	0.05	-1.36	4.59	-0.78	-2.40
30 mg/kg de compuesto 23A	4.75	-0.62	-2.02	4.31	-1.06	-2.68
60 mg/kg de compuesto 23A	4.80	-0.57	-1.97	4.19	-1.18	-2.80

Se infectaron ratas neutropénicas (3/grupo) mediante provocación intramuscular (IM) con *S. aureus* (ATCC 29213) a una dosis de  $\sim 2 \times 10^6$  cfu/muslo. Después de 2 horas se sacrificó un único grupo de ratas (control temprano (EC)), se les extrajeron los muslos que se homogeneizaron y se sembraron en placas para cuantificar las cargas de *S. aureus*. Las otras ratas infectadas se trataron por sonda oral con vehículo a una dosis de 10 ml/kg (20% Cavitron/1% HPMCAS-MG; control tardío, LC) o compuesto 23A a una dosis de 10, 30, 60 mg/kg. Los grupos de tratamiento de 8 horas recibieron un único tratamiento (QD), se sacrificaron y se les extrajeron los muslos para determinar las cfu 8 horas post tratamiento (QD), mientras que los grupos de tratamiento de 24 horas recibieron 2 dosis con 12 horas de separación (q12h), se sacrificaron y se les extrajeron los muslos 24 horas post tratamiento. Se determinaron la carga de cada muslo y las cfu/ml y se resumió la mediana del grupo de 3 ratas.

Resultados: Como se muestra antes en la tabla 8, el compuesto 23A administrado por vía oral mostró eficacia *in vivo* contra el MSSA (SA 29213). Ocho horas después de la primera dosis todo los grupos tuvieron reducciones en las cargas en comparación con el control emparejado por tiempo, reducción de  $\sim 1.3$  log para el compuesto 23A a la dosis de 10 mg/kg y reducción de  $\sim 2$  log para el compuesto 23A a las dosis de 30 y 60 mg/kg. Comparado con el control temprano, el compuesto 23A a la dosis de 10 mg/kg mantuvo la proliferación bacteriana de SA 29213 hasta al menos el punto de estasis, mientras que el compuesto 23 A a las dosis de 60 y 100 mg/kg disminuyó ligeramente la carga bacteriana en -0.5-0.6 log.

Después de 24 horas y una segunda dosis de tratamiento administrada a las 12 horas, se observó una disminución en la densidad bacteriana en comparación con el control tardío de  $\sim 2.4$ -2.8 logs para todos los grupos de tratamiento. En comparación con el control temprano se observó una reducción de aproximadamente 0.8 log para el compuesto 23A a una dosis de 10 mg/kg, en tanto el compuesto 23A a las dosis de 30 y 60 mg/kg provocó reducciones de - 1.1-1.2 log.

Tabla 9. El compuesto 13 demuestra reducciones relacionadas con la dosis y dependientes del tiempo en las cargas de *S aureus* en muslos de ratas neutropénicas

Grupo de tratamiento	Tiempo de tratamiento					
	8 Horas			24 Horas		
	Mediana de la carga de los muslos (log cfu/mL)	Diferencia log vs. control temprano	Diferencia log vs. control tardío (8 horas)	Mediana de la carga de los muslos (log cfu/mL)	Diferencia log vs. control temprano	Diferencia log vs. control tardío (24 horas)
Control	5.30			5.30		

Tabla 9. El compuesto 13 demuestra reducciones relacionadas con la dosis y dependientes del tiempo en las cargas de *S aureus* en muslos de ratas neutropénicas

Grupo de tratamiento	Tiempo de tratamiento					
	8 Horas			24 Horas		
	Mediana de la carga de los muslos (log cfu/mL)	Diferencia log vs. control temprano	Diferencia log vs. control tardío (8 horas)	Mediana de la carga de los muslos (log cfu/mL)	Diferencia log vs. control temprano	Diferencia log vs. control tardío (24 horas)
temprano						
Control tardío	6.64	1.34		7.16	1.86	
10 mg/kg de compuesto 13	5.15	-0.15	-1.49	6.02	0.72	-1.14
60 mg/kg de compuesto 13	4.95	-0.35	-1.69	4.31	-0.99	-2.85
100 mg/kg de compuesto 13	4.82	-0.48	-1.82	4.17	-1.13	-2.99

Se infectaron ratas neutropénicas (3/grupo) mediante provocación intramuscular (IM) con *S. aureus* (ATCC 29213) a una dosis de  $\sim 2 \times 10^6$  cfu/muslo. Después de 2 horas se sacrificó un único grupo de ratas (control temprano (EC)), se les extrajeron los muslos que se homogeneizaron y se sembraron en placas para cuantificar las cargas de *S. aureus*. Las otras ratas infectadas se trataron por sonda oral con vehículo a una dosis de 10 ml/kg (10% de vitamina E/TPGS; control tardío, LC) o compuesto 13 a una dosis de 30, 60 y 100 mg/kg. Los grupos de tratamiento de 8 horas recibieron un único tratamiento (QD), se sacrificaron y se les extrajeron los muslos para determinar las cfu 8 horas post tratamiento (QD), mientras que los grupos de tratamiento de 24 horas recibieron 2 dosis con 12 horas de separación (q12h), se sacrificaron y se les extrajeron los muslos 24 horas post tratamiento. Se determinaron la carga de cada muslo y las cfu/de cada muslo y se resumió la mediana del grupo de 3 ratas para cada grupo.

Resultados: Como se muestra antes en la tabla 9, el compuesto 13 administrado por vía oral mostró eficacia *in vivo* contra el MSSA (SA 29213). Se observaron las diferencias en la magnitud de la actividad antibacteriana entre los tres grupos de tratamiento. A las 8 horas de la primera dosis todos los grupos tuvieron reducciones en las cargas en comparación con el grupo de control emparejado por tiempo, reducción de  $\sim 1.5$  log para el compuesto 13 a la dosis de 10 mg/kg y reducción de  $\sim 1.7$  y 1.8 log para el compuesto 13 a las dosis de 60 y 100 mg/kg. A las 8 horas de la primera dosis, el compuesto 13 a la dosis de 10 mg/kg mantuvo la proliferación bacteriana de SA 29213 hasta al menos el punto de estasis, en tanto el compuesto 13 a las dosis de 60 y 100 mg/kg disminuyó ligeramente la carga bacteriana versus el control temprano en -0.4 y -0.5 logs, respectivamente. Después de 24 horas y la segunda dosis de tratamiento administrada a las 12 horas, se observó una disminución en la densidad bacteriana en comparación con el control temprano de aproximadamente 1 log para el compuesto 13 a las dosis de 60 y 100 mg/kg. En contraste, el compuesto 13 administrado la dosis de 30 mg/kg no pareció eficaz con niveles de cfu variables promediando 0.3 logs más que el control temprano. Sin embargo, todos los niveles de dosis disminuyeron la densidad bacteriana en comparación con el control tardío. Se observó una reducción de  $\sim 1.1$  log para el grupo de tratamiento de 10 mg/kg, mientras que se observó una reducción de 2.85 y -3 logs para los niveles de dosis de 60 y 100 mg/kg.

En resumen las dosis q12h de 60 y 100 mg/kg del compuesto 13 disminuyeron la proliferación bacteriana de SA 29213 en comparación con el grupo de control inicial tanto al tiempo de evaluación de 8 horas como de 24 horas mientras que el tratamiento con 30 mg/kg limitó la proliferación bacteriana a las 8 horas pero fue menos eficaz que los otros grupo de tratamiento a las 24 horas.

Ejemplo 34

Toxicidad oral (sonda) a los 7 días y estudio toxicinético en ratas

## ES 2 545 516 T3

Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar la potencial toxicidad del compuesto 13 y del compuesto 23A cuando se administran por vía oral mediante sonda a ratas machos durante 7 días consecutivos y 2) evaluar la toxicocinética del compuesto 13 y el compuesto 23A después de las primeras siete dosis.

### Animales

#### 5 Especie, procedencia, antecedentes y justificación

Se obtuvieron ratas Crl:CD(SD) de Charles River Laboratories of Stone Ridge, NY. Los animales habían sido criados en el laboratorio y no habían sido utilizados en experimentos. Las ratas se eligieron porque son una especie que se usa comúnmente para evaluaciones de toxicidad no clínicas.

#### Cantidad, sexo, edad e intervalo de peso corporal

10 Se ordenaron cuarenta ratas (20 machos que no tenían cánula y 20 con cánula en la vena yugular). De estos animales, se usaron 15 machos que no tenían cánula y 15 machos que tenían cánula. Los animales tenían una edad tan uniforme como fue posible. Las ratas iban de prepúber a adulto joven, aproximadamente 9 semanas de vida al inicio de la dosificación. La fecha de nacimiento calculada por el proveedor se mantuvo en los registros del estudio. El intervalo de peso de los animales en el momento de ubicarlos en los grupos fue de 218.5-306.3 g.

#### 15 Diseño del estudio

Las ratas fueron asignadas como se muestra en la tabla 10 siguiente. Los animales recibieron el artículo de prueba o vehículo por sonda oral durante 7 días consecutivos y fueron ultimados al día siguiente a completar la dosificación. El primer día de dosificación se designó como día 1 del estudio. Los animales se evaluaron para determinar cambios en los signos clínicos, el peso corporal y otros parámetros como se describe a continuación.

#### 20 Tabla 10 - Asignación de grupo y niveles de dosis

Grupo de dosis	Nº de animales (M) Estudio principal	Nº de animales (M) Toxicocinética	Artículo de prueba	Nivel de dosis (mg/kg/día)	Dosis por día	Concentración de la dosis (mg/mL)	Volumen de la dosis (mL/kg)	Animales para autopsia (día 8)
A	3	0	Vehículo	0	1	0	10	3
B	3	3	Compuesto 13	100	1	10	10	6
C	3	3	Compuesto 13	200	1	20	10	6
D	3	3	Compuesto 23A	100	1	10	10	6
E	3	3	Compuesto 23A	300	2	30	10	6
F	0	3	Vehículo	0	2	0	10	3

### Ruta/Dosis

25 El vehículo y el artículo de prueba se administraron por sonda oral una vez al día durante 7 días consecutivos a un volumen de dosis de 10 mL/kg de peso corporal para el grupo A y los grupos B-D, respectivamente. El artículo de prueba y el vehículo se administraron por sonda oral dos veces por día, con aproximadamente 8 horas de separación, durante 7 días consecutivos a un volumen de dosis de 10 mL/kg de peso corporal para el grupo E y el grupo F, respectivamente. El volumen real administrado a cada animal se calculó y se ajustó basándose en el peso corporal más reciente de cada animal.

### Observaciones en vida y mediciones

#### 30 Observaciones

Los animales se observaron para determinar la viabilidad al menos una vez en la mañana y otra en la tarde, con al menos 4 horas de separación, a lo largo de todo el estudio. Durante el período de tratamiento, las observaciones diarias en el laboratorio se hicieron y se registraron pre dosis y post dosis (sólo luego de la primera dosis). Las observaciones post dosificación hechas durante el tratamiento tuvieron lugar a los tiempos siguientes basándose en  $C_{m\acute{a}x}/T_{m\acute{a}x}$  para los dos componentes de los estudios previos:

- 5
- 1 hora post dosis para los grupos A-F.
  - Una observación de laboratorio se hizo el día de la autopsia.

Observaciones no programadas

- 10
- Todos los hallazgos observados en momentos que no eran los tiempos de observación programados debían ser registrados en una observación no programada o en Provantis; sin embargo, no se observaron anomalías en todo el estudio. Provantis es un sistema electrónico de recolección, manejo e informe de datos que se usa comúnmente en el área.

Pesos corporales

- 15
- Antes de comenzar la dosificación, se midieron los pesos corporales para la distribución aleatoria el día 1. Durante el tratamiento, se midieron los pesos corporales el día 1 y el día 7. Además, se midieron los pesos corporales en ayunas antes de la autopsia para calcular la relación de los pesos órgano/cuerpo.

Consumo de alimentos

A lo largo de todo el estudio, se midió el consumo de alimentos diariamente comenzando 3 días antes de iniciar la dosificación.

- 20
- Evaluación de la patología clínica

- 25
- Se extrajeron muestras de sangre de todos los animales para la evaluación hematológica, de coagulación y parámetros bioquímicos en el suero, del plexo retro-orbital (bajo anestesia con  $CO_2/O_2$ , para los animales del estudio principal) o de la cánula de la vena yugular (para los animales del estudio de toxicocinética) antes de la autopsia. Debido a la heparina residual utilizada para mantener las cánulas permeables para los animales del estudio de toxicocinética, no se pudieron analizar las muestras para coagulación de esas ratas. Los animales se mantuvieron en ayunas toda la noche antes de la extracción de sangre. El día de la extracción de sangre para los análisis de patología clínica, no se hizo la autopsia de los animales hasta después de haber extraído la sangre y que el grupo de patología clínica hubiera jugado si las muestras eran aceptables.

Hematología

- 30
- Se recogió una cantidad apropiada de sangre en tubos que contenían EDTA. Se analizaron los parámetros indicados a continuación en la tabla 11 en las muestras de sangre entera.

Tabla 11 - Parámetros en sangre entera	
Glóbulos rojos (RBC) (recuento y morfología)	Volumen corpuscular medio (MCV)
Glóbulos blancos (WBC) (total y diferencial)	Hemoglobina corpuscular media (MCH)
Concentración de hemoglobina (HGB)	Concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC)
Hematocrito (HCT)	Recuento de plaquetas (PLAT)
Recuento de reticulocitos (ABSRET)	Volumen plaquetario medio (MPV)

Coagulación

- 35
- Se recogió una cantidad apropiada de sangre en tubos que contenían citrato de sodio y después se centrifugó para obtener plasma para la determinación del tiempo de protrombina (PT) y del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT).

Bioquímica sérica

Se recogió una cantidad apropiada de sangre en tubos sin anticoagulante. Se dejó que la mezcla coagulara y después se centrifugó para obtener el suero. Se analizaron los parámetros indicados a continuación en la tabla 12 en el suero.

5

Tabla 12 - Parámetros en el suero

Sodio (NA)	Calcio (CA)
Potasio (K)	Fofo inorgánico (FOS)
Cloruro (CL)	Glucosa (GLU)
Bilirrubina total (TBILI)	Nitrógeno urea (BUN)
Fosfatasa alcalina (ALKP)	Proteína total (TPRO)
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Albumina (ALB)
Aspartato aminotransferasa (AST)	Globulina (GLOB)
Alanina aminotransferasa (ALT)	Relación albúmina/globulina (A/G)
Gamma-glutamilttransferasa (GGT)	Colesterol (CHOL)
Creatina fosfocinasa (CK)	Triglicéridos (TRIG)
Creatinina (CREA)	

## Toxicocinética

5 El 1<sup>er</sup> y el 7<sup>o</sup> día de la dosificación, se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 0.5 mL/muestra) de la cánula de la vena yugular para todos los animales del estudio de toxicocinética, a los tiempos indicados más adelante, en tubos que contenían K<sub>3</sub>EDTA. A los animales del estudio de toxicocinética del grupo de control (grupo F) sólo se les extrajo sangre una vez cada día de extracción, al tiempo 1 hora (luego de la primera administración del día). Antes de cada extracción, se retiraba una pequeña muestra de sangre (con solución de bloqueo de heparina) de la cánula y se desechaba. Se colocaba una nueva jeringa en la cánula y se tomaba la muestra requerida por el protocolo. Se retiraba la jeringa con la muestra de sangre, y se unía a la cánula una nueva jeringa con solución salina. El volumen de sangre era reemplazado con un volumen igual de solución salina y después se colocaba solución de bloqueo en la cánula. Cada animal retornaba a su jaula hasta el nuevo tiempo de extracción.

10 Todas las muestras obtenidas durante este estudio se colocaron en recipientes rotulados. Cada rótulo contenía la información siguiente: 1) Número del estudio, 2) Número del animal, 3) Intervalo de extracción, 4) Grupo y Sexo, y 5) Fecha de la extracción.

15 Las muestras de sangre se mezclaron inmediatamente por inversión, después se colocaron sobre hielo y se centrifugaron en frío (~1500 g, ~10 minutos, ~5 °C) para obtener plasma. El plasma se dividió en una placa de 96 tubos de polipropileno de 1.4 mL con grupo de tapas de TPE certificadamente exentas de ARNasa y ADNasa como alícuotas y se almacenó congelado (≤-70 °C).

20 Tabla 13 - Tiempos de extracción de muestras

Tiempo	Ventana <sup>1</sup>
Predosis	Predosis
1 h	± 4 min
2 h <sup>2</sup>	± 5 min
4 h	± 5 min
8 h <sup>3</sup>	± 5 min

## ES 2 545 516 T3

Tiempo	Ventana <sup>1</sup>
12 h	± 10 min
24 h	± 20 min
48 h <sup>4</sup>	± 40 min

<sup>1</sup> Todas las muestras se extrajeron dentro de la ventana de extracción.

<sup>2</sup> Sólo a continuación de la dosificación del día 1.

<sup>3</sup> Obtenido de los grupos E y F antes de la administración de la dosis PM.

<sup>4</sup> Sólo a continuación de la dosificación del día 7.

### Finalización

5 Ningún animal se consideró moribundo durante el estudio. Todos los animales del estudio fueron sacrificados y sometidos a autopsia luego del número de días de tratamiento prescrito por el protocolo. Todos los animales fueron sacrificados por desangrado (cortando la aorta abdominal mientras se los mantenía bajo anestesia profunda con CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>).

### Autopsia

Se llevó a cabo una autopsia con recolección de tejido en todos los animales sacrificados durante el estudio. La autopsia incluyó el examen de:

- 10 carcasa y aparato locomotor; todas las superficies externas y orificios;  
 cavidad craneal y superficie externa del cerebro;  
 cuello y órganos y tejidos asociados; y  
 cavidades torácica, abdominal y pélvica con sus órganos y tejidos asociados.

Se describieron y registraron todas las anomalías.

### 15 Pesos de los órganos

Para todos los animales sacrificados en las autopsias programadas, se pesaron los riñones, el hígado y la glándula prostática. Luego de pesarlos, se pesó una muestra de aproximadamente 1 gramo de hígado y riñón, se transfirió a tubos de homogeneización de tejido CK28 Precellys de 7 mL (Cat. N° 0904-01), se congelaron inmediatamente y se analizaron.

20 Se calcularon las relaciones órgano/cuerpo usando el peso corporal terminal en ayunas obtenido antes de la autopsia.

### Conservación del tejido y extracción de médula ósea

25 Se extrajeron los tejidos y órganos indicados a continuación en la tabla 14 de todos los animales y se conservaron en formol tamponado neutro al 10% con excepción de los testículos, los epidídimos y los ojos. Los testículos, los epidídimos y los ojos con el nervio óptico unido se fijaron en solución de Davidson modificada durante ~24-48 horas, se enjuagaron con agua y después se transfirieron a formol tamponado neutro al 10% para su almacenamiento.

Tabla 14 - recolección de tejido

Tejido	Sometido a autopsia	Peso del órgano	Histopatología
ID del animal	X		
Glándula suprarrenal (2)	X		



ES 2 545 516 T3

Tejido	Sometido a autopsia	Peso del órgano	Histopatología
Aorta	X		
Arteria mesentérica	X		
Hueso (fémur)	X		
Médula ósea (esternón)	X		
Cerebro	X		
Epidídimos (2)	X		
Esófago	X		
Ojos (2)	X		
Lesiones macroscópicas	X		
Corazón	X		
Intestino, ciego	X		
Intestino, colon	X		
Intestino, duodeno	X		
Intestino, yeyuno	X		
Intestino, íleo	X		
Intestino, recto	X		
Riñones (2)	X	X	X
Hígado		X	X
Pulmones	X		
Ganglio, mandibular	X		
Ganglio, mesentérico	X		
Glándula mamaria	X		
Nervio, óptico	X		
Nervio, ciático	X		
Glándula paratiroides (2) <sup>a</sup>	X		
Páncreas	X		

Tejido	Sometido a autopsia	Peso del órgano	Histopatología
Hipófisis	X		
Próstata		X	X
Vesículas seminales	X		
Musculo esquelético (bíceps femoral)	X		
Piel (abdominal)	X		
Médula espinal, cervical	X		
Médula espinal, torácica	X		
Médula espinal, lumbar	X		
Bazo	X		
Estómago	X		
Testículos (2)	X		
Timo	X		
Glándula tiroides (2) <sup>a</sup>	X		
Lengua	X		
Tráquea	X		
Vejiga urinaria	X		
<sup>a</sup> La tiroides se pesó con la paratiroides unida.			

#### Histopatología

5 Para todos los animales que tenían programada una autopsia terminal, los riñones, el hígado y la próstata se incorporaron en parafina, se cortaron y tiñeron con hematoxilina y eosina para el examen posterior por microscopía de luz. Para los grupos A, D, E y F, solamente, los tejidos restantes indicados antes se incorporaron en parafina, se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina para el examen posterior por microscopía de luz.

#### Análisis Estadístico

Cuando correspondió, los datos numéricos de los animales se evaluaron estadísticamente.

10 Para las estadísticas comparativas, el grupo A (grupo de control) se comparó con los grupos B y C (grupos tratados, dosificados QD) y el grupo F (grupo de control, dosificado BID) se comparó con el grupo E (grupo tratado, dosificado BID). Los datos se evaluaron usando la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas y la prueba de Shapiro-Wilks para normalidad de distribuciones, con significación a  $p \leq 0.05$ . Los datos que se determinó que eran homogéneos y de distribución normal se evaluaron por el análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA verificó significación a  $p \leq 0.05$ , se hicieron verificaciones de a pares de cada grupo tratado con el respectivo grupo de control usando una prueba paramétrica (prueba de Dunnett) para identificar las diferencias estadísticas ( $p \leq 0.05$ ).

15 Los datos que se determinó que no eran homogéneos o no tenían una distribución normal se evaluaron usando una prueba de Kruskal-Wallis para la significación del factor de grupo. Cuando existió significación ( $p \leq 0.05$ ) entre grupos, se usó una prueba no paramétrica (Wilcoxonwith Bonferroni-Holm), para comparar los grupos de tratamiento con el grupo de control. Los datos de consumo de alimentos de los animales en los que hubo reguero se excluyeron

del período de tiempo aplicable. Las estadísticas comparativas de los datos de consumo de alimentos se limitaron a la prueba de Dunnett (paramétrica). No se realizaron estadísticas sobre el consumo de alimentos antes de la prueba (día 4 a día 1).

5 ResultadosLas exposiciones para diferentes niveles de dosificación de compuesto 23A y compuesto 13 estuvieron relacionadas a la dosis. No hubo observaciones ni efectos adversos sobre el peso corporal medio en los animales tratados con compuesto 13 o compuesto 23A. El consumo de alimentos promedio se redujo durante diferentes intervalos del estudio para animales tratados una vez al día con compuesto 13 (100 o 200 mg/kg) y 2 veces al día con compuesto 23A (300 mg/kg). Sin embargo, como la disminución del consumo de alimentos no estaba correlacionada con los cambios en el peso corporal en los grupos del compuesto 13 y el compuesto 23A, estos efectos no se consideraron adversos ni biológicamente significativos. La concentración media de ion calcio (CA) fue estadísticamente inferior, mientras que las medias de ALT y de AST para el grupo de ratas que recibió 300 mg/kg de compuesto 23A dos veces al día fueron estadísticamente superiores cuando se las comparó con los controles tratados dos veces al día. No se observaron hallazgos histopatológicos relacionados con el artículo de prueba para animales que recibieron el compuesto 13 o el compuesto 23A a ningún régimen de dosificación.

15 Dentro del alcance de este estudio y basándonos en la ausencia de cambios en el peso corporal, la patología clínica y la histopatología, el nivel sin efecto observable (NOEL) para el compuesto 13 administrado a ratas machos una vez al día durante 7 días por sonda oral fue de 200 mg/kg (844  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  día 7 AUC), mientras que el NOEL para el compuesto 23A administrado una vez al día fue de 100 mg/kg (82  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  AUC). El NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) para el compuesto 23A administrado a ratas machos dos veces al día durante 7 días por sonda oral fue de 300 mg/kg (291  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  AUC).

Por consiguiente, los compuestos 13 y 23A no demostraron toxicidad adversa dentro del alcance del estudio y a niveles de dosis hasta 200 mg/kg/día y 600 mg/kg/día, respectivamente.

#### Ejemplo 35

Un estudio de toxicocinética y de toxicidad en un intervalo oral en monos cangrejeros machos

25 Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar la potencial toxicidad del compuesto 23 cuando se administra por vía oral mediante sonda a monos cangrejeros machos durante 7 días consecutivos y 2) evaluar la toxicocinética del compuesto 23 después de las primeras siete dosis.

#### Animales

Especie, procedencia, antecedentes y justificación

30 Se obtuvieron monos cangrejeros (*Macaca Fascicularis*) de Primus Bio-Resources Inc. of PinCourt, Quebec, Canadá. Los monos cangrejeros se eligieron porque son una especie no roedora que se usa comúnmente para evaluaciones de toxicidad no clínicas.

Cantidad, sexo, edad e intervalo de peso corporal

35 Se usaron ocho machos (2 que no habían tenido contacto previo con el compuesto y 6 que sí) en el estudio. Los animales eran adultos jóvenes y pesaban entre 2 y 4 kg al inicio de la dosificación.

#### Diseño del estudio

40 Los animales se asignaron como se muestra en la tabla 15 siguiente. Los animales recibieron el compuesto 23 o vehículo por sonda oral durante 7 días consecutivos y fueron sacrificados al día siguiente a completar la dosificación. El primer día de dosificación se designó como día 1 del estudio. El volumen real administrado a cada animal se calculó y se ajustó basándose en el peso corporal más reciente de cada animal.

Tabla 15 - Asignación de grupo y niveles de dosis

Grupo	Nivel de dosis (mg/kg)	Concentración de la dosis (mg/mL)	Volumen de la dosis (mL/kg)	Número de animales
1	Control*	0	5	2
2	50	10	5	2
3	100	20	5	2
4	200	40	5	2

## ES 2 545 516 T3

Grupo	Nivel de dosis (mg/kg)	Concentración de la dosis (mg/mL)	Volumen de la dosis (mL/kg)	Número de animales
*Los animales de control recibieron el control/vehículo (20% de captisol/1% de HPMCAS/1% de PVP en tampón de KCl 0.01 M/HCl) solo				

### Observaciones en vida y mediciones

#### Observaciones

5 Se registraron los signos clínicos observados en el laboratorio (enfermedad, cambios en el comportamiento etc.) al menos una vez al día durante el estudio.

#### Pesos corporales

Se registraron los pesos corporales para todos los animales antes de la asignación al grupo y los días 1 (antes de la dosificación), 3 y 7 así como terminalmente antes de la autopsia (en ayunas).

#### Electrocardiografía (ECG)

10 Se obtuvieron electrocardiogramas (derivaciones bipolares de las extremidades I, II y III, y derivaciones unipolares aumentadas aVR, aVL aVF) para todos los monos una vez durante el período de pretratamiento y nuevamente el día 7 (post dosificación).

15 Se evaluaron los trazados en busca de cambios groseros indicativos de disfunción eléctrica cardíaca. Se determinó la posible presencia de anomalías en la frecuencia cardíaca (derivación II) el ritmo sinusal y atrioventricular o la conductividad. Se midieron los valores de frecuencia cardíaca, intervalo PR, duración de QRS, intervalos QT y QTc.

#### Toxicocinética

20 Se extrajo una serie de 7 muestras de sangre (de aproximadamente 0.5 mL cada una) de cada uno de los monos los días 1 y 7 a los tiempos siguientes: predosis, 30 minutos y 2, 3, 6, 12 y 24 horas post dosis. Con este fin, cada mono se sangró por venopunción y las muestras se recogieron en tubos que contenían el anticoagulante, K<sub>2</sub>EDTA. Los tubos se colocaron en hielo hasta que estuvieron prontos para ser procesados.

#### Patología clínica

Se realizaron investigaciones de laboratorio (hematología, coagulación, bioquímica clínica y análisis de orina) en todos los animales antes del comienzo del tratamiento y antes de la finalización el día 8.

25 Se extrajeron muestras de sangre por venopunción luego de un período de una noche de privación de alimentos que consistió en al menos 12 horas pero no más de 20 horas. Se recogió orina para análisis de los animales privados de alimentos y agua toda la noche (al menos 12 horas pero no más de 20 horas).

#### Hematología

30 Se midieron los parámetros siguientes en las muestras de sangre recogidas en anticoagulante EDTA: recuento de glóbulos rojos, hemoglobina corpuscular media (calculada), hematocrito (calculado), volumen corpuscular medio, hemoglobina, morfología de las células, recuento de glóbulos blancos, recuento de plaquetas, diferencial de glóbulos blancos (absoluto), reticulocitos (absoluto y porcentaje) y concentración de hemoglobina corpuscular media (calculada).

#### Coagulación

35 Se midieron el tiempo parcial de tromboplastina activada y el tiempo de protrombina en las muestras de sangre recogidas en anticoagulante citrato.

#### Bioquímica clínica

40 Se midieron los parámetros siguientes en las muestras de sangre recogidas en tubos que contenían activador de la coagulación: relación a/g (calculada), creatinina, alanina aminotransferasa, globulina (calculada), albúmina, glucosa, fosfatasa alcalina, fósforo (inorgánico), aspartato aminotransferasa, potasio, bilirrubina (total), sodio, calcio proteína total, cloruro, triglicéridos, colesterol (total), urea, gamma-glutamilttransferasa y sorbitol deshidrogenasa.

#### Análisis de orina

## ES 2 545 516 T3

Se midieron los parámetros siguientes en las muestras de orina: bilirrubina, proteína, sangre, microscopía del sedimento, color y aspecto, densidad relativa, glucosa, urobilinógeno, cetonas, volumen y pH.

### Finalización

- 5 Todos los animales fueron sacrificados al completarse el período de tratamiento el día 8 luego de una noche sin alimento. Los monos fueron anestesiados previamente con ketamina y luego sacrificados con una sobredosis intravenosa de pentobarbital sódico seguida de desangrado por corte de vasos sanguíneos principales.

### Autopsia

Se llevó a cabo una autopsia con recolección de tejidos en todos los animales sacrificados durante el estudio. La autopsia incluyó el examen de:

- 10 carcasa y aparato locomotor;  
todas las superficies externas y orificios;  
cavidad craneal y superficie externa del cerebro;  
cuello y órganos y tejidos asociados; y  
cavidades torácica, abdominal y pélvica con sus órganos y tejidos asociados.
- 15 Se describieron y registraron todas las anomalías.

### Conservación de los tejidos

Al completarse el examen macroscópico y el pesaje de los órganos elegidos, los tejidos y los órganos se mantuvieron como se indica a continuación en la tabla 16. Se usó formol tamponado neutro al 10% para la fijación y la conservación a menos que se indique lo contrario.

20 Tabla 16. Retención de tejidos y órganos

ÓRGANOS/TEJIDOS	Retenciones (•)	Peso (√)	Examen (€)	ÓRGANOS/TEJIDOS	Retain(•)	Peso (√)	Examen (€)
Suprarrenales	•	√	€	Hipófisis	•	√	€
Identificación del animal	•			Próstata	•	√	€
Aorta (torácica)	•		€	Recto	•		€
Sangre				Glándula salival, mandibular	•		€
Frotis de médula ósea (3)	•			Nervio ciático	•		€
Cerebro	•	√	€	Vesículas seminales	•		€
Ciego	•		€	Músculo esquelético	•		€
Colon	•		€	Piel y tejido subcutáneo (torácicos)	•		€
Epidídimos	•d		€	Duodeno	•		€
Esófago	•		€	Yeyuno	•		€
Ojos	•a		€	Íleo	•		€

ES 2 545 516 T3

ÓRGANOS/TEJIDOS	Retenciones (•)	Peso (√)	Examen (€)	ÓRGANOS/TEJIDOS	Retain(•)	Peso (√)	Examen (€)
Fémur y médula	•		€	Médula espinal, cervical	•		€
Vesícula biliar	•		€	Bazo	•	√	€
Corazón	•	√	€	Esternón y médula	•		€
Riñones	•	√	€	Estómago	•		€
Hígado (2 lóbulos)	•	√	€	Testículos	•d	√	€
Pulmones (2 lóbulos)	•b	√c	€	Timo	•	√	€
Ganglio, mandibular	•		€	Glándula tiroides/paratiroides	•	√	€
Ganglio, mesentérico	•		€	Lengua	•		€
Glándula mamaria (torácica)	•		€	Tráquea	•c		€
Nervios ópticos	•a		€	Vejiga urinaria	•		€
Páncreas	•		€	Hallazgos anormales	•		
a	Líquido de Davidson usado para fijación y conservación						
b	Los pulmones se infundieron con formol tamponado neutro al 10% usado para fijación y conservación						
c	Los pulmones se pesaron con la tráquea						
d	Líquido de Bouin usado para fijación y conservación						
€	Examinado microscópicamente						

Histopatología

Para todos los animales, todos los tejidos indicados antes se incorporaron en parafina, se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron por microscopía de luz.

5 Resultados

Las exposiciones para diferentes niveles de dosificación del compuesto 23 estuvieron relacionadas a la dosis.

No hubo signos clínicos, ni cambios en los pesos corporales, parámetros electrocardiográficos, parámetros de patología clínica, o peso de órganos que pudieran ser atribuidos a la administración del compuesto 23 a dosis hasta 200 mg/kg/día. Análogamente, no hubo hallazgos macroscópicos ni microscópicos que pudieran atribuirse claramente a la administración del compuesto 23 a dosis hasta 200 mg/kg/día. Se determinó que el nivel sin efecto observable (NOEL) para el compuesto 23 en monos cangrejeros machos era de 200 mg/kg/día.

Ejemplo 36

Estudios fármacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos de los compuestos elegidos de esta invención se determinaron en los experimentos que se describen a continuación. Se emplearon los procedimientos analíticos generales y los protocolos experimentales específicos de la manera siguiente:

Procedimientos analíticos generales

5 Se emplearon los procedimientos analíticos generales siguientes en los experimentos farmacocinéticos descritos a continuación:

10 Análisis de la muestra. Se determinaron las concentraciones plasmáticas del compuesto 23 y el compuesto W usando el método de cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas en tándem (HPLC/MS/MS). Antes de la extracción, las muestras de plasma se diluyeron usando blanco de plasma 2, 4, 5 o 10 veces, según fuera necesario, dependiendo del nivel de dosis o la formulación. El compuesto 23 y el compuesto W junto con el estándar interno (IS) se extrajeron del plasma (diluido), 100 µL de cada uno, por precipitación directa de proteína con acetonitrilo (relación plasma/acetonitrilo de 1:4). Después de la centrifugación, se inyectó el extracto del sobrenadante (10 µL) en el sistema LC/MS/MS. El sistema de HPLC incluyó una columna Waters Xterra MS C18, de 5 micrómetros, 2.1 mm de diámetro x 50 mm de longitud que se eluyó con un gradiente de fase móvil que consistía en ácido fórmico al 0.1% en agua o acetonitrilo.

15 Los analitos se detectaron por MS/MS con ionización química a presión atmosférica (APCI) en el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue de 1, 2, 4, 5, 10 o 20 ng/mL, dependiendo del factor de dilución de la muestra. El intervalo lineal del ensayo fue de 1 a 5000 ng/mL. La precisión del ensayo dentro del día y entre días estuvo dentro del 2% de los valores nominales. La variabilidad dentro del día y entre días fue <10%.

20 Las muestras de la formulación de dosis en suspensión del compuesto W se analizaron con un método HPLC/UV después de una dilución de 10 veces a 500 o 1000 veces con DMSO:acetonitrilo:agua (33:33:33) dependiendo del nivel de dosis o la formulación. Las muestras de la dosis de la formulación en solución del compuesto W se analizaron con un método HPLC/UV después de una dilución de 10 veces, 50 veces, 100 veces o 500 veces con DMSO:agua (50:50) dependiendo del nivel de dosis o la formulación.

Análisis de los datos farmacocinéticos. Los perfiles de concentración plasmática-tiempo del compuesto 23 y el compuesto W se analizaron por métodos farmacocinéticos no compartimentales usando el software WinNonlin® edición profesional, versión 5.1.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

30 Los parámetros farmacocinéticos clave incluyeron AUC<sub>todos</sub>, AUC<sub>extrap</sub>, C<sub>máx</sub>, t<sub>máx</sub>, Se determinaron CI<sub>obs</sub>, V<sub>ss</sub><sub>obs</sub> y t<sub>1/2</sub>.

Análisis de los datos estadísticos. Se calcularon los datos estadísticos descriptivos de las concentraciones plasmáticas y los estimados de los parámetros farmacocinéticos, incluyendo la media, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (% CV) usando el software WinNonlin, versión 5.1.1 o Microsoft Excel 2000.

Estudio oral en monos

35 Se administró a monos cangrejeros (n = 3 por grupo de dosis) dosis PO nominales de 3, 30 y 300 mg/kg del compuesto W por sonda. El compuesto W se formuló en 0.5% de MC (celulosa microcristalina). Los animales tuvieron libre acceso a alimento y agua, antes y después de la dosificación.

40 Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 0.25 mL cada vez) a través de un catéter en la arteria carótida antes de la dosificación y 0 (predosis), 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas post dosis. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo que se mantuvo en hielo y que contenía EDTA potásico como anticoagulante. El plasma se separó y se almacenó a aproximadamente a -70 °C hasta su análisis.

45 La muestras de plasma se analizaron usando un método de cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) para determinar las concentraciones del compuesto 23 y el compuesto W, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 1 a 20 ng/mL, dependiendo del factor de dilución de la muestra. Los datos de concentración plasmática versus tiempo se sometieron a análisis farmacocinético (PK) no compartimental. Los resultados de este análisis se proporcionan en la tabla 17.

Tabla 17. Datos farmacocinéticos del estudio oral en monos

Dosis (mg/kg)	Ruta	Formulación	Analito	C <sub>máx</sub> (µg/ml)	AUC (µg* h/ml)	AUC <sub>extrap</sub> (µg* h/ml)	T <sub>máx</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)
30	PO	0.5% de MC	Compuesto 23	14.4	24.7	24.8	1.7	13.9

## ES 2 545 516 T3

Dosis (mg/kg)	Ruta	Formulación	Analito	C <sub>máx</sub> (µg/ml)	AUC (µg* h/ml)	AUC <sub>extrap</sub> (µg* h/ml)	T <sub>máx</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)
100	PO	0.5% de MC	Compuesto 23	20.9	76.7	76.9	2.3	8.3
300	PO	0.5% de MC	Compuesto 23	23.8	155.1	155	1.2	5.6
30	PO	0.5% de MC	Compuesto W	0.0264	0.0453	0.206	0.83	-
100	PO	0.5% de MC	Compuesto W	0.322	0.432	0.437	0.67	5.31
300	PO	0.5% de MC	Compuesto W	4	3.69	3.76	0.58	13.15

### Estudio IV en monos

Se administró a monos cangrejeros machos (n = 3 por grupo de dosis) una única dosis en bolo IV nominal de 1 mg/kg del compuesto W a través de una cánula en la vena yugular. El compuesto W se formuló en D5W (5% de dextrosa en solución acuosa). Los animales tuvieron libre acceso a alimento y agua, antes y después de la dosificación.

Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 0.25 mL cada vez) a través de un catéter en la arteria carótida antes de la dosificación y 0 (predosis), 5 min, 10 min, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas post dosis. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo que se mantuvo en hielo y que contenía EDTA potásico como anticoagulante. El plasma se separó y se almacenó a aproximadamente a -70 °C hasta su análisis.

Las muestras de plasma se analizaron usando un método de cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) para determinar las concentraciones del compuesto 23 y el compuesto W, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 1 a 20 ng/mL, dependiendo del factor de dilución de la muestra. Los datos de concentración plasmática versus tiempo se sometieron a análisis farmacocinético (PK) no compartimental. Los resultados de este análisis se proporcionan en la tabla 18.

Tabla 18. Datos farmacocinéticos del estudio IV en monos

Dosis (mg/kg)	Ruta	Formulación	Analito	C <sub>0</sub> (µg/ml)	AUC (µg*h/ml)	AUC <sub>extrap</sub> (µg*h/ml)	Cl (ml/min/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	V <sub>ss</sub> (L/kg)
5	IV	D5W	Compuesto 23	10.9	3.78	3.81	23.4	6.17	2.09
5	IV	D5W	Compuesto W	62.4	5.79	5.83	18.2	5.35	1.88

### Estudio oral en ratas

Se administró a grupos de ratas machos Sprague Dawley (n = 3 por grupo de dosis) dosis orales únicas nominales de 3, 10, 30 y 300 mg/kg del compuesto W por sonda. El compuesto W se formuló en 0.5% de MC (celulosa microcristalina) o en 20% de Captisol, 1% de HPMC-AS (acetil succinato de hidroxipropilmetilcelulosa), 1% de PVP (polivinilpirrolidona). Los animales tuvieron libre acceso a alimento y agua antes y después de la dosificación. Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 0.25 mL cada vez) a través de un catéter en la arteria carótida antes de la dosificación y 0 (predosis), 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas post dosis. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo que se mantuvo en hielo y que contenía EDTA potásico como anticoagulante. El plasma se separó y se almacenó a aproximadamente a -70 °C hasta su análisis.

Las muestras de plasma se analizaron usando un método de cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) para determinar las concentraciones del compuesto 23 y el compuesto W, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 1 a 20 ng/mL, dependiendo del factor de dilución de la muestra. Los datos de concentración plasmática versus tiempo se sometieron a análisis farmacocinético (PK) no compartimental. Los resultados de este análisis se proporcionan en la tabla 19.

Tabla 19. Datos farmacocinéticos del estudio oral en ratas



## ES 2 545 516 T3

Dosis (mg/kg)	Formulación	Analito	C <sub>máx</sub> /C <sub>0</sub> (µg/ml)	AUC (µg*h/ml)	AUC <sub>extrap</sub> (µg*h/ml)	T <sub>máx</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)
3	0.5% de MC	Compuesto 23	0.117	0.311	0.314	0.58	4.06
30	0.5% de MC	Compuesto 23	2.9	22.5	22.6	1.7	2.6
100	0.5% de MC	Compuesto 23	6.6	77.1	77.4	2.5	2.7
300	0.5% de MC	Compuesto 23	11.7	222.8	307.6	-	17.9
300	20% de CAPT, 1% de HPMC-AS, 1% de PVP	Compuesto 23	16.2	294.6	-	5	-
3	0.5% de MC	Compuesto W	-	-	-	-	-
30	0.5% de MC	Compuesto W	0.022	0.178	0.058	3.3	3.1
100	0.5% de MC	Compuesto W	0.021	0.061	0.066	0.8	7.2
300	0.5% de MC	Compuesto W	2.33	0.324	0.464	1.2	11.3
300	20% de CAPT, 1% de HPMC-AS, 1% de PVP	Compuesto W	0.6	2.37	4.27	1.8	-

### Estudio IV en ratas

5 Se administró a grupos de ratas machos Sprague Dawley (n = 3 por grupo de dosis) dosis únicas en bolo IV nominales de 1 y 5 mg/kg del compuesto W a través de una cánula en la vena yugular. El compuesto W se formuló en D5W. Los animales tuvieron libre acceso a alimento y agua, antes y después de la dosificación. Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 0.25 mL cada vez) a través de un catéter en la arteria carótida antes de la dosificación y 0 (predosis), 5 min, 10 min, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas post dosis. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo que se mantuvo en hielo y que contenía EDTA potásico como anticoagulante. El plasma se separó y se almacenó a aproximadamente a -70 °C hasta su análisis.

10 Las muestras de plasma se analizaron usando un método de cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) para determinar las concentraciones del compuesto 23 y el compuesto W, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 1 a 20 ng/mL, dependiendo del factor de dilución de la muestra. Los datos de concentración plasmática versus tiempo se sometieron a análisis farmacocinético (PK) no compartimental. Los resultados de este análisis se proporcionan en la tabla 20.

15 **Tabla 20. Datos fármacocinéticos del estudio IV en ratas**

Dosis (mg/kg)	Formulación	Analito	C <sub>máx</sub> /C <sub>0</sub> (µg/ml)	AUC (µg*h/ml)	AUC <sub>extrap</sub> (µg*h/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	Cl <sub>obs</sub> (ml/min/kg)	V <sub>ss_obs</sub> (L/kg)
1	D5W	Compuesto 23	0.247	0.306	0.31	1.8	54.9	3.8
5	D5W	Compuesto 23	1.2	3.04	3.06	3.6	27.3	4.08
1	D5W	Compuesto W	4.8	0.416	0.419	0.9	46.7	0.38
5	D5W	Compuesto W	9.03	1.11	1.12	7.2	84.6	5.8

## Estudio oral en ratones

5 Se administró a grupos de ratones hembras CD-1 (n = 3 por grupo de dosis) dosis orales únicas nominales de 10, 30 y 100 mg/kg del compuesto W por sonda. El compuesto W se formuló en 0.5% de MC. Los animales tuvieron libre acceso a alimento y agua, antes y después de la dosificación. Se extrajeron muestras de sangre (aproximadamente 0.25 mL cada vez) de la vena submandibular antes de la dosificación y 0 (predosis), 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas post dosis. Cada muestra de sangre se recogió en un tubo que se mantuvo en hielo y que contenía EDTA potásico como anticoagulante. El plasma se separó y se almacenó a aproximadamente a -70 °C hasta su análisis.

10 Las muestras de plasma se analizaron usando un método de cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 1 a 20 ng/mL, dependiendo del factor de dilución de la muestra. Los datos de concentración plasmática versus tiempo se sometieron a análisis farmacocinético (PK) no compartimental. Los resultados de este análisis se proporcionan en la tabla 21.

Tabla 21. Datos farmacocinéticos del estudio oral en ratones

Dosis (mg/kg)	Formulación	AUC (0-t) (µg*h/mL)	C <sub>máx</sub> (µg*h/ml)	T <sub>máx</sub> (h)
10	0.5% de MC	1.7	1.2	0.3
30	0.5% de MC	4.1	2.1	0.3
100	0.5% de MC	26.6	9.1	0.4

15 Los estudios descritos antes, demuestran que el compuesto W se convierte *in vivo* en el compuesto 23 al menos en ratas, perros y monos.

## Ejemplo 37

## Estudios de enzimología

20 Las actividades de inhibición enzimática de los compuestos elegidos de esta invención se determinaron en los experimentos que se describen a continuación.

## Ensayo de ADN girasa ATPasa

La actividad de hidrólisis del ATP de la ADN girasa de *S. aureus* se midió acoplado la producción de ADP a través de la piruvato cinasa/lactato deshidrogenasa a la oxidación de NADH. Este método fue descrito previamente (Tamura y Gellert, 1990, J. Biol. Chem., 265, 21342).

25 Los ensayos de ATPasa se llevaron a cabo a 30 °C en soluciones tamponadas que contenían TRIS 100 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM y KCl 150 mM. El sistema de acoplamiento contenía concentraciones finales de fosfoenolpiruvato de 2.5 mM, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) 200 µM, DTT 1 mM, 30 µg/ml de piruvato cinasa, y 10 µg/ml de lactato deshidrogenasa. Se agregaron la enzima (concentración final 90 nM) y una solución de DMSO (concentración final de 3%) del compuesto elegido. La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a 30 °C. La reacción se inició por adición de ATP hasta una concentración final de 0.9 mM, y la velocidad de desaparición de NADH se monitoreó a 340 nm en el transcurso de 10 minutos. Se determinaron los valores de K<sub>i</sub> y IC<sub>50</sub> de los perfiles de velocidad versus concentración.

30 Se encontró que los compuestos elegidos de la presente invención inhibían la ADN girasa de *S. aureus*. La tabla 22 muestra la actividad inhibitoria de estos compuestos en el ensayo de inhibición de la ADN girasa B *S. aureus*.

35 Tabla 22. Inhibición de la ADN girasa de *S. aureus*

Compuesto elegido	K <sub>i</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (µM)
Compuesto 23	9	
Compuesto W	< 9	54

## Ensayo de ADN topo IV ATPasa

La conversión de ATP en ADP por la enzima Topo IV de *S. aureus* se acopló a la conversión de NADH en NAD<sup>+</sup>, y el progreso de la reacción se midió por el cambio en la absorbancia a 340 nm. Se incubó Topo IV (64 nM) con el compuesto elegido (al 3% en DMSO final) en tampón durante 10 minutos a 30 °C. El tampón consistió en Tris 100 mM 7.5, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, K•Glutamato 200 mM, fosfoenolpiruvato 2.5 mM, NADH 0.2 mM, DTT 1 mM, 5 µg/mL de ADN lí nos uno débito de visón nealizado, 50 µg/mL de BSA, 30 µg/mL de piruvato cinasa, y 10 µg/mL de lactato deshidrogenasa (LDH). La reacción se inició con ATP, y las velocidades se monitorearon continuamente durante 20 minutos a 30 °C en un lector de placas SpectraMAX de Molecular Devices. La constante de inhibición, K<sub>i</sub>, y la IC<sub>50</sub> se determinaron de los gráficos de velocidad versus concentración del compuesto elegido ajustado por la ecuación de Morrison para inhibidores unidos estrechamente.

Se encontró que los compuestos elegidos de la presente invención inhibían la Topo IV de *S. aureus*. La tabla 23 muestra la actividad inhibitoria de estos compuestos en el ensayo de inhibición de la ADN girasa B de *S. aureus*.

Tabla 23. Inhibición de la Topo IV de *S. aureus*

Compuesto elegido	K <sub>i</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (µM)
Compuesto 23	12	
Compuesto W	30	150

## Ejemplo 38

## Estudio de solubilidad acuosa

La solubilidades acuosas del compuesto 23 y el compuesto W se determinaron según el procedimiento siguiente.

Preparación de las muestras. Se prepararon muestras acuosas de cada compuesto de la manera siguiente. Los compuestos se pesaron (20 – 30 mg de compuesto) en viales transparentes de 4 ml antes de agregar agua (0.5 mL) y agitar con un agitador magnético. Se agregó HCl 1.0 N a la suspensión para ajustar el pH al intervalo deseado. Después de agitar durante 96 horas a temperatura ambiente, la suspensión se filtró a través de un filtro de 0.22 micrómetros (Millipore, filtros de centrifuga Ultrafree, Durapore PVDF 0.22 µm, Cat N° UFC30GVNB). El filtrado se recogió y se midió el pH con un pHímetro. El filtrado que contenía el compuesto W se diluyó 10 veces para proporcionar una concentración adecuada para el análisis por HPLC. El filtrado que contenía compuesto 23 no requirió dilución.

Preparación de las soluciones estándar. Se prepararon soluciones estándar de cada compuesto según el procedimiento siguiente. Se pesaron con exactitud 1 a 2 mg de cada compuesto en un matraz volumétrico de 10 mL y se agregó agua (para el compuesto W) o metanol:HCl 0.1 N 1:1 (para el compuesto 23) para disolver completamente los compuestos. Se sometió a ultrasonido el compuesto 23 para ayudar a la disolución en metanol:HCl 0.1 N 1:1. Cuando todos los sólidos se disolvieron, se agregó solvente adicional para ajustar el volumen de cada solución a 10 ml. Las soluciones resultantes se mezclaron bien para dar las soluciones estándar de cada compuesto. Cada solución estándar se diluyó después con solvente 2 veces, 10 veces y 100 veces.

Análisis de solubilidad. Se analizaron alícuotas de cada muestra y de cada solución estándar por análisis de HPLC (Agilent 1100, volumen de inyección 10 µL, longitud de onda 271 nm, columna XTerra® Phenyl de 5 µm, de 4.6 x 50 mm, N° de pieza. 186001144, fase móvil: A: 0.1% de TFA en agua 0.1 % de TFA en AcN). Cada solución estándar se inyectó tres veces y cada una de las muestras se inyectó dos veces. Se obtuvieron las curvas estándar graficando el promedio del área del pico de HPLC en función de las concentraciones de las soluciones estándar (con las correcciones apropiadas de los pesos de los estándares basándose en el contenido total de agua del sólido determinado por análisis elemental). La concentración de cada muestra se calculó a partir del área del pico de la muestra acuosa de los resultados de HPLC y la pendiente y la intersección de las curvas estándar. Los valores de solubilidad indicados en la tabla 24 siguiente se derivaron del producto de la concentración de la muestra y el factor de dilución de la muestra.

Tabla 24. Solubilidad acuosa de los compuestos 23 y W

Compuesto	Forma sólida	pH	Solubilidad (mg/ml)
Compuesto 23	crystalina	> 3.0	< 0.001

## ES 2 545 516 T3

Compuesto	Forma sólida	pH	Solubilidad (mg/ml)
Compuesto W	cristalina	4.39	0.25

### Ejemplo 39

Estudio del metabolismo in vivo en células hepáticas y de hígado s9

5 La conversión del compuesto W en el compuesto 23 se estudió en fracciones S9 de hígado e intestinales de ratas, perros, monos y humanos. El compuesto W se incubó a 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 20, 40, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$  en fracciones S9 de hígado y a 1, 3, 10, 20, 100, 300, 500, 1000  $\mu\text{M}$  en fracciones S9 intestinales. Las incubaciones se hicieron durante 0, 5, 10, 15, 30, 45 o 60 minutos. La formación del compuesto 23 se cuantificó por LC/MS-MS y los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis Menten. Los datos de la tabla 25 siguiente indican que el compuesto W se convierte rápidamente en el compuesto 23 en esta fracciones S9 hepáticas e intestinales.

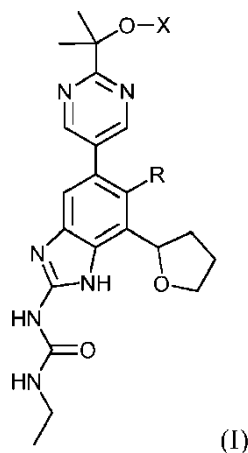
10 Tabla 25. Velocidad de formación ( $V_{\text{MÁX}}$ ) del compuesto 23 a partir del compuesto W en S9 de hígado e intestinales

	$V_{\text{MÁX}}$ (hígado) (pmoles/min/mg)	$V_{\text{MÁX}}$ (intestino) (pmoles/min/mg)
Perro	19.3	1162
Mono	25.2	1974
Rata	45.5	958
Humana	45.8	<i>ND*</i>

\*ND: Los parámetros no se determinaron, la velocidad de formación no saturó

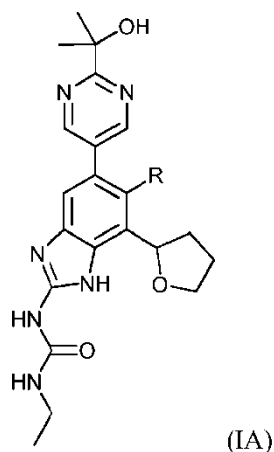
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



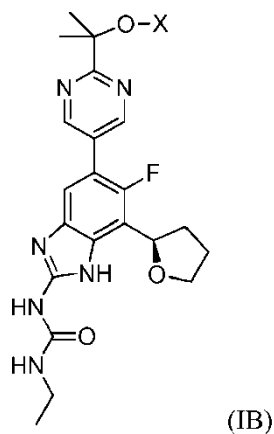
5 donde R es hidrógeno o flúor; X es hidrógeno,  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ ,  $-\text{PO}(\text{OH})\text{O}-\text{M}^+$ ,  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2\cdot 2\text{M}^+$  o  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2\cdot \text{D}^{2+}$ ;  $\text{M}^+$  es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable; y  $\text{D}^{2+}$  es un catión divalente farmacéuticamente aceptable; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



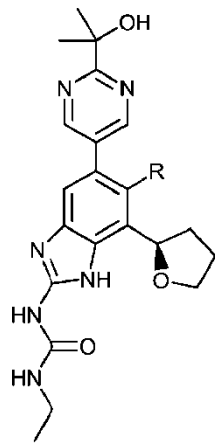
10 donde R es hidrógeno o flúor; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



donde X es  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ ,  $-\text{PO}(\text{OH})\text{O}^-\text{M}^+$ ,  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2\cdot 2\text{M}^+$  o  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2\cdot \text{D}^{2+}$ ;  $\text{M}^+$  es un catión monovalente farmacéuticamente aceptable; y  $\text{D}^{2+}$  es un catión divalente farmacéuticamente aceptable; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



(IC)

donde R es hidrógeno o flúor; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, donde el compuesto es (R)-1-etil-3-(5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o donde el compuesto es (R)-1-etil-3-(6-fluoro-5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

6. La sal de acuerdo con la reivindicación 4, donde la sal es una sal del ácido metanosulfónico de (R)-1-etil-3-(5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea o donde la sal es una sal del ácido metanosulfónico de (R)-1-etil-3-(6-fluoro-5-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)pirimidin-5-il)-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-2-il)urea.

7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde X es  $-\text{PO}(\text{OH})\text{O}^-\text{M}^+$ ,  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2\cdot 2\text{M}^+$  o  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2\cdot \text{D}^{2+}$ ;  $\text{M}^+$  se elige del grupo que consiste en  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , N-metil-D-glucamina y  $\text{N}(\text{R}^9)_4^+$ , donde cada  $\text{R}^9$  es independientemente hidrógeno o un grupo  $\text{C}_1\text{-C}_4$  alquilo;  $\text{D}^{2+}$  se elige del grupo que consiste en  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ .

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, donde X es  $-\text{PO}(\text{OH})\text{O}^-\text{M}^+$  o  $-\text{PO}(\text{O}^-)_2\cdot 2\text{M}^+$ ;  $\text{M}^+$  se elige del grupo que consiste en  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , N-metil-D-glucamina y  $\text{N}(\text{R}^9)_4^+$ , donde cada  $\text{R}^9$  es independientemente hidrógeno o un grupo  $\text{C}_1\text{-C}_4$  alquilo.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, donde X es  $-\text{PO}(\text{OH})\text{O}^-\text{M}^+$ ;  $\text{M}^+$  se elige del grupo que consiste en  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , N-metil-D-glucamina y  $\text{N}(\text{R}^9)_4^+$ , donde cada  $\text{R}^9$  es independientemente hidrógeno o un grupo  $\text{C}_1\text{-C}_4$  alquilo.

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde el compuesto es (R)-2-(5-(2-(3-etilureido)-6-fluoro-7-(tetrahidrofuran-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-il)pirimidin-2-il)propan-2-il fosfato disódico.

11. Una composición farmacéutica que contiene un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Un método para disminuir o inhibir la cantidad de bacterias de *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium ulcerans*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* o estreptococos  $\beta$ -hemolíticos en una muestra biológica que contiene dicha muestra biológica en contacto con un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para usar en el control, el tratamiento o la reducción del avance, la gravedad o los efectos de una infección bacteriana nosocomial o no nosocomial.

14. Un compuesto para usar según la reivindicación 13, donde la infección bacteriana se caracteriza por la presencia de uno o más bacterias de *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*,

*Neisseria meningitidis*, complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium ulcerans*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* o estreptococos  $\beta$ -hemolíticos.

- 5 15. Un compuesto para usar según se reivindica en la reivindicación 14, donde la infección bacteriana se elige entre una o más de las siguientes: infecciones de las vías respiratorias superiores, infecciones de las vías respiratorias inferiores, infecciones de oído, infecciones pleuropulmonares y bronquiales, infecciones del aparato urinario complicadas, infecciones del aparato urinario simples, infecciones intraabdominales, infecciones cardiovasculares, una infección en el torrente sanguíneo, septicemia, bacteriemia, infecciones del SNC, infecciones cutáneas y de tejidos blandos, infecciones GI, infecciones óseas y articulares, infecciones genitales, infecciones oculares o
- 10 infecciones granulomatosas, infecciones cutáneas y de la estructura cutánea simples (uSSSI), infecciones cutáneas y de la estructura cutánea complicadas (cSSSI), infecciones por catéter, faringitis, sinusitis, otitis externa, otitis media, bronquitis, empiema, neumonía, neumonía bacteriana extrahospitalaria (CABP), neumonía intrahospitalaria (HAP), neumonía bacteriana intrahospitalaria, neumonía asociada a respirador (VAP), infecciones del pie diabético, infecciones por enterococos resistentes a la Vancomicina, cistitis y pielonefritis, cálculos renales, prostatitis,
- 15 peritonitis, infecciones intraabdominales complicadas (cIAI) y otras infecciones intraabdominales, peritonitis asociada a diálisis, abscesos viscerales, endocarditis, miocarditis, pericarditis, septicemia asociada a transfusión, meningitis, encefalitis, absceso cerebral, osteomielitis, artritis, úlceras genitales, uretritis, vaginitis, cervicitis, gingivitis, conjuntivitis, queratitis, endoftalmitis, una infección en pacientes con fibrosis quística o una infección en pacientes neutropénicos febriles.
- 20 16. Un compuesto para usar según se reivindica en la reivindicación 15, donde la infección bacteriana se elige entre una o más de las siguientes: neumonía bacteriana extrahospitalaria (CABP), neumonía intrahospitalaria (HAP), neumonía bacteriana intrahospitalaria, neumonía asociada a respirador (VAP), bacteriemia, infecciones del pie diabético, infecciones por catéter, infecciones cutáneas y de la estructura cutánea simples (uSSSI), infecciones cutáneas y de la estructura cutánea complicadas (cSSSI), infecciones por enterococos resistentes a la Vancomicina
- 25 y osteomielitis.

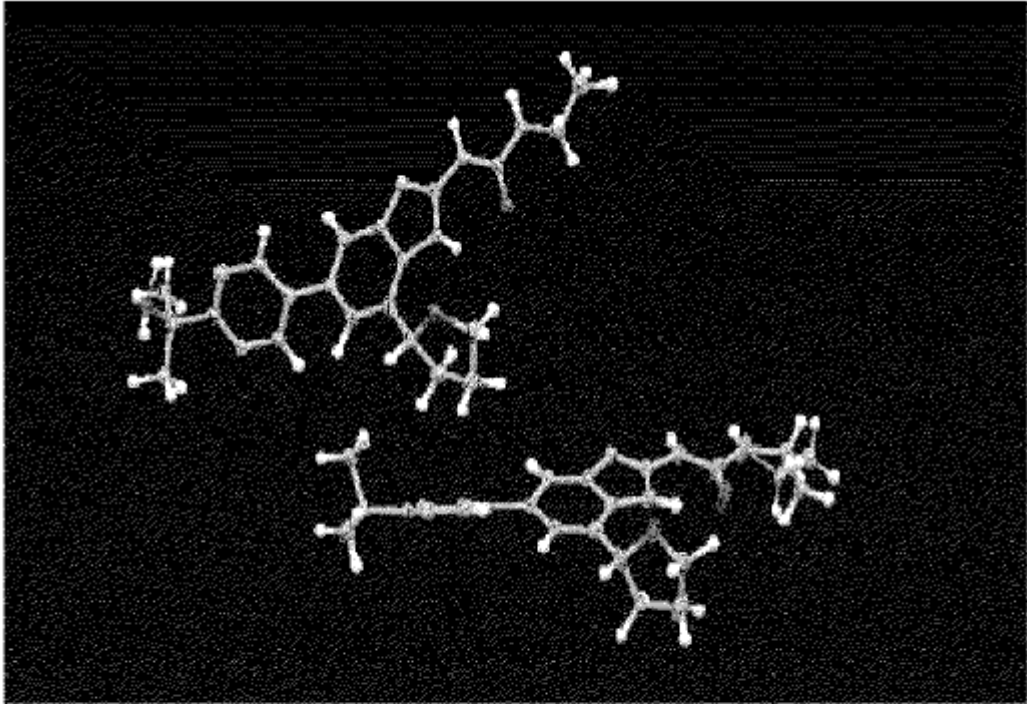


FIG. 1



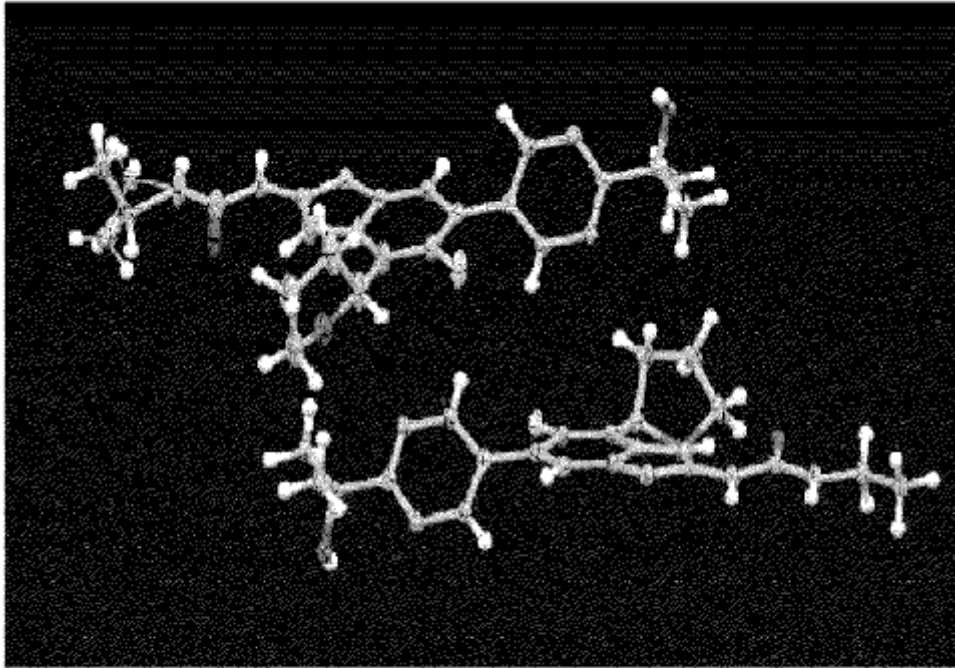


FIG. 2