

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 083**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 31/7052 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2009 E 09822828 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2358379**

54 Título: **Biodefensas usando macrólidos que contienen triazol**

30 Prioridad:

24.10.2008 US 108137 P

24.10.2008 US 108110 P

24.10.2008 US 108168 P

20.03.2009 US 162109 P

24.10.2008 US 108112 P

24.10.2008 US 108134 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2016

73 Titular/es:

**CEMPRA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
6320 Quadrangle Drive, Suite 360
Chapel Hill, NC 27517, US**

72 Inventor/es:

FERNANDES, PRABHAVATHI B.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 565 083 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).

y carbamoilo; R₁₄ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, aralquilo, alquilarilo, alcoxi, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, dimetilaminoalquilo, acilo, sulfonilo, ureido o carbamoilo.

W es H, F, Cl, Br, I u OH.

5

A es CH₂, C(O), C(O)O, C(O)NH, S(O)₂, S(O)₂NH, C(O)NHS(O)₂, B es (CH₂)_n donde n es un número entero que varía en un rango de entre 0 y 10, o B es una cadena de carbono insaturada de 2-10 carbonos. C es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, aralquilo, alquilarilo, alcoxi, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, aminoarilo, alquilaminoarilo, acilo, aciloxi, sulfonilo, ureido o carbamoilo.

10

En otra realización, las composiciones incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula (I) descritos en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales.

15 El documento US2003/0176327 divulga diferentes antibióticos para su uso contra los patógenos mencionados en las reivindicaciones.

El documento US2006/0100164 divulga los compuestos de fórmula (I) para su uso contra patógenos distintos de los mencionados en las reivindicaciones.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Los estudios preliminares *in vivo* en modelos animales de enfermedad también demuestran protección contra estos patógenos.

25

Figura 2. Se muestran distribuciones de la concentración inhibitoria mínima de CEM-101 en forma de gráfico de barras.

Figura 3. Susceptibilidades comparativas de *S. aureus* ATCC 25923 y *L. monocytogenes* EGD a CEM-101, TEL, AZI, y CLR, basándose en las determinaciones de MIC en caldo de cultivo con pH ajustado.

30

Figura 4. Efecto de mortalidad en el tiempo a corto plazo de CEM-101 y AZI en *S. aureus* (ATCC 25923) en caldo de cultivo (paneles izquierdos; pH 7,4) o después de la fagocitosis por macrófagos THP-1 (paneles derechos). Ambos fármacos se usaron a una concentración extracelular de 0,7 (paneles superiores) o 4 (paneles inferiores) mg/litro.

35

Las MIC de CEM-101 y AZI fueron 0,06 y 0,5 mg/litro, respectivamente. Todos los valores son la media \pm desviaciones estándar (DE) de tres experimentos independientes (cuando no son visibles, las barras de DE son más pequeñas que los símbolos).

Figura 5. Relaciones de concentración-efecto para CEM-101, TEL, CLR y AZI hacia *S. aureus* (ATCC 25923) en caldo de cultivo (paneles izquierdos) y después de la fagocitosis por macrófagos THP-1 (paneles derechos). La ordenada muestra el cambio en UFC ($\Delta \log$ UFC) por ml (caldo de cultivo) o por mg de proteína celular (macrófagos THP-1) en 24 h en comparación con el inóculo inicial. La abscisa muestra la concentración de los antibióticos como se indica a continuación: (i) paneles superiores, concentraciones en peso (en mg/litro) en caldo de cultivo (izquierda) o en el medio de cultivo (derecha) y (ii) paneles inferiores, múltiplos de la MIC que se determinan en caldo de cultivo a pH 7,4. Todos los valores son la media \pm desviaciones estándar (DE) de tres experimentos independientes (cuando no son visibles, las barras de DE son más pequeñas que los símbolos). Análisis estadístico basado en el análisis global de los parámetros de ajuste de curva (análisis de varianza unidireccional); la única diferencia significativa se encuentra entre CEM-101 y AZI en caldo de cultivo ($P = 0,04$). Los valores numéricos de los descriptores farmacológicos pertinentes y el análisis estadístico de sus diferencias se muestran en la Tabla 1.

50

Figura 6. Relaciones de concentración-efecto para CEM-101 y AZI hacia *L. monocytogenes* intrafagocítica (cepa EGD, paneles izquierdos) y *L. pneumophila* (cepa ATCC 33153, paneles derechos). La ordenada muestra el cambio en UFC ($\Delta \log$ UFC) por mg de proteína celular en 24 h (*L. monocytogenes*) o 48 h (*L. pneumophila*) en comparación con el inóculo de postfagocitosis. La abscisa muestra la concentración de los antibióticos como se indica a continuación: (i) paneles superiores, concentraciones en peso (en mg/litro); (ii) paneles inferiores, múltiplos de la MIC que se determinan en caldo de cultivo a pH 7,4. Todos los valores son la media \pm desviaciones estándar (DE) de tres experimentos independientes (cuando no son visibles, las barras de DE son más pequeñas que los símbolos).

55

Figura 7. Acumulación de CEM-101 frente a comparadores en células THP-1 a 37 °C (todos los fármacos a una concentración extracelular de 10 mg/litro). (A) Cinética de acumulación (AZI); Cc, concentración intracelular; Ce, concentración extracelular); (B) influencia del pH del medio de cultivo en la acumulación (30 min) de CEM-101 (símbolos con relleno en color negro y línea continua) y AZI (símbolos con relleno en color blanco y línea

60

discontinua); (C) influencia de la monensina (50 μ M; 2 h de incubación), verapamilo (150 μ M; 24 h de incubación), o gemfibrozilo (250 μ M; 24 h de incubación) en la acumulación celular de AZI y CEM-101. Todos los valores son la media \pm desviaciones estándar (DE) de tres determinaciones independientes (cuando no son visibles, las barras de DE son más pequeñas que los símbolos).

5

Figura 8. Actividad intracelular: Estudios comparativos con otros agentes anti-estafilocócicos. Respuesta estática a la dosis comparativa de antibióticos contra *Staphylococcus aureus* intracelulares (cepa ATCC 25923) en macrófagos THP-1. Las barras representan las MIC (en mg/l) o la dosis estática extracelular.

10 Figura 9. Actividad intracelular de CEM-101 en comparación con AZI, CLR y TEL, expresada como una curva dosis-respuesta de Δ log UFC desde el momento 0 a 24 horas frente a la dosis logarítmica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 En una realización, se describen en el presente documento compuestos que son activos intracelularmente. También se ha descubierto en el presente documento que la acumulación intracelular y la actividad intracelular de los macrólidos que contienen triazol no se vio afectada por inhibidores de Pgp o de proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP). Por consiguiente, se cree que los compuestos descritos en el presente documento no son sustratos o son sustratos deficientes de la glicoproteína P (glicoproteína plasmática o de permeabilidad, Pgp). Se
20 aprecia que la Pgp es un mecanismo de eflujo que puede conducir a la resistencia mediante algunos organismos frente a ciertos antibióticos, tal como se ha indicado para AZI y ERY en macrófagos en los que los antibióticos son sustratos de la glicoproteína P. Por consiguiente, se ha descubierto sorprendentemente que los compuestos descritos en el presente documento se acumulan intracelularmente. Además de la acumulación intracelular, se ha descubierto sorprendentemente que los compuestos macrólidos que contienen triazol y cetólidos descritos en el
25 presente documento tienen alta actividad intracelular. También se ha descubierto sorprendentemente en el presente documento que los compuestos descritos en el presente documento tienen una unión a proteínas inferior que es típica para los macrólidos a bajo pH, tal como el pH que se encuentra en las infecciones bacterianas, incluyendo, pero sin limitación, los abscesos. Se aprecia que la falta de actividad intracelular observada típicamente con los agentes antibacterianos, incluyendo otros macrólidos y cetólidos, puede deberse a una elevada unión a proteínas,
30 y/o al pH relativamente inferior de los compartimentos intracelulares, tal como está presente en los abscesos.

Sin embargo, incluso cuando no se elimina por eflujo activo, la concentración de otros agentes antibacterianos, incluyendo otros macrólidos o cetólidos, en macrófagos puede no ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad debido al bajo pH del compartimento lisosomal. Por ejemplo, el entorno ácido que predomina en los fagolisosomas
35 (donde uno o más de *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis*, y/o *B. mallei* pueden permanecer durante su fase intracelular) puede afectar a la actividad de los antibióticos, tal como AZI, CLR y TEL. Se ha descubierto inesperadamente que los compuestos descritos en el presente documento conservan su actividad antibacteriana a un bajo pH. Se aprecia que la actividad intracelular de los compuestos descritos en el presente documento puede ser un determinante importante para una rápida y completa erradicación y, probablemente también, para la
40 prevención de la resistencia en el organismo diana.

La falta de terapia antimicrobiana efectiva da como resultado la supervivencia intracelular de bacterias, que sigue siendo una causa principal de propagación bacteriana, fallos terapéuticos mortales, y el establecimiento de infecciones recidivantes crónicas. Estas situaciones se observan durante el transcurso de infecciones causadas por
45 muchos organismos de biodefensa, incluyendo *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei*.

Aunque se ha indicado que la acumulación intracelular de un antibiótico es indicativa de una actividad eficiente frente a bacterias, la evaluación farmacodinámica de una gran serie de antibióticos usados comúnmente ha revelado que también son importantes otros parámetros tales como la biodisponibilidad intracelular y la modulación de la actividad
50 en el compartimento infectado. Las observaciones descritas en el presente documento confirman y extienden las observaciones previas hechas con macrólidos en este contexto debido al sorprendente comportamiento diferencial mostrado por los macrólidos que contienen triazol descritos en el presente documento, en comparación con macrólidos y cetólidos conocidos, tales como TEL, AZI y CLR.

55 Se ha descubierto sorprendentemente que los macrólidos que contienen triazol se acumulan en una medida considerablemente mayor que los comparadores, incluyendo AZI, y expresan sistemáticamente mayor potencia (valores disminuidos de E_{50} y C_s) aunque muestran una eficacia máxima similar ($E_{m\acute{a}x}$) a los comparadores. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que esto indica que las mejoras resultantes de las modificaciones estructurales introducidas en CEM-101 se refieren a la modulación de las propiedades farmacocinéticas y la actividad intrínseca
60 (incluyendo su reducida susceptibilidad a las condiciones fisicoquímicas que predominan en el compartimento infectado) en lugar de a un cambio en su modo de acción. Por lo tanto, los macrólidos que contienen triazol muestran el carácter básicamente bacteriostático de los macrólidos, pero lo expresan mejor en el medio intracelular

y a concentraciones extracelulares considerablemente inferiores que los comparadores.

- Sin quedar ligado a la teoría, se cree que la acumulación celular de macrólidos que contienen triazol, tal como CEM-101, es resultado del mecanismo general de la captura de protones de bases orgánicas débiles prevista para todos los macrólidos ya que la acumulación se suprime casi completamente, de forma paralela a AZI, mediante la exposición a pH ácido o al ionóforo de protón monensina. Basándose en el modelo general de difusión/segregación de bases débiles en compartimentos unidos a membrana ácidos, la acumulación se determina por el número de grupos ionizables y las relaciones entre los coeficientes de permeabilidad de membrana de las formas no ionizadas e ionizadas del fármaco. Aunque CEM-101 tiene dos funciones ionizables, se calcula que la pKa del aminofeniltriazol será menor de 4, lo que sugiere que la molécula es en gran medida monocatiónica (similar a CLR y TEL) a pH neutro neutral e incluso a pH lisosomal (~5). Por el contrario, AZI tiene dos funciones ionizables con pK_{as} >6 y, por lo tanto, es dicatiónica intracelularmente. Sin embargo, CEM-101, posee un sustituyente flúor en la posición 2, que debería hacerla más lipófila que CLR o TEL. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que la relación de las constantes de permeabilidad de las formas no ionizadas e ionizadas de CEM-101 en comparación con LR o TEL puede ser tan importante como el número de funciones ionizables para determinar el nivel de acumulación celular de bases orgánicas débiles. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que la mayor acumulación celular de CEM-101 puede deberse parcialmente a su falta de susceptibilidad al eflujo mediado por Pgp (que se expresa por los macrófagos THP-1 en estas condiciones de cultivo) a diferencia de la azitromicina y otros antibióticos macrólidos y cetólidos.
- Se ha observado que muchos macrólidos conocidos tienen un gran volumen de distribución, lo que se cree que se refiere a su capacidad para acumularse en el interior de las células eucariotas por difusión/segregación en compartimentos ácidos, concretamente lisosomas y vacuolas relacionadas. En consecuencia, los macrólidos conocidos se han considerado candidatos para el tratamiento de infecciones localizadas en estos compartimentos. Por lo tanto, puede asumirse que los macrólidos son adecuados para tratar infecciones causadas por patógenos intracelulares típicos, tales como *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei*. Sin embargo, las comparaciones cuantitativas directas entre actividades intracelulares y extracelulares usando patógenos intracelulares facultativos, tales como *S. aureus* o *L. monocytogenes*, sugieren que los macrólidos conocidos expresan únicamente una fracción mínima de su potencial antibacteriano intracelularmente, especialmente considerando su gran acumulación intracelular. Se cree que este potencial antibacteriano minimizado frente a organismos replicantes en fagolisosomas y vacuolas relacionadas está relacionado con un pH ácido que se sabe que reduce la actividad de los macrólidos conocidos. Otro factor es que algunos organismos, tales como *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei*, pueden replicarse realmente en otros compartimentos subcelulares. Además, ciertos macrólidos, tal como AZI, están sometidos al eflujo activo de los macrófagos, lo que contribuye adicionalmente una actividad intracelular subóptima.
- Por el contrario, la acumulación celular y la actividad intracelular de los compuestos que contienen triazol descritos en el presente documento, usando los modelos que se han desarrollado para el estudio de la farmacodinámica intracelular de los antibióticos, se mejora sustancialmente sobre los macrólidos conocidos, incluyendo los cetólidos. Por lo tanto, los compuestos descritos en el presente documento mantienen la eficacia máxima de sus MIC, y muestran mayor potencia frente a formas intracelulares de, por ejemplo, *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei* en comparación con TEL, AZI y CLR. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que esta potencia intracelular mejorada de los compuestos que contienen triazol descritos en el presente documento es resultado de la combinación de su mayor actividad intrínseca frente a *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei* junto con la actividad conservada a bajo pH, y la capacidad de distribuir a una gran diversidad de compartimentos intracelulares.
- En otra realización, los compuestos de macrólidos que contienen triazol y cetólidos tienen actividad intracelular, tal como actividad intracelular frente a *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei*. La supervivencia de estos organismos en las células eucariotas es crítica para la persistencia de la infección. Se aprecia que las pruebas rutinarias de susceptibilidad se determinan normalmente frente a bacterias extracelulares únicamente y, por lo tanto, pueden ser engañosas en su predicción de la eficacia frente a organismos intracelulares.
- Los compuestos y medicamentos descritos en el presente documento incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en el presente documento, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para mostrar la actividad antibacteriana intracelular.
- Se describen en el presente documento compuestos que son bactericidas. En otra realización, los compuestos y medicamentos descritos en el presente documento incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en el presente documento, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para mostrar actividad bactericida, incluyendo actividad bactericida *in vivo*. Se ha indicado que los macrólidos son generalmente bacteriostáticos. Los compuestos bacteriostáticos no matan las bacterias, sino que, en su lugar, por ejemplo, inhiben el crecimiento y la reproducción de bacterias sin matarlas; la muerte se realiza por agentes bactericidas. Se entiende que los agentes bacteriostáticos deben trabajar con el sistema inmune para eliminar los microorganismos del cuerpo. Los antibióticos bacteriostáticos pueden limitar el crecimiento de bacterias

a través de varios mecanismos, tal como interfiriendo con la producción de proteínas bacterianas, la replicación del ADN, u otros aspectos del mecanismo celular bacteriano. Por el contrario, los antibióticos bactericidas matan las bacterias; los antibióticos bacteriostáticos únicamente ralentizan su crecimiento o reproducción. Se han indicado varios mecanismos bactericidas, incluyendo la interrupción del precursor de pared celular que conduce a lisis, la unión irreversible a 30 subunidades ribosomales, la reducción de la fidelidad de traducción que conduce a una síntesis proteica imprecisa, y la inhibición de la síntesis de proteínas debido a una separación prematura del complejo entre ARNm y proteínas ribosomales. El resultado final es la muerte celular bacteriana.

Los compuestos, composiciones y medicamentos descritos en el presente documento incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en el presente documento, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para mostrar actividad bactericida frente a uno o más de *B. anthracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei*. Sin quedar ligado a la teoría, se cree en el presente documento que el tratamiento de dichas enfermedades usando agentes bacteriostáticos puede fracasar en dos aspectos. En primer lugar, simplemente la detención del avance de la enfermedad con un agente bacteriostático puede ser insuficiente dado que el sistema inmune puede no intervenir para facilitar la curación de la enfermedad a un nivel necesario. Por ejemplo, algunos organismos bacterianos no son eliminados por el sistema inmune puesto que residen en compartimentos intracelulares. Por lo tanto, una vez que el transcurso del tratamiento ha finalizado, puede da como resultado una rápida reaparición de la enfermedad. En segundo lugar, dado que cierta porción de la población bacteriana probablemente será eliminada, la población restante puede seleccionarse para el desarrollo de la resistencia. Se cree en el presente documento que un agente intracelularmente activo, y/o un agente intracelularmente activo y bactericida, será eficaz en el tratamiento de dichas enfermedades. En una realización ilustrativa, los compuestos descritos en el presente documento que consiguen una concentración intracelular de 20 veces la MIC de las bacterias diana. Se ha indicado que la mayor parte, si no todos, los antibióticos macrólidos, aunque bactericidas *in vitro*, son únicamente bacteriostáticos *in vivo*. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, cuando el tiempo entre la última dosis del compuesto se extendió, los niveles de reducción de biocarga siguieron siendo los mismos para los compuestos que contienen triazol descritos en el presente documento, indicando una respuesta bactericida. Por el contrario, los grupos de dosis de TEL y CLR demostraron aumentos de biocarga cuando se extendió el intervalo de tiempo. Por lo tanto, estos últimos dos agentes macrólidos/cetólidos demostraron una respuesta bacteriostática más clásica.

También se descubrió que CEM-101 tiene una potente actividad *in vitro* frente a *B. anthracis* que se compara favorablemente con la de los antibióticos aprobados actualmente (ciprofloxacina, MIC₉₀ 0,031 ug/ml) o propuestos (cetomicina, MIC₉₀ 0,063 ug/ml) para indicaciones postexposición a ántrax.

Como se muestra en la figura 1, se observa la actividad dependiente de la dosis (porcentaje de supervivencia) frente a *B. anthracis* en aerosol durante 14 días de dosificación oral. De especial importancia es el hecho de que las dosis protectoras mostradas aquí (por ejemplo, 2,5-20,00 mg/kg) también proporcionan altos niveles séricos y tisulares de CEM-101 en modelos de roedor, niveles que pueden conseguirse con regímenes de dosificación segura en ensayos humanos. Basándose en los datos de toxicología de GLP acumulados, debería ser posible administrar CEM-101 durante mayores intervalos (por ejemplo, 30-60 días) como se recomienda para la gestión del ántrax de inhalación postexposición. (Drusano, y col., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nov, 2008, pág. 3973-3979, Vol 52, N° 11). Estos regímenes profilácticos prolongados se requieren para erradicar las células vegetales tras la germinación de esporas latentes, que se sabe que existen durante una duración variable y potencialmente extendida en tejidos pulmonares de sujetos expuestos antes del desarrollo de los síntomas clínicos (Inglesby, y col., *JAMA* 2002; 287(17): 2236-2252). Además, dadas las incertidumbres sobre la duración de la latencia de las esporas después de la exposición o incluso después de la interrupción de un régimen profiláctico de 30-60 días, puede requerirse terapia aguda con una formulación oral en sujetos sintomáticos seleccionados en este escenario de biodefensa.

En los modelos celulares, CEM-101 es significativamente más activa que otros agentes antibacterianos frente a organismos localizados intracelularmente. Es activa frente a bacterias resistentes, incluyendo, bacterias de resistencia a múltiples fármacos. Se observa prueba de la resistencia bacteriana a CEM-101 *in vitro*. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que aquellos ejemplos que se vuelven resistentes es probable que no tengan una ventaja en la supervivencia ya que tendrán múltiples mutaciones que disminuirán la viabilidad y la virulencia.

La capacidad de CEM-101 para acumularse en tejidos y para conseguir altas concentraciones intracelulares, con potencia antimicrobiana, es una característica farmacológica, ya que el parasitismo intracelular es la base de la patofisiología de la enfermedad debido a los agentes de amenaza biológica de preocupación aquí. La figura 6 muestra que la captación de macrófagos y la muerte intracelular de *L. egionella pneumophila* (compartimento lisosomal) y *Listeria monocytogenes* (citoplasma) por CEM-101 son incluso más activas que mediante otros agentes macrólidos ensayados (Lemaire, y col., *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53: 3734-3743, 2009). Se facilitan concentraciones intracelulares que son 20-200 veces mayores que las conseguidas en plasma mediante la captación rápida en la célula y la evasión de la bomba de eflujo glicoproteína P, permitiendo de este modo una

erradicación efectiva de la replicación de patógenos intracelulares. CEM-101, a diferencia de la azitromicina y la cetromicina, no es un sustrato para la glicoproteína P.

Varios protocolos *in vivo* donde CEM-101 se dosificó repetidamente en estudios de toxicología en roedores y primates no humanos han demostrado niveles tisulares de CEM-101 ~17-100 veces mayores que los niveles plasmáticos máximos. La CEM-101 acumulada en los tejidos y las concentraciones fueron mayores en el hígado, el bazo, el pulmón y la glándula salival. Esta relación se confirmó en estudios ADME en roedores usando CEM-101 radiomarcada. Cuando se administró por vía oral a 100 mg/kg, se observaron relaciones de radioactividad del tejido pulmonar con respecto al plasma de ~13:1 en animales macho y hembra. Después de una dosificación IV a 20 mg/kg, los datos fueron más variables y se observaron relaciones pulmón/plasma de 17,6 para machos y 6,2 para hembras. $C_{m\acute{a}x}$ y AUC variaron de 0,022 $\mu\text{g/ml}$ y 0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ a 1,96 $\mu\text{g/ml}$ y 28,60 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ a través del intervalo de dosis. El $t_{m\acute{a}x}$ de CEM-101 medio aumentó de 1,5 a 6,0 horas y la semivida terminal media aumentó de 2,2 a 7,9 horas para el intervalo de dosis de 50 a 1600 mg.

En otra realización ilustrativa, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar un grupo C(O). En otra realización, X es H, Y es OR^7 , donde R^7 cladinósilo. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde W es flúor. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde A y B se toman juntos para formar propileno, butileno y pentileno. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde A y B se toman juntos para formar butileno. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde A y B se toman juntos para formar pentileno. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde A y B se toman juntos para formar butilenos y C es 2-piridinilo o aminofenilo, tal como 3-aminofenilo. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde A y B se toman juntos para formar propilenos, butilenos o pentilenos; y C es aminofenilo, tal como 3-aminofenilo. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde A y B se toman juntos para formar pentileno y C es 3-piridinilo o benzotriazol. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde C es un grupo arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde V es un grupo carbonilo. En otra realización, se describen en el presente documento compuestos de Fórmula (I), donde R^{10} es hidrógeno. En otra realización, X es H, Y es OR^7 , donde R^7 es un radical monosacárido, tal como cladinósilo, y C es 3-piridinilo o benzotriazolilo.

En otra realización, C está opcionalmente sustituido fenilo, tales como fenilo, halofenilo, haloalquilfenilo, aminofenilo, y similares, piridinilo opcionalmente sustituido, tal como 2-piridinilo y 3-piridinilo, benzotriazol opcionalmente sustituido, y similares.

En otra realización, A y B se toman juntos para formar butileno o pentileno, y X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar un grupo C(O).

En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde V es C(O). En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde W es H o F. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde A es CH_2 , B es $(\text{CH}_2)_n$, y n es un número entero de 2-4. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde C es arilo o heteroarilo. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde C es 3-aminofenilo o 3-piridinilo. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde R^{10} es hidrógeno. En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde A y B se toman juntos para formar butileno o pentileno, y X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar un grupo C(O). En otra realización, se describen compuestos descritos en cualquiera de las realizaciones anteriores donde A y B se toman juntos para formar butileno o pentileno, y X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar un grupo C(O), y W es F.

En el presente documento se describe una composición antibacteriana, donde la composición incluye una cantidad efectiva de uno o más compuestos mencionados en las reivindicaciones, y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para los mismos, o una combinación de los mismos.

Como se usa en este documento, el término "composición" se refiere generalmente a cualquier producto que comprende los ingredientes específicos en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea resultado, directamente o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. De forma ilustrativa, las composiciones pueden incluir uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes. Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse en una cantidad terapéuticamente efectiva en formas de dosificación convencionales para los métodos descritos en el presente

documento, incluyendo uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes para los mismos. Dichas composiciones de formulación pueden administrarse por una gran diversidad de rutas convencionales para los métodos descritos en el presente documento en una gran diversidad de formatos de dosificación, utilizando productos reconocidos en la técnica. Véase, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences, (16ª ed. 1980). Debe apreciarse que las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse a partir de compuestos aislados descritos en el presente documento o a partir de sales, soluciones, hidratos, solvatos, y otras formas de los compuestos descritos en el presente documento. También debe apreciarse que las composiciones pueden prepararse a partir de diversas formas amorfas, no amorfas, parcialmente cristalinas, cristalinas y/u otras formas morfológicas de los compuestos descritos en el presente documento.

10

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o ser humano que se espera por un investigador, veterinario, médico u otro especialista, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se trata. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva es aquella que puede tratar o aliviar la enfermedad o los síntomas de la enfermedad en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones que se describen en el presente documento puede decidirse por el doctor tratante dentro del alcance del juicio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente efectiva específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el género y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o casualmente con el compuesto específico empleado; y factores similares ya conocidos en las técnicas médicas.

25

En una realización, los compuestos descritos en el presente documento se administran a un ser humano por vía oral a una dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg/kg, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 mg/kg de peso corporal del paciente. En otra realización, la dosis diaria para un ser humano adulto es de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 mg, que puede administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, y similares. En otra realización, la dosis diaria para un ser humano adulto es de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 mg, que puede administrarse una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, y similares. Dichas dosis pueden administrarse una, dos o tres veces al día. Las dosis unitarias orales ilustrativas son 50, 100, 200 y 400 mg (individuales o divididas). Sin quedar ligado a la teoría, se cree que dichas dosificaciones ilustrativas son suficientes para conseguir niveles plasmáticos de aproximadamente 1 µg/ml, que pueden ser suficientes para observar la actividad bactericida de los compuestos descritos en el presente documento, tal como, para uno o más de *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei*. Se aprecia que, como se describe en el presente documento, los compuestos descritos en el presente documento, incluyendo CEM-101, alcanzan una alta concentración en los tejidos, tal como tejidos pulmonares. Sin quedar ligado a la teoría, se cree en el presente documento que los compuestos descritos en el presente documento, incluyendo CEM-101, pueden conseguir niveles tisulares que son al menos aproximadamente 10 veces la MIC para las cepas, incluyendo cepas resistentes a macrólidos, tales como, pero sin limitación, *B. antracis*, *Y. pestis*, *F. tularensis* y *B. mallei*, incluyendo cepas resistentes de los mismos.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden prepararse como se describe en el presente documento, o de acuerdo con la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006/0100164 y en la Publicación Internacional PCT N° WO 2009/055557.

En resumen, la síntesis de cetólidos que contienen triazol comienza con la preparación de dos etapas conocida del intermedio de 12-acil-imidazol 4 (Esquema I) de claritromicina (2). El intermedio 4 se convierte en los carbamatos 11,12-cíclicos 5a-c por la reacción con los aminoalcoholes unidos a 3-, 4- o 5-carbono correspondientes. El tratamiento de 5a-c con cloruro de tosilo proporciona los tosيلات 6a-c. El desplazamiento del grupo tosilo con NaN₃ da los compuestos azido 7a-c correspondientes. La escisión del azúcar de cladinosa de 7a-c a 8a-8c se realiza por el tratamiento con HCl en MeOH. La oxidación de Swern del grupo 3-hidroxi de 8a-c da los cetólidos protegidos correspondientes 9a-c que están desprotegidos posteriormente con metanol para proporcionar los cetólidos azido requeridos 10a-c, respectivamente. Estos compuestos azido se hicieron reaccionar con alquinos sustituidos terminalmente en presencia de yoduro de cobre en tolueno a 60 °C para proporcionar regio-selectivamente los 4-sustituido-[1,2,3]-triazoles correspondientes 11a-18a, 11b-18b y 11c-18c.

La azida de los intermedios 10a-c se convierte en los 4-sustituido-[1,2,3]-triazoles a través de una reacción de cicloadición con acetilenos sustituidos. Pueden formarse anillos triazol a través de una reacción de cicloadición 1 + 3 de Huisgen entre una azida y un alquino que da como resultado una mezcla de regioisómeros 1,4 y 1,5 como se representa en la Ruta A del Esquema II. Como alternativa, el procedimiento de Rostovtsev y col.⁸ puede seguirse

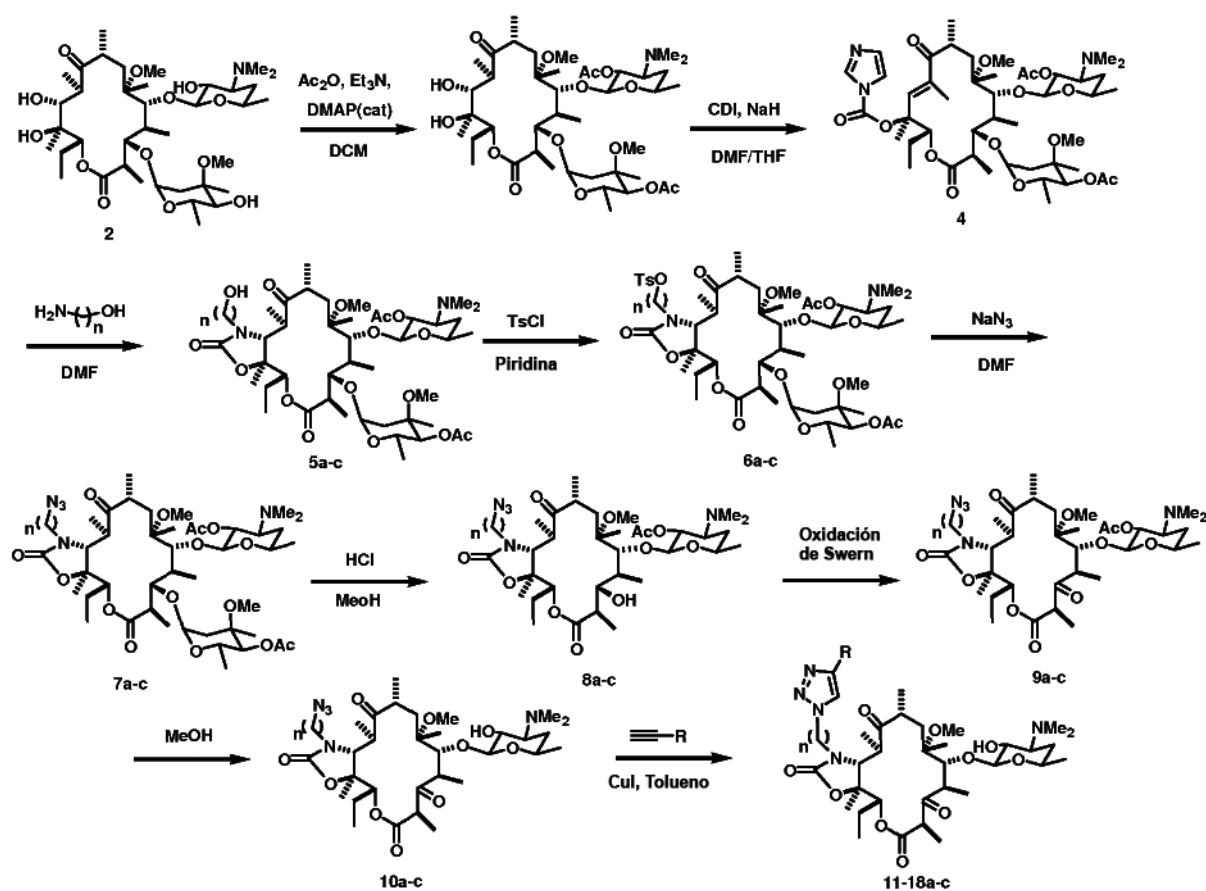
usando la adición de un catalizador de CuI a la reacción para producir selectivamente o exclusivamente el regioisómero 1,4 como se representa en la Ruta B del Esquema II.

La cadena lateral del anillo triazol también se incorpora en el sistema anular de claritromicina. En una realización, se escoge una cadena lateral de butil alquilo. Se aprecia que muchos análogos de la cadena lateral de butilo en la serie de cetólidos han mejorado la actividad antibacteriana basándose en los resultados de la MIC *in vitro*. El intermedio 7b se convierte directamente en el 4-sustituido-[1,2,3]-triazol a través de la ciclación catalizada por cobre con acetileno terminalmente sustituidos, como se muestra en el Esquema III. Los grupos protectores acetato de 19a-e se retiran con LiOH en metanol para proporcionar los 4-sustituido-[1,2,3]-triazoles correspondientes 20a-e.

La sustitución del hidrógeno de la posición 2 con un flúor se realiza mediante la fluoración electrófila de 9b (Esquema IV) usando Selectfluor®. El grupo azido del intermedio 22 se convierte en una serie de 4-sustituido-[1,2,3]-triazoles 23a-b a través de las condiciones estándar.

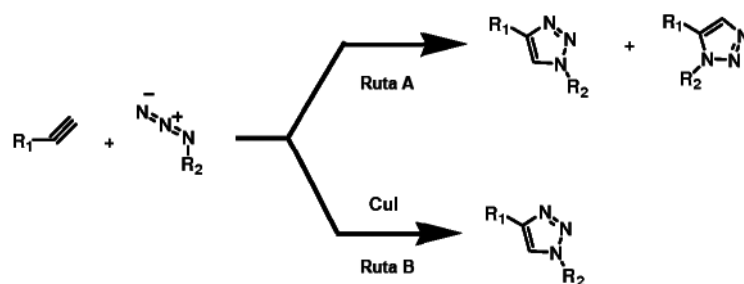
15

Esquema 1

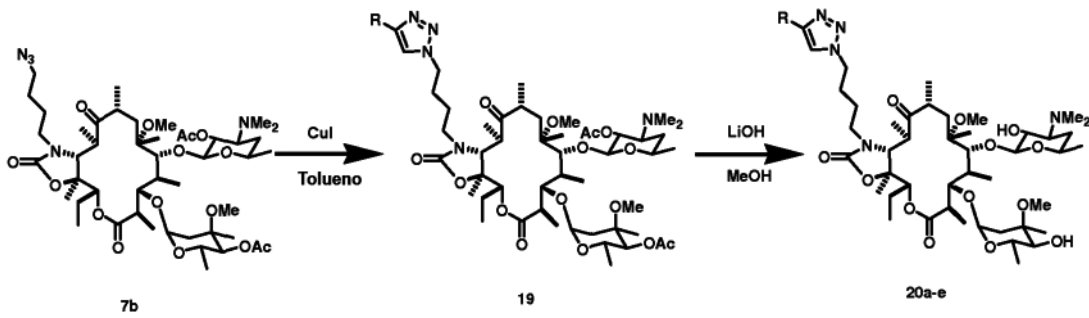


20

Esquema 2

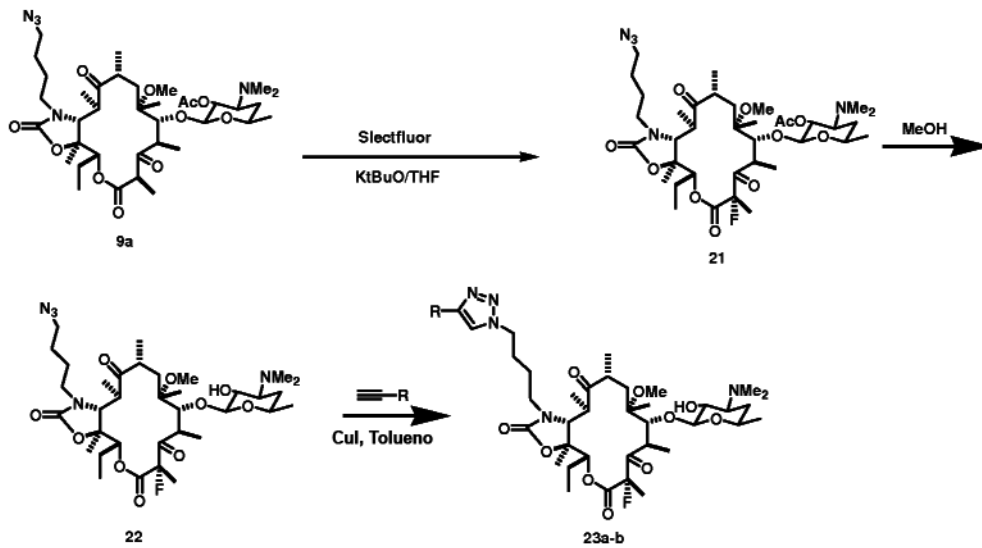


Esquema 3

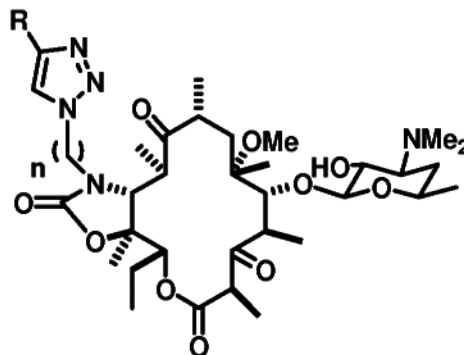



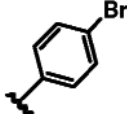
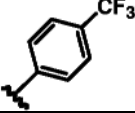
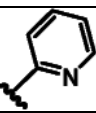
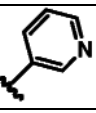
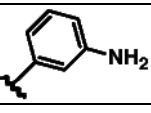
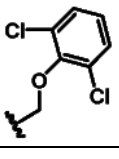
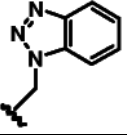
5

Esquema 4



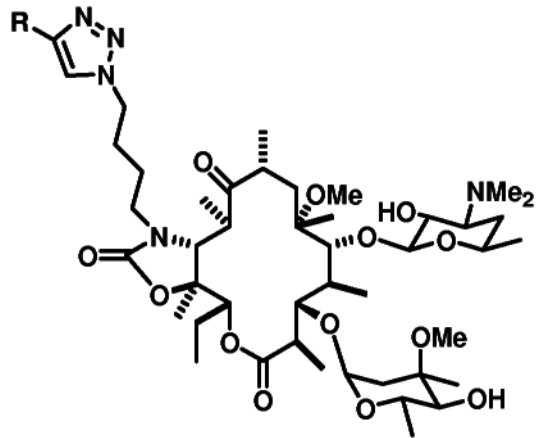
10 En otra realización, se describen los siguientes compuestos:



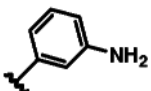
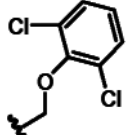
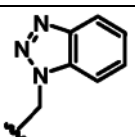


Concentración inhibitoria mínima (µg/ml) ^a								
Entrada	R	n	S. aureus		S. pneumoniae		H. influenzae 49247 Ery-S	
			29213 Ery-S	96:11480 Ery-R (MLSb)	49619 Ery-S	163 Ery-R (MefA)		303 Ery-R (ermB)
TEL			≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	4
AZI			≤0,125	>64	≤0,125	>64	>64	2
11a		3	1	1	≤0,125	≤0,125	>64	>64
11b		4	≤0,125	0,25	≤0,125	≤0,125	2	8
11c		5	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	0,25	16
12a		3	0,25	0,5	≤0,125	≤0,125	8	64
12b		4	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	8	8
12c		5	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	1	16
13a		3	1	2	≤0,125	≤0,125	16	>64
13b		4	0,25	0,25	≤0,125	≤0,125	8	8
13c		5	0,5	1	≤0,125	0,5	2	64
14a		3	2	2	≤0,125	0,5	>64	>64
14b		4	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	4
14c		5	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	0,25	64
15a		3	2	2	≤0,125	1	>64	>64
15b		4	≤0,125	4	≤0,125	2	64	64
15c		5	≤0,125	0,25	≤0,125	0,25	4	16
16a		3	0,5	nt	≤0,125	≤0,125	>64	16
16b		4	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	2
16c		5	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	0,25	8
17a		3	1	1	≤0,125	≤0,125	>64	>64
17b		4	≤0,125	≤0,125	≤0,12	≤0,12	1	16
17c		5	0,25	0,5	<0,125	≤0,125	2	32
18a		3	1	2	≤0,125	0,5	>64	>64
18b		4	1	2	≤0,125	4	64	32
18c		5	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	64	8

^a National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 6^a ed.; Estándar aprobado: NCCLS Documento M7-A6, 2003.

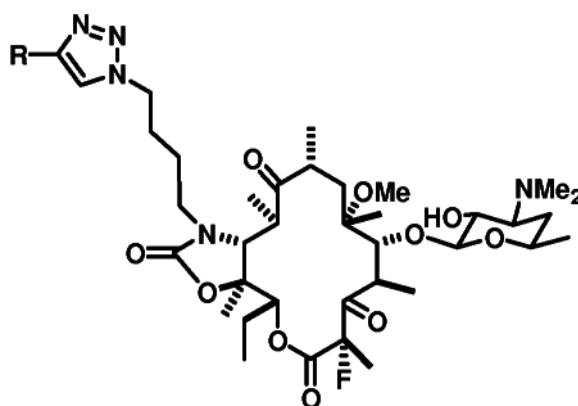
En otra realización, se describen los siguientes compuestos:



Entrada	R	S. aureus		S. pneumoniae			H. influenzae 49247 Ery-S
		25923 Ery-S	RN220	49619 Ery-S	163 Ery-R (MefA)	303 Ery-R (ermB)	
TEL		≤0,25	2	≤0,125	≤0,125	≤0,125	4
20a		0,25	8	≤0,0625	0,125	2	NT
20b		0,25	8	≤0,0625	≤0,06	1	NT
20c		1	8	≤0,0625	0,5	2	NT
20d		1	8	≤0,0625	0,5	2	NT
20e		≤0,25	8	≤0,0625	0,5	2	NT

En otra realización, se describen los siguientes compuestos:

5



Entrada	R	S. aureus		S. pneumoniae			H. influenzae
		29213 Ery-S	96:11480 Ery R (MLSb)	49619 Ery-S	163 Ery-R (MefA)	303 Ery-R (ermB)	49247 Ery-S
TEL		≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	4
AZI		ND	≤0,125	>64	≤0,125	>64	>64
23a		≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	2
23b (CEM-101)		≤0,06	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	2

En cada una de las realizaciones anteriores, el panel de exploración principal consistía en los *Staph. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* pertinentes (incluyendo cepas resistentes a azitromicina y telitromicina). Las MIC frente a todos los patógenos se determinaron usando un procedimiento de microdilución el caldo de cultivo según las directrices de NCCLS. Se descubrió que los compuestos descritos en el presente documento, tal como CEM-101 eran altamente potentes que tenían una MIC frente a *S. pneumoniae* (3773) de ≤0,125 µg/ml y *S. pyogenes* (1850) de 0,5 µg/ml, en comparación con 1 y 8 µg/ml, respectivamente para Telitromicina. Se descubrió que CEM-101 (20c), un análogo de CEM-101 que contenía la 3-O-cladinoso, era menos activo. Los cetólidos que contenían triazol sustituido no heteroaromático eran menos activos.

Los cetólidos se ensayaron frente a cepas sensibles a eritromicina (Ery-S) y resistentes a eritromicina (Ery-R) de *S. aureus* (29213 (Ery-S) y 96:11480 (Ery-R)), *S. pneumoniae* (49619 (Ery-S) y 163 y 303 (Ery-R)) y *H. influenzae* (49247 (Ery-S)) (Tablas 1-3). El procedimiento de microdilución en caldo de cultivo se usó para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) frente a todos los patógenos según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

La longitud de cadena de la cadena lateral alquilo tenía una actividad afectada (Tabla 1). Por ejemplo, el triazol fenilo sustituido unido a 3-carbono 11a era menos activo frente a Ery-S y Ery-R *S. aureus* y estaba inactivo frente a Ery-R *S. pneumoniae* 303 (ermB) a las concentraciones ensayadas, mientras que los triazoles fenilo sustituidos unidos a 4- y 5-carbono correspondientes 11b y 11c eran más activos frente a estos organismos. Se observó una tendencia similar para los triazoles 2-piridilo sustituidos 14a-c, los triazoles 3-amino-fenilo sustituidos 16a-c, y los triazoles 2,5-diclorofenilo sustituidos 17a-c.

El triazol 2-piridilo sustituido unido a 4-carbono 14b y el triazol 3-amino-fenilo sustituido 16b poseían la mayor potencia frente a *S. pneumoniae* 303, y ambos tenían valores de MIC (≤0,125 µg/ml) comparables a telitromicina. El cetólido que contenía el triazol 3-piridilo sustituido unido a 4-carbono 15b era menos inactivo frente a esta cepa (MIC de 64 µg/ml). Dentro de esta serie, la actividad antibacteriana se mejoró extendiendo el enlazador de carbono a 5 átomos, por ejemplo la MIC frente a *S. pneumoniae* 303 para el compuesto 15c mejoró de 64 a 4 µg/ml. También se

observó un efecto similar para el cetólido que contenía benzo-triazol 18c frente a *S. aureus* pero 18c aún estaba inactivo frente a *S. pneumoniae* 303. Se aprecia que un equilibrio entre la longitud del enlazador y la naturaleza de la sustitución aromática del triazol puede afectar a la actividad total frente a *S. pneumoniae* y *S. aureus* resistentes a macrólidos.

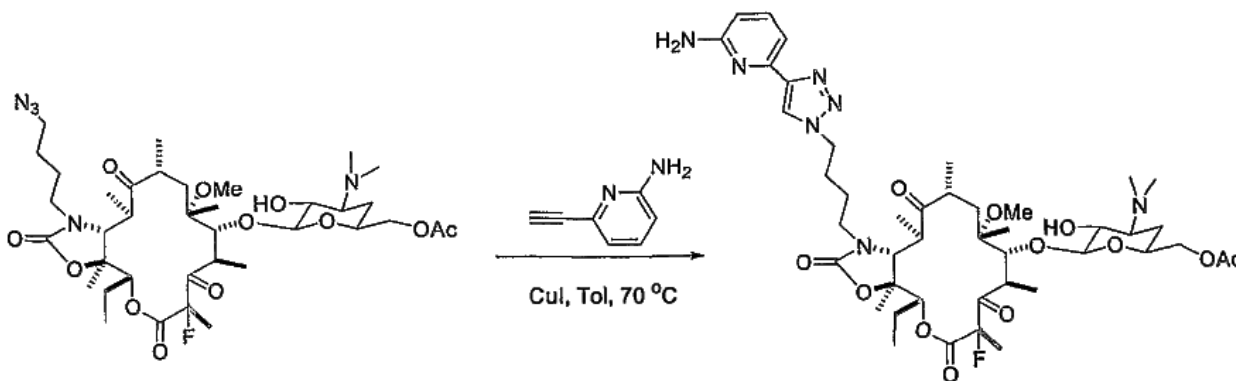
5

También se observó una correlación entre la longitud del enlazador y la actividad para *H. influenzae* (49247), donde la serie de cetólidos más potente tenía el triazol sustituido unido a través de una cadena de 4-carbono (11b-14b, 16b, 17b) o una cadena 5-carbono (15c, 18c). De forma interesante, la serie aromática más potente frente a *H. influenzae* era el 3-amino-fenilo con un enlazador 3-, 4- o 5-carbono (16a, 16b, 16c) que tenía MIC de 16, 2 y 10 8 µg/ml, respectivamente.

Los macrólidos que contenían una cladinosa en la posición 3 eran todos altamente activos frente a *S. pneumoniae* Ery-S (49619) (Tabla 2). Sin embargo, estos análogos eran menos potentes que la telitromicina frente a cepas de Ery-R. Las MIC eran significativamente más altas para los análogos que contenían cladinosa con sustituyentes de 2-piridilo, 2-aminofenilo o 2,6-diclorofenilo triazol que para los cetólidos correspondientes (20a, 20c y 20d frente a 14b, 16b y 17b). Por el contrario, la actividad antibacteriana se estableció de nuevo para los análogos de cetólidos 15b (3-piridilo) y 18b (benzo-triazol) reemplazando el ceto con el grupo de cladinosa en los análogos 20b (3-piridilo) y 20e (benzo-triazol). Las MIC mejoraron de 64 µg/ml para 15b y 18b a 1 y 2 µg/ml para 20b y 20e, respectivamente. También se observó una tendencia de actividad similar para *S. pneumoniae* Ery-R 163 (MefA).

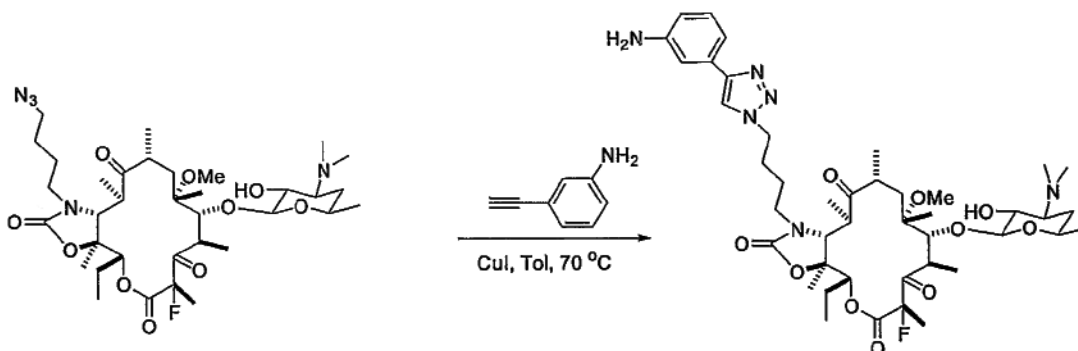
20

EJEMPLOS DE COMPUESTOS



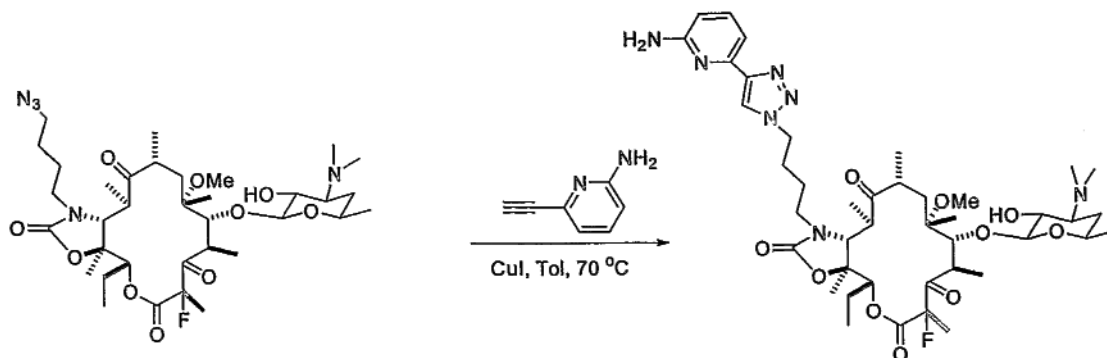
25 Una mezcla de 11-N-(4-Azido-butil)-6-O-metil-5-(3-dimetilamina-4-desoxi-6-O-acetil-glucopiranosil)-2-fluoro-3-oxo-eritronolida A, 11,12-carbamato (15 mg, 0,019 mmol), 6-Etil-piridin-2-ilamina (4,7 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 70 °C. Después de 16 h, la mezcla se concentró y se sometió directamente a cromatografía sobre gel de sílice (9:1, cloroformo:metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 14 mg del compuesto deseado. MS: C₄₄H₆₆FN₇O₁₂ calculado M⁺ = 903,5. Observado: M+H⁺ = 904,5.

30

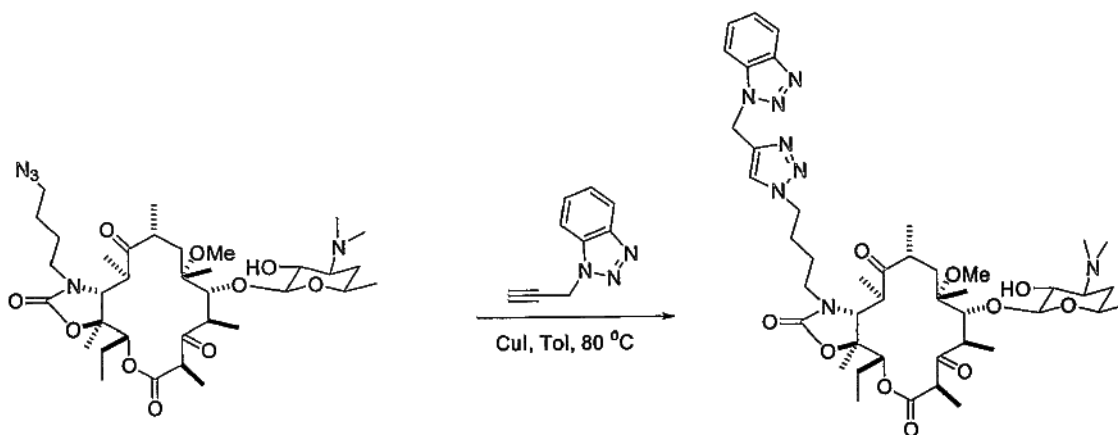


11-N-4-(3-aminofenil)-[1,2,3]triazol-1-il]-butil}-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronolida A, 11,12-carbamato cíclico (CEM-101). Una mezcla de 11-N-(4-azido-butil)-6-O-metil-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronolida A, 11,12-carbamato (17 mg, 0,023 mmol), 3-Etil-fenilamina (5,4 mg, 0,046 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 70 °C. Después de 16 h, la mezcla se concentró y se sometió directamente a cromatografía sobre gel de sílice (9:1, cloroformo:metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 17 mg del compuesto deseado, MS

$C_{43}H_{65}FN_6O_{10}$ calculado $M^+ = 844,47$. Observado: $M+H^+ = 845,5$

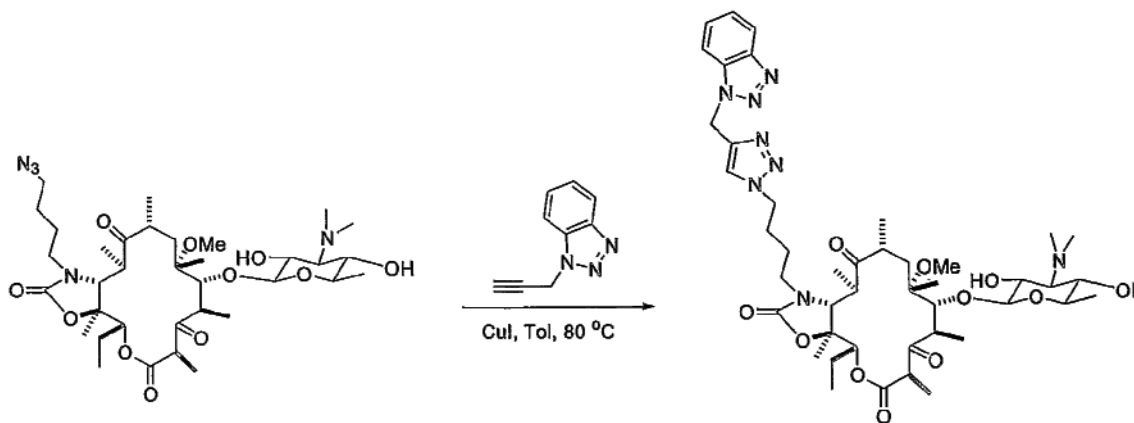


5 11-N-[4-[4-(6-Amino-piridin-2-il)-[1,2,3]triazol-1-il]-butil]-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronolida A, -11,12-carbamato cíclico. Una mezcla de 11-N-(4-azido-butil)-6-O-metil-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronolida A, 11,12-carbamato (15 mg, 0,02 mmol), 6-etinil-piridin-2-ilamina (4,7 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 70 °C. Después de 16 h, la mezcla se concentró y se sometió directamente a cromatografía sobre gel de sílice (9:1, cloroformo:metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 14 mg de el compuesto deseado OP1357, 10 MS: $C_{42}H_{64}FN_7O_{10}$ calculado $M^+ = 845,5$. Observado: $M+H^+ = 846,5$.



11-N-[4-(4-Benzotriazol-1-ilmetil-[1,2,3]triazol-1-il)-butil]-6-O-metil-5-O-dasosaminil-3-oxo-eritronolida A, 11,12-
15 carbamato. Una mezcla de 11-N-(4-Azido-butil)-6-O-metil-5-O-desosaminil-3-oxo-eritronolida A, 11,12-carbamato (3 mg, 0,0039 mmol), 1-Prop-2-inil-1H-benzotriazol (3 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 80 °C. Después de 16 h, la mezcla se concentró y se sometió directamente a cromatografía sobre gel de sílice (9:1, cloroformo:metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 3 mg del compuesto deseado. MS: $C_{44}H_{66}N_8O_{10}$ calculado $M^+ = 866,5$. Observado: $M+H^+ = 867,5$,

20



11-N-[4-(4-Benzotriazol-1-ilmetil-[1,2,3]triazol-1-il)-butil]-6-O-metil-5-micaminosil-3-oxo-eritronolida A, 11,12-carbamato. Una mezcla de 11-N-(4-azido-butyl)-6-O-metil-5-micaminosil-3-oxo-eritronolida A, 11,12-carbamato (3 mg, 0,004 mmol), 1-Prop-2-inil-1H-benzotriazol (3 mg, 0,4 mmol), Cul (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 80 °C. Después de 16 h, la mezcla se concentró y se sometió directamente a cromatografía sobre gel de sílice (9:1, cloroformo:metanol más hidróxido de amonio al 1 %) para dar 3 mg del compuesto deseado. MS: C₄₄H₆₆N₈O₁₁ calculado M⁺ = 882,5. Observado: M+H⁺ = 883,5.

EJEMPLOS DE PROCEDIMIENTO

10

EJEMPLO. Eficacia pivotal de CEM-101 frente a una exposición con B. antracis de inhalación letal en macacos Cynomolgus que evalúa la eficacia de CEM-101 frente a una exposición en aerosol letal. Se hicieron pruebas en cuarenta y dos (21 machos, 21 hembras) macacos Cynomolgus sin tratar de aproximadamente 2,5-5,0 kg, ~2-5 años (disponibles en Covance) (40 para el estudio y 2 adicionales). Se hacen pruebas a los monos y se verifica que den negativo para tuberculosis y también se criban previamente 30 días antes de la recepción para confirmar que son seronegativos para el virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS), Virus linfotrópico T de simio de tipo 1 (STLV-1), y herpesvirus cercopitecina 1 (virus Herpes B) y negativos para retrovirus del simio (SRV1 y SRV2) por PCR. Véase la Tabla 7.

20

Tabla 7: Diseño de Estudio Propuesto

Identificación del Grupo	Monos/Grupo	Antibiótico o Vehículo	Dosis (mg/kg)	Régimen de Dosificación	Tiempo hasta la 1 ^a Dosis (h PE)	Duración del Tratamiento (días)
1	10	CEM-101	5	Una vez al día	24	14
2	10	CEM-101	10	Una vez al día	24	14
3	10	CEM-101	15	Una vez al día	24	14
4	10	Agua estéril para inyección	2 ml/kg	Una vez al día	24	14

Los animales se pesan en los días de estudio - / y 0. Los monos que mueren o se someten a eutanasia en el estudio se pesan antes de la necropsia. Pueden tomarse pesos adicionales si un animal parece estar perdiendo peso durante el transcurso del avance de la enfermedad. Las observaciones clínicas de todos los monos se realizan dos veces al día durante el periodo de exposición previa. Se toman muestras sanguíneas de una arteria o vena femoral, vena safena, u otra vena apropiada en los días especificados en la Tabla 8. Las muestras de sangre recogidas el día de la exposición se recogen antes de la exposición. Las temperaturas corporales se controlan a través de un chip transpondedor de temperatura programable implantable (tal como IPTT-300 BMDs, Seaford, DE) dos veces al día a partir de la implantación (~día -7) al día 28.

30

Tabla 8: Programación de Extracción de Sangre

Punto Temporal	Bacteriemia (Cultivo)	CBC/CRP	Quím. Clínica	Det. Nivel Antibiótico	Ensayo de Coagulación
Día -7	X	X	X		X
Día 0 (antes de la exposición)		X	X	X	
24 horas PE (Antes del tratamiento)	X	X	X		X
28 horas PE (~4 horas PT)				X	
48 horas PE	X	X	X	X	X
72 horas PE	X	X	X		X
96 horas PE	X	X	X		X
Día 7 (~4 horas PT)	X	X	X	X	X
Día 8				X	
Día 14 (~4 horas PT)	X	X	X	X	X
Día 15				X	
Día 21	X	X	X		X
Día 28	X	X	X		X
Día 30	X				
Día 32	X				
Terminal	X	CRP			

PT = post-tratamiento, PE = post-exposición

5 Los monos se transportan al BL (nivel de bioseguridad de laboratorio 3)--5-10 días antes de la exposición para dejar un tiempo de aclimatación. Los monos de cada grupo del día de la exposición se asignan de forma aleatoria por el orden de exposición antes de la exposición. El día 0, los monos se anestesian con Telazol (1-6 mg/kg, IM) y se ponen en una cámara de pletismografía y un sistema de cabina de Clase III para el agente de exposición diana aerosolizado por un nebulizador Collison y administrado a través de una cámara de exposición para inhalación sólo para la cabeza.

10 Las concentraciones de aerosol del material de exposición se cuantifican por la determinación de unidades formadoras de colonias (ufc). Las corrientes de efluente se recogen directamente de un puerto de exposición del animal por un borboteador de vidrio en línea. Las diluciones seriadas de muestras del borboteador se ponen en 15 placas y se cuentan.

Tras la exposición, los monos se observan dos veces al día durante un mínimo de 28 días en condiciones BL-3 para evaluar la supervivencia y signos clínicos de enfermedad. Los animales supervivientes pueden retirarse del BL-3 después del día 28 posterior a la demostración de tres cultivos sanguíneos negativos consecutivos.

20 Las muestras de sangre de los puntos temporales indicados en la Tabla 8 se cultivan para determinar la presencia o ausencia de bacterias. También se realiza una evaluación hematológica (CBC). El análisis por CRP se realiza en el plasma residual recogido de cada muestra de sangre total después del procesamiento. El análisis por CRP también se realiza en muestras de sangre terminal recogidas en tubos EDTA si el plasma puede aislarse. Los ensayos de 25 coagulación incluyen el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), el fibrinógeno y el dímero D.

30 Análisis Estadístico: Se usan pruebas exactas de Fisher para comparar las tasas de supervivencia entre cada grupo de tratamiento de antibiótico y el grupo de control. Se realiza un análisis de tiempo hasta la muerte sobre estos datos determinando si hay diferencias en la protección para los diferentes grupos en base a la longitud del modelo de supervivencia. Se trazan las estimaciones de Kaplan-Meier de las probabilidades de supervivencia. La prueba de rango logarítmico o de Wilcoxon o la regresión de riesgos proporcionales de Cox se usan para determinar si hay diferencias significativas entre los grupos, y si las hubiera, qué grupos son significativamente diferentes. Los datos de cultivo de bacteriemia se analizan por separado en cada punto temporal. Se producen estadísticas de resumen con intervalos de confianza al 95 por ciento para cada grupo y punto temporal. Se usa la prueba exacta de Fisher 35 para ensayar si hay cualquier diferencia significativa en los datos de cultivo de bacteriemia entre los grupos. Para hematología, química clínica, coagulación, temperatura, niveles de antibiótico máximos y mínimos; se producen estadísticas de resumen e intervalos de confianza al 95 % para cada grupo. El análisis de los modelos de varianza (ANOVA) puede ajustarse a cada parámetro en cada punto temporal para determinar si hay diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento. Se espera que sobrevivan pocos animales de control, pueden usarse valores iniciales para los animales tratados en estas comparaciones, sirviendo cada animal como su propio control. Los cambios medios en los parámetros de temperatura, química clínica y hematología se comparan con cero, para evaluar cualquier cambio en el estado de salud.

5

La eficacia de CEM-101 frente a una exposición a *F. tularensis*, *Y. pestis* y *B. mallei* por inhalación letal en NHP y la eficacia piloto de CEM-101 frente a una exposición de *B. antracis* por inhalación letal en NHP se determinan usando los métodos que se han descrito anteriormente.

10 EJEMPLO. Farmacocinética de Conejo y Estudio de Tolerabilidad

Tabla 1. Grupos

Grupo de Tratamiento	Producto	Nº de Animales por Sexo (Total)	Nivel de Dosis (Ing/kg)
1	CEM-101	5(10)	5
2	CEM-101	5(10)	10
3	CEM-101	5(10)	15
4	Control	5(10)	NA

15

Tabla 2. Programación de Extracción de Sangre

Punto Temporal	Niveles de Antibiótico	Química Clínica	Hematología Clínica
Día -7	X	X	X
Día -3	X	X	X
*1 h	X	X	X
*2 h	X	X	X
*4 h	X	X	X
*6 h	X	X	X
*12 h	X	X	X
*18 h	X	X	X
*24 h	X	X	X
*48	X	X	X
*72	X	X	X
*96	X	X	X
*Día 10	X	X	X
*Día 20	X	X	X
*Día 30	X	X	X
*Extracciones sanguíneas recogidas después del tratamiento			

Los niveles sanguíneos de CEM-10 se determinan a partir de muestras sanguíneas recogidas de conejos tratados y de control en el tiempo indicado antes y durante la administración de CEM-101.

20

EJEMPLO. Farmacocinética (PK) en primates no humanos. Los datos de PK se recogen en tres fases. Ocho monos (4 machos, 4 hembras) participan en cada fase (Tabla 3). Cada fase se sigue de un periodo de lavado mínimo de 7 días antes del inicio de la siguiente fase.

25

Tabla 3. Diseño de Estudio

Fase	# por Fase	Dosis de CEM-101 (mg/kg)	Recogida de Sangre
1	8	5	Día 1: 0 ^a , 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48 h, 96 h
2	8	10	Día 1: 0 ^a , 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48 h, 96 h
3	8	15	Día 1: 0 ^a , 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48 h, 96 h

EJEMPLO. Caracterización del material de exposición de *Burkholderia mallei* y administración en el gran sistema de exposición animal. La cepa de *Burkholderia mallei* se estría para el aislamiento en medios de cultivo apropiados (tal como agar de caldo de cultivo Lisogenia (LB) con glicerol al 4 por ciento o medio de Ashdown). Tras la confirmación de la pureza y morfología de las colonias (considerando que las colonias morfológicamente variantes son comunes para *B. mallei*), todas las colonias se retiran y se suspenden en un medio de almacenamiento bacteriano apropiado y se congelan a ≤ -70 °C. Se prepara una colección de colonias en lugar de una única colonia aislada (se aprecia que el aislamiento de un único tipo de colonia puede seleccionar inadvertidamente una variante con propiedades de virulencia alteradas). Las colonias recogidas constituyen el banco de células maestras. El procedimiento se repite

35

mediante la estriación del banco de células maestras para preparar el banco de células de trabajo.

Todos los cultivos preparados en medios agar en la preparación de los bancos de células maestras y de trabajo se examinan para comprobar la morfología y pureza de las colonias. El examen morfológico macroscópico incluye descripciones de la forma, tamaño, elevación, margen, color, aspecto superficial, densidad y consistencia de las colonias. Si se determina un banco de células que contiene los contaminantes, éste se obtiene de nuevo a partir del banco de células maestras.

- El material de cultivo de los bancos de células maestras y de trabajo se tiñe en Gram. Los resultados de la tinción de Gram y la morfología celular macroscópica se observan y se comparan con los resultados previos en la bibliografía publicada. El material del banco de células de trabajo se usa para inocular los cultivos de caldo de cultivo; los matraces se incuban diversas veces y la densidad óptica de los cultivos medidos. Se preparan múltiples cultivos de caldo de cultivo. Cada cultivo se cultiva a una densidad óptica diana y después los números de UFC/ml del cultivo se determinan mediante enumeración por extensión en placas. Una relación del número de UFC/ml se determina promediando los resultados de múltiples cultivos para una densidad de cultivo. Se realiza PCR cualitativa en tiempo real (+/- PCR) para determinar, a nivel de ácido nucleico, que cada banco de células de trabajo es, de hecho, la cepa de *B. mallei* proporcionada. La concentración de bacterias en los bancos de células maestras y de trabajo para todas las cepas se determina mediante enumeración por extensión en placas, o una técnica comparable.
- Se preparan suspensiones frescas de *B. mallei* a partir de muestras de reserva. Se prepara un lote fresco para cada día y se realizan ensayos en aerosol. Las soluciones de *B. mallei* de partida (nebulizador) para aerosolización diluidas en una solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) que contiene gelatina al 0,01 % (p/vol) con trehalosa al 9,7 % (p/vol) (BSGT) y aproximadamente 8 ml se ponen en el nebulizador para cada ensayo. Se recogen muestras en aerosol de la cámara de exposición usando borboteadores de vidrio (por ejemplo, modelo 7541 Ace Glass, Inc.) relleno con ~20 ml de una solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) que contiene gelatina al 0,01 % (p/vol) (BSG) y anti-espuma A al 0,01 % hasta la colocación en placas para recuentos de ufc. La distribución del tamaño de partículas de aerosol se muestrean del sistema de exposición y se miden usando un dimensionador de partículas aerodinámico.
- Se realizan una serie de pruebas de caracterización del sistema de exposición en aerosol para cuantificar la concentración de aerosol de *B. mallei* viable (es decir UFC) y la reproducibilidad de la generación de aerosol. La Tabla 4 ilustra una matriz de prueba que puede usarse para ensayar la reproducibilidad del sistema de aerosol. Las pruebas de caracterización se repiten para generar cuatro concentraciones en aerosol diana diferentes cada día durante 3 días. La generación de cada concentración de aerosol diana se repite tres veces cada día. Las muestras de aerosol se recogen y se enumeran en UFC a través de la técnica de extensión en placas. Además, la temperatura, la humedad relativa y el tamaño de partícula de aerosol durante cada ensayo se controla para al menos un punto temporal.

Tabla 4. Ensayo de Caracterización de Aerosol

Número de Ensayo	Concentración de Aerosol Diana (UFC/l de aire)	Número de repeticiones del ensayo por concentración de aerosol diana
Ensayo 1	A	3
Ensayo 2	B	3
Ensayo 3	C	3
Ensayo 4	D	3

La matriz de ensayo completa (Ensayos 1-4) se repite durante 3 días separados.

- Para los ensayos de caracterización de aerosol, los modelos ANOVA estadísticos se ajustan a los datos de ensayo para el sistema de aerosol. Estos datos consisten en cuatro concentraciones de aerosol ensayadas tres veces cada día repitiéndose todo el experimento en tres días diferentes. Se ensaya una hipótesis estadística si el resultado del sistema medido (por ejemplo, el factor de pulverización) es reproducible (es decir, diferencias no estadísticamente significativo un día en comparación con otro). Un resultado negativo (es decir, no estadísticamente significativo) concluirá la reproducibilidad. También se realizarán análisis de potencia para determinar la sensibilidad mínima del ensayo para la identificación de diferencias reales.

- EJEMPLO. Desarrollo del sistema de aerosol de ratón para la generación, administración y recogida de *B. mallei*. Se realizó una serie de pruebas de caracterización del sistema de exposición de aerosol para cuantificar la concentración de aerosol de *B. mallei* viable (es decir UFC) y la reproducibilidad del sistema de exposición. La Tabla 4 ilustra la matriz de ensayo provisional propuesta que se usa para ensayar la reproducibilidad del sistema de aerosol. Las pruebas de caracterización se repiten para generar cuatro concentraciones de aerosol diana diferentes

cada día durante 3 días. La generación de concentración de aerosol diana se repite tres veces cada día. Las muestras de aerosol se recogen como se ha descrito anteriormente y se enumeran para las unidades formadoras de colonias (ufc) a través de una técnica de extensión en placas.

- 5 Para los ensayos de caracterización de aerosol, los modelos estadísticos ANOVA se ajustan a los datos de ensayo para el sistema de aerosol. Como se ha descrito anteriormente, estos datos consisten en cuatro concentraciones de aerosol ensayadas tres veces cada día repitiéndose todo el experimento tres días diferentes. Se ensaya una hipótesis estadística si el resultado del sistema medido (por ejemplo, el factor de pulverización) es reproducible (es decir, diferencia no estadísticamente significativa una día en comparación con otro). Un resultado negativo (es decir, no estadísticamente significativo) concluye la reproducibilidad. El análisis de potencia también se realiza para determinar la sensibilidad mínima del ensayo para identificar diferencias reales.

15 EJEMPLO. Determinación de la dosis letal media inhalada (LD₅₀) de *B. mallei* en ratones. La determinación de la LD₅₀ inhalada para *B. mallei* se realiza en fases. Cada fase de este estudio consiste en un periodo posterior a la exposición que se extenderá hasta el Día 28. El día que un animal se expone se designa como Día 0 del estudio. La Fase I consiste en 5 grupos, la fase II en cuatro grupos y las fases III y IV consisten en tres grupos cada una. En base a los resultados de mortalidad de las fases anteriores, se determinan nuevas dosis de exposición diana. Este procedimiento por fases permite un aumento de la confianza en el valor de LD₅₀ inhalada.

20 Tabla 6. Enfoque en Fases para Determinar la LD₅₀ en Ratones

Fase	Grupos por Fase	Ratones Totales
I	5 grupos de 4	20
II	4 grupos de 8	32
III	3 grupos de 8	24
IV	3 grupos de 8	24

Los ratones se exponen a través de la ruta de inhalación con *B. mallei* el Día 0 del estudio (para cada Fase). Se utiliza un sistema de exposición en aerosol sólo para la nariz (por ejemplo, una CH Technologies Tower) para administrar las dosis de aerosol deseadas a los ratones. El sistema de CH Technologies Tower usado para los ensayos de exposición de aerosol en ratones es capaz de exponer hasta 30 ratones a la vez con la adición de muestreadores de borboteador, un analizador del tamaño de partículas de aerosol, control de la temperatura y la humedad, y medidores del flujo másico (MFM) y controladores del flujo másico (MFC) para controlar y/o supervisar los flujos del aerosol. En resumen, el aire forzado entra en el sistema a través de filtros de aire en partículas de alta eficiencia (HEPA) y se divide en una corriente de aire continua (aire continuo) y una corriente de aire que fluye en el nebulizador Collison (durante la generación de aerosol) o lo deriva (entre generaciones de aerosol). El MFC regula el flujo para cada una de las corrientes de aire. El aerosol de *B. mallei*, creado por el nebulizador, se mezcla con aire continuo antes de la administración a la torre de exposición. Los parámetros de exposición de aerosol requeridos para administrar estas dosis se basan en los resultados del estudio de caracterización del sistema de aerosol de ratón propuesto que se ha descrito anteriormente.

Las concentraciones de aerosol de *B. mallei* se cuantifican por la determinación de unidades formadoras de colonias (ufc). Las corrientes de efluente se recogen directamente de un puerto de exposición animal mediante un borboteador de vidrio en línea. Las diluciones seriadas de muestras del borboteador se colocan en placas y se enumeran.

Los ratones se observan dos veces al día durante un total de 29 días, que incluyen Día del Estudio 0 a Día del Estudio 28, para determinar la aparición de los signos clínicos de enfermedad y supervivencia.

45 Para determinaciones de LD₅₀ (dosis letal media inhalada) en ratones, los experimentos se realizan en fases (Feder, 1992). Los modelos de dosis-respuesta de probit se ajustan a los datos de mortalidad de la dosis para ratones usando el procedimiento de probabilidad máxima (Finney, 1971 y Feder, 1991). Los parámetros estimados de los modelos de dosis-respuesta de probit se usan para computar la LD₅₀. Se usa el procedimiento de Fieller (Finney, 1971) u otros métodos apropiados para computar un intervalo de confianza al 95 por ciento para la LD₅₀.

50 Se registra el tiempo hasta la aparición de cada uno de los signos clínicos hasta la muerte, la eutanasia, o el final del periodo de observación clínica del animal. Se determinan la proporción de animales que muestran cada uno de los signos clínicos y el tiempo hasta la aparición de cada signo. La mortalidad se registra en el momento observado. Los modelos de riesgos proporcionales de Cox se ajustan a los datos del tiempo hasta la aparición y el tiempo hasta la muerte, con una dosis como una variable explicativa. Dado que los signos más graves pueden enmascarar signos menos graves, los signos pueden agruparse para este análisis. El tiempo medio hasta los signos y el tiempo medio hasta la muerte se calcula a la LD₅₀.

EJEMPLO. Historia Natural/Determinación de LD₅₀ de enfermedad por Burkholderia mallei por inhalación en macacos Cynomolgus. La determinación de la dosis letal (LD₅₀) de B. mallei y la caracterización de la historia natural de la melioidosis por inhalación en macacos cynomolgus se determina controlando los signos clínicos de la enfermedad, incluyendo observaciones clínicas, hematología, química clínica, parámetros telemétricos, ensayos de coagulación, bacteriemia y el número de bacterias en los órganos seleccionados.

Se obtienen veintidós (11 machos, 11 hembras) de macacos cynomolgus sin tratar (monos, NHP) de aproximadamente 2,5-5,0 kg (~2-5 años) (disponibles en Covance). Dos de los NHP servirán como reemplazos, si es necesario, durante las Fases I, II y III. Se hacen pruebas a los monos y se verifica que den negativo para tuberculosis y también se criban previamente 30 días antes de la recepción para confirmar que son seronegativos para el virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS), Virus linfotrópico T de simio de tipo 1 (STLV-1), y herpesvirus cercopitecina 1 (virus Herpes B) y negativos para retrovirus del simio (SRV1 y SRV2) por PCR. Los monos se ponen en cuarentena durante un mínimo de cinco semanas antes de ponerse en el estudio. Antes de la colocación en el estudio, a todos los monos se les implanta quirúrgicamente transmisores de telemetría (por ejemplo, artículo D70-PCTP, adquirido en Data Sciences International, DSI).

Diez grupos de monos se expusieron a diversas dosis de B. mallei administradas a través de aerosol durante un periodo de cuatro fases (véase la Tabla 7). Basándose en los resultados de mortalidad de las fases anteriores, se determinan nuevas dosis de exposición diana para la fase sucesiva. Este procedimiento por fases permite un aumento de la confianza en el valor de la LD₅₀ inhalada estimado. Las primeras tres fases se usan para determinar la LD₅₀ de B. mallei en NHP. En la fase final, los 4 NHP restantes se estimulan con una alta exposición que se espera que sea letal en una gran parte de los animales basándose en los resultados de las primeras tres fases (es decir, se dirigen a una dosis de exposición alrededor de la LD₉₀). Si los NHP de reemplazo no se usan en las Fases I, II o III, entonces también se exponen en la Fase IV. La información recogida en la Fase IV apoya la información de la historia natural recogida en las primeras 3 fases y aumenta el entendimiento del avance de la enfermedad en animales estimulados con elevadas dosis similares a las que pueden utilizarse en estudios de eficacia. Los resultados obtenidos de la Fase IV también pueden aumentar la precisión de una estimación de la LD₉₀.

Tabla 7. Enfoque en Fases para Determinar la LD₅₀ en Macacos Cynomolgus

Fase	Grupo	Dosis de UFC	Número de NHP
I	1	10.000	2
	2	100.000	2
	3	1.000.000	2
	4	10.000.000	2
II	5	TBD	2
	6	TBD	2
III	7	TBD	2
	8	TBD	2
IV*	9	TBD	2
	10	TBD	2

*Se incluyen dos NHP adicionales en esta fase si no se usan como reemplazos en las Fases I, II o III.

Los animales se pesan durante la cuarentena y los Días de Estudio -7 y 0. Los monos que mueren o se someten a eutanasia en el estudio se pesan antes de la necropsia. Pueden tomarse pesos adicionales si un animal parece estar perdiendo peso durante el transcurso del avance de la enfermedad. Las observaciones clínicas de todos los monos se realizan dos veces al día durante el periodo previo a la exposición. Tras la exposición en aerosol, los monos se controlan tres veces al día durante 28 días después de la exposición para evaluar la supervivencia y signos clínicos de enfermedad: agonía, dificultad respiratoria, apetito, actividad (yacente, débil o insensible), convulsiones, y otras observaciones clínicas (descritas por el observador).

Se toman muestras de sangre de una arteria o vena femoral, vena safena, u otra vena apropiada los días especificados en la Tabla 8. Las muestras de sangre recogidas el día de la exposición tendrán lugar antes de la exposición.

Telemetría: Los datos iniciales y post-exposición para la temperatura corporal; ECG; actividad; y función cardiovascular (frecuencia cardíaca, presión sistólica/diastólica, presión de pulso, presión media y presión respiratoria) se recogen durante al menos 30 segundos cada 15 minutos a lo largo de todo el estudio. Los datos iniciales se recogen durante al menos 10 días antes de la exposición. Los detalles sobre la operación específica y la recogida de datos se encuentran en SOP BBRC.VI-087, SOP BBRC.VI-093 y SOP BBRC.VI-096.

Tabla 8. Programación de Extracción de Sangre de Historia Natural

Punto Temporal	Bacteriemia	CBC/CRP	Química Clínica	Ensayos de Coagulación	QPCR
Día -7	X	X	X	X	X
Día 0		X	X	X	
Día 1 PE	X	X	X	X	X
Día 2 PE	X	X	X	X	X
Día 3 PE	X	X	X	X	X
Día 4 PE	X	X	X	X	X
Día 5 PE	X	X	X	X	X
Día 6 PE	X	X	X	X	X
Día 7 PE	X	X	X	X	X
Día 14 PE	X	X	X	X	X
Día 21 PE	X	X	X	X	X
Día 28 PE	X	X	X	X	X
Terminal	X	CRP únicamente			X

- 5 Los monos se transportan al BL-3 ~14 días antes de la exposición para dejar un tiempo de aclimatación. El Día 0, los monos se anestesian con Telazol (1-6 mg/kg, IM) y se ponen en una cámara de pletismografía y un sistema de cabina de Clase III y se exponen a la dosis diana de *B. mallei* aerosolizado por un nebulizador Collison y administrado a través de una cámara de exposición para inhalación sólo para la cabeza. Las concentraciones de aerosol de *B. mallei* se cuantifican por la determinación de UFC. Las corrientes de efluente se recogen directamente de un puerto de exposición animal mediante un borboteador de vidrio en línea. Las diluciones seriadas de muestras del borboteador se colocan en placas y se enumeran.

- 10 Los monos que sobreviven al periodo de 28 días posterior a la exposición se someten a eutanasia y se examinan como se describe a continuación. Debido al potencial de los monos supervivientes para desarrollar una infección crónica, todos los animales han de anesthesiarse. Además, la cuantificación de la carga bacteriana en los tejidos de animales en estudios de eficacia posteriores puede proporcionar un criterio de valoración secundario para el análisis (es decir, si el tratamiento no reduce significativamente la mortalidad, éste puede reducir significativamente la carga bacteriana).

- 15 Las muestras de sangre de los puntos temporales indicados en la Tabla 8 se cultivan para determinar la presencia o ausencia de *B. mallei*. Además, en cada uno de estos puntos temporales se recogen aproximadamente 100 µl de sangre total cuyo ADN se aísla y se realiza el análisis por QPCR.

Se realiza la evaluación hematológica (CBC) que incluye, pero sin limitación, los siguientes parámetros:

25

Recuento de glóbulos blancos (WBC)	Volumen corpuscular medio (MCV)
Recuento diferencial de leucocitos (% y absoluto)	Hemoglobina corpuscular media (MCH)
Relación de Neutrófilos:Linfocitos (Relación N/L)	Concentración de hemoglobina corpuscular media
Hemoglobina (HGB)	Amplitud de distribución eritrocitaria (RDW)
Hematocrito (HCT)	Recuento plaquetario (PLT)
Recuento de glóbulos rojos (RBC)	Volumen plaquetario medio (MPV)

La evaluación de la química clínica se realiza e incluye, pero sin limitación, los siguientes parámetros:

Alanina aminotransferasa (ALT)	Relación de Albúmina/Globulina (A/G)
Aspartato aminotransferasa (AST)	Nitrógeno ureico en sangre (BUN)
Fosfatasa Alcalina (ALP)	Creatinina
Gamma-Glutamil Transferasa (GGT)	Relación de BUN/Creatinina
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Glucosa
Sorbitol Deshidrogenasa (SDH)	Sodio
Bilirrubina total	Potasio
Proteína total	Cloruro
Albúmina	Calcio
Globulina	Fósforo

5

Las muestras sanguíneas para el análisis de los factores de coagulación se recogen en tubos que contienen citrato sódico. El análisis de proteína C reactiva (CRP) se realiza en el plasma residual recogido de cada muestra de sangre total después del procesamiento. El análisis de CRP también se realiza en muestras de sangre terminal recogidas en tubos EDTA si el plasma puede aislarse.

10

La necropsia macroscópica se realiza en todos los monos que mueren o se someten a eutanasia. Las porciones de tejidos diana que incluyen, pero sin limitación, los pulmones, el bazo y el hígado, se homogeneizan, el ADN se aísla, y el análisis por qPCR se realiza para determinar las cargas bacterias en estos órganos. Las secciones de tejidos diana que incluyen, pero sin limitación, el cerebro, los pulmones, el riñón, el hígado, el bazo, el mediastino y los

15

nódulos linfáticos bronquiales, así como todas las lesiones macroscópicas, se conservan en formalina tamponada neutra al 10 %. La histopatología se realiza en todos los animales, incluyendo los supervivientes sometidos a eutanasia el día del estudio 28.

20

Los modelos de dosis-respuesta de probit se ajustan a los datos de mortalidad de la dosis para monos usando el procedimiento de probabilidad máxima (Finney, 1971 y Feder, 1991). Los parámetros estimados de los modelos de dosis-respuesta de probit se usan para computar la LD₅₀ y LD₉₀. Se usa el procedimiento de Fieller (Finney, 1971) u otros métodos apropiados para computar un intervalo de confianza del 95 por ciento para la LD₅₀ y LD₉₀.

25

Se registra el tiempo hasta la aparición de cada uno de los signos clínicos hasta la muerte, la eutanasia, o el final del periodo de observación clínica del animal. Se determinan la proporción de animales que muestran cada uno de los signos clínicos y el tiempo hasta la aparición de cada signo. Los modelos de riesgos proporcionales de Cox se ajustan a los datos del tiempo hasta la aparición y el tiempo hasta la muerte, con una dosis como una variable explicativa. Dado que los signos más graves pueden enmascarar signos menos graves, los signos pueden agruparse para este análisis. El tiempo medio hasta los signos de enfermedad y el tiempo medio hasta la muerte se

30

calculan a la LD₅₀.

35

Análisis Estadístico de los Resultados de Hematología, Química Clínica, Coagulación y qPCR: Estos parámetros se evalúan con respecto al inicio para el mismo animal calculando el cambio del nivel de exposición previa medio en cada punto temporal de recogida de datos. Si es necesario, los datos hematológicos y de química clínica se transforman en primer lugar mediante el logaritmo para producir una respuesta distribuida más normalmente. En este caso, los resultados finales se devuelven a sus unidades originales a través de exponenciación. Las estadísticas de resumen se proporcionan para los datos. En cada punto temporal, el desplazamiento medio desde el inicio para todos los animales se evalúa usando pruebas t para determinar si el desplazamiento paramétrico es estadísticamente diferente significativamente de un desplazamiento nulo. Para cada uno de los parámetros de

40

telemetría, los datos recogidos inmediatamente antes de la exposición se promedian para cada animal, dando como resultado promedios de partida. Después, los resultados telemétricos en el periodo posterior a la exposición se ajustan para cada animal restante el promedio de partida. Puede emplearse el suavizado adicional de los datos moviendo medias o mediante otro procedimiento apropiado. La tendencia temporal en las mediciones de datos ajustados y alisados de partida, así como la suma acumulativa de los ajustes para cada parámetro de telemetría se

45

trazan para todos los animales.

Se establecen criterios específicos para la aparición de la enfermedad usando los datos telemétricos. Se determinan ensayos estadísticos para evaluar el punto temporal específico para el cual se produce un criterio de enfermedad en determinada porción de la población y/o proporcionar un intervalo temporal alrededor de una cierta manifestación media de la enfermedad. Siempre que sea posible y relevante, los datos adicionales del tiempo hasta la muerte, hematología, bacteriología y observaciones clínicas también pueden incorporarse en este análisis para determinar el momento óptimo de inicio de la terapia.

EJEMPLO. Eficacia de CEM-101 frente a una exposición a *F. tularensis*, *Y. pestis* y *B. mallei* por inhalación letal en ratones BALB/c.

10

Tabla 9 Diseño del Estudio

Grupo	Dosis de CEM-101 (mg/kg)	Número de Ratones	Duración del Tratamiento (días)
1	50	20	14
2	100	20	14
3	150	20	14
4	200	20	14
5	Control	20	14

Se usan ciento diez (110) ratones BALB/c en este procedimiento (100 se van a colocar en el estudio y 10 adicionales). El día 0, los ratones se ponen en un sistema de exposición de aerosol sólo para la nariz y se exponen a un agente aerosolizado por un nebulizador Collison. Las concentraciones de aerosol de agente se cuantifican por la determinación de unidades formadoras de colonias (ufc). Las corrientes de efluente se recogen directamente de un puerto de exposición mediante un borboteador de vidrio en línea. Las diluciones seriadas de muestras del borboteador se colocan en placas y se enumeran.

20

Tras la exposición, los ratones se observaron dos veces al día durante 28 días para evaluar la supervivencia y signos clínicos de enfermedad. La carga bacteriana en los pulmones, el bazo y la sangre periférica se determinan por la PCR cuantitativa de todos los ratones que se encuentran muertos o bajo eutanasia. Todos los animales que sobreviven al periodo de observación posterior a la exposición de 28 días se anestesian, y se recoge una muestra de sangre terminal seguida de eutanasia inmediata. Tras la eutanasia también puede recogerse un espécimen de pulmón y bazo para el análisis de carga bacteriana.

25

Se usan pruebas exactas de Fisher para comparar las tasas de supervivencia entre cada grupo de tratamiento de antibiótico y el grupo de control. Se realiza un análisis del tiempo hasta la muerte sobre estos datos para determinar si hay diferencias en la protección para los diferentes grupos en base a una longitud del modelo de supervivencia.

30

Eficacia Piloto y Eficacia Pivotal de CEM-101 frente a una Exposición a *B. anthracis* por Inhalación Letal en Conejos (véase el estudio de eficacia de conejo general descrito a continuación).

Usando los métodos que se han descrito anteriormente la eficacia de CEM-101 frente a una estimulación por inhalación de conejos con aerosol de *B. anthracis*

35

Tabla 12. Estudios de Eficacia Post-Exposición de Conejo (usados para *B. anthracis*).

Grupo	Dosis de CEM-101 (mg/kg)	Número de animales	Duración del Tratamiento (días)	Análisis de Hematología/Química Clínica/Bacteriemia (con respecto al día de la exposición)
1	5	10	14	-7, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28
2	10	10	14	-7, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28
3	15	10	14	-7, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28
4	Control	10	14	-7, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28

40

Los animales se tratan entre 18-24 horas después de la exposición. Todos los animales se controlan durante 28 días después de la exposición. Las extracciones de sangre para los niveles máximos y mínimos de CEM-101 se recogen después del primer, central y último tratamiento con antibiótico.

EJEMPLO. Las MIC se determinaron por el procedimiento de microdilución en placas de 96 pocillos de acuerdo con Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI formalmente NCCLS) (1). Los antibióticos se diluyeron en serie dos veces en 50 µl de caldo de cultivo de Mueller-Hinton ajustado por cationes (CAMHB). Para las determinaciones de *F. tularensis*, el CAMHB se complementó con Isovitalax al 2 % (Becton Dickinson). El intervalo de antibiótico era de 16

45

a 0,008 µg/ml en base a un volumen de pocillo final de 100 µl después de la inoculación.

Se prepararon inóculos suspendiendo colonias de una placa de sangre de oveja (SBA) de 18-24 h (*B. antracis*, *B. mallei* o *B. pseudomallei*) o 48 h (*Y. pestis*, *F. tularensis*) o agar de chocolate (de acuerdo con CLSI). Los cultivos suspendidos se diluyeron con CAMHB a una densidad celular bacteriana de 10⁶ UFC/ml. A cada pocillo de la placa de 96 pocillos se le añadieron 50 µl de esta dilución para un inóculo final de aproximadamente 5 x 10⁴ UFC/pocillo. Las placas se incubaron a 35 °C. Las MIC se determinaron visualmente en 24 y 48 h y leyendo las placas a 600 nm (SpectroMax M2, Molecular Devices).

- 10 La preparación del inóculo y la microdilución de antibiótico se realizaron de acuerdo con los métodos de CLSI. Las MIC de cada agente se determinaron por el procedimiento de microdilución en placas de 96 pocillos, después de 18 o 42 h de incubación a 35 °C, para 30 cepas que representan la diversidad genética y geográfica de cada especie bacteriana.
- 15 El control de calidad de las reservas de antibióticos se estableció usando *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

	# de Cepas	Intervalo ug/ml	MIC50 ug/ml	MIC90 ug/ml
<i>B. antracis</i>	30	<0,008 - 0,015	<0,008	<0,008
<i>Y. pestis</i>	30	0,25 - 2	1	2
<i>F. tularensis</i>	30	<0,08 - 4	0,03	2
<i>B. mallei</i>	30	0,25 - 2	1	1
<i>B. pseudomallei</i>	30	16	16	16

- Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos indicaron que todas las especies bacterianas en este estudio con la excepción de *B. pseudomallei* están en intervalos que pueden conseguirse terapéuticamente para CEM-101. *B. pseudomallei* tienen un sistema de eflujo multi-fármaco demostrado que está activo frente a macrólidos (2) y los datos que indican la resistencia a CEM-101 son consistentes. La distribución de *F. tularensis* refleja el solapamiento de los biovares distintos "A" y "B" de esta especie. Las cepas B se distribuyen a las mayores MIC mientras que las cepas A se distribuyen al extremo inferior. Las cepas A son las más virulentas y plantean la mayor amenaza de guerra biológica/bioterrorista constituyendo su mayor susceptibilidad fortuita.

- Dado que muchos de estos agentes bacterianos son intracelulares durante la infección, la capacidad observada de muchos macrólidos para acumularse preferencialmente en las células puede mejorar la eficacia entre los individuos expuestos a agentes de guerra biológica/bioterroristas (BW/BT) en aerosol. La actividad de amplio espectro demostrada frente a una diversidad de agentes bacterianos BW/BT potenciales junto con la biodisponibilidad oral hace a CEM-101 un candidato atractivo para el tratamiento después de las exposiciones y las infecciones. La eficacia de CEM-101 en los modelos de infección animal para estos agentes debería evaluarse.

- EJEMPLO. Se usaron macrófagos THP-1 humanos. La acumulación se midió mediante un ensayo microbiológico. La actividad intracelular se determinó frente a *S. aureus* fagocitado (ATCC 25923; MIC: CEM-101, 0,125 mg/l; AZI, 0,5 mg/l) usando un procedimiento de dosis-respuesta (AAC 2006; 50: 841-51). Se usaron Verapamilo (100 µM) y gemfibrozilo (250 µM) como inhibidores de glicoproteína P y MRP, respectivamente (AAC, 2007; 51: 2748-57).

- Las acumulaciones y actividades después de 24 h de incubación, con y sin inhibidores de transportadores de eflujo, se muestran en la siguiente Tabla, donde Cc/Ce es la relación de la concentración celular-extracelular aparente, y E_{máx} es el descenso máximo de las ufc intracelulares en comparación con el inóculo post-fagocitosis (calculado a partir de la regresión no lineal [sigmoidea] de experimentos de respuesta dosis-efecto).

Condición	AZI			CEM-101		
	Cc/Ce ¹ (24 h)	Actividad intracelular (Δ log ufc en 24 h)		Cc/Ce ¹ (24 h)	Actividad intracelular (Δ log ufc en 24 h)	
		Dosis estática (mg/l)	E _{máx} ²		Dosis estática (mg/l)	E _{máx} ²
control	127,7 ± 23,5	~ 7,0	0,10 ± 0,09	268,1 ± 7,1	~ 0,02	-0,85 ± 0,23
Verapamilo	216,37 ± 46,6 (a)	~ 0,2	- 0,37 ± 0,15	290,2 ± 12,9	~ 0,03	- 0,59 ± 0,22 (b)
Gemfibrozilo	129,12 ± 2,69	~ 3,8	-0,12 ± 0,20	308,2 ± 47,8	~ 0,03	-0,73 ± 0,20 (b)

(^a)Estadísticamente significativo a partir de caldo de cultivo de control y Gemfibrozilo; (^b)no estadísticamente significativo.

EJEMPLO. Actividad intracelular de los antibióticos. La determinación de la actividad antibiótica frente a la cepa de *S. aureus* intrafagocítico ATCC 25923 se determinó. Se realizaron estudios completos de dosis-respuestas para evaluar el impacto del eflujo activo en la modulación de la actividad intracelular de CEM-101 y AZI frente a *S. aureus* intrafagocítico (cepa ATCC 25923 [MIC: CEM-101, 0,125 mg/l; AZI, 0,5 mg/l]. Los antibióticos se compararon en 24 h para comprobar: (i) su concentración estática relativa (Cs), y (ii) su eficacia máxima relativa (E). Aunque verapamilo (pero no gemfibrozilo) aumenta la actividad intracelular de AZI, ningún inhibidor tiene un efecto significativo en la actividad de CEM-101, lo que sugiere que el último, a diferencia de AZI, no es un sustrato de los transportadores eucariotas correspondientes.

EJEMPLO. Acumulación celular de antibióticos. El contenido celular en los macrólidos se midió en macrófagos THP-1 mediante ensayo microbiológico, usando *S. aureus* ATCC 25923 como organismo de ensayo. Se ensayaron proteínas celulares en paralelo usando el procedimiento de Folin-Ciocalteu/Biuret. El contenido asociado a la célula en los macrólidos se expresó por referencia al contenido de proteína celular total, y se convirtió en concentraciones aparentes usando un factor de conversión de 5 µl por mg de proteína celular (como se usa comúnmente para las células cultivadas).

La acumulación celular de CEM-101 en comparación con la de AZI en células THP-1 se midió en primer lugar en la figura 7 (panel A). A las 24 h, ambos antibióticos se concentran en gran medida en las células, pero con un valor mayor (Cc/Ce) para CEM-101. En una segunda fase, se investiga si CEM-101 es un sustrato de los transportadores de eflujo de Pgp o MRP en la figura 7 (panel B). Usando un inhibidor de Pgp (verapamilo) o MRP (gemfibrozilo), no se observa ninguna variación significativa de la acumulación celular de CEM-101, aunque verapamilo aumenta significativamente la acumulación celular de AZI.

La captación de CEM-101 fue lineal con el tiempo, alcanzando niveles de acumulación aproximadamente de 375 veces en 24 h (AZI, 160 x, CLR, 30 x, TEL, 21 x). La acumulación se suprimió por pH ácido o la adición del ionóforo de protones monensina, pero no se modificó mediante verapamilo o gemfibrozilo (inhibidores preferentes de Pgp y MRP, respectivamente). El panel B muestra que la acumulación tanto de CEM-101 como de AZI se redujo cuando se realizaron los experimentos a pH ácido, produciéndose el cambio casi completamente cuando el pH se llevó de 7 a 6. El panel C muestra que la monensina, que se sabe que disminuye la acumulación celular de muchas bases orgánicas débiles, también suprimió casi completamente la acumulación tanto de CEM-101 como de AZI. Por el contrario, verapamilo, un inhibidor del transportador de eflujo de glicoproteína P (Pgp, también conocido como MDR1), aumentó la acumulación de AZI sin afectar a la de CEM-101, mientras que gemfibrozilo, un inhibidor de proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP) y otros transportadores aniónicos orgánicos no afectaron al compuesto. Ni verapamilo ni gemfibrozilo afectaron a la acumulación de TEL o CLR (datos no mostrados). Se examinó el eflujo de CEM-101 de las células incubadas con 10 mg/l de CEM-101 durante 1 h y después transferido en medio libre de fármaco. El eflujo avanzó de manera bimodal, liberándose la mitad del fármaco asociado a las células en aproximadamente 10 min, seguido de una fase de liberación inferior de varias horas (datos no mostrados).

EJEMPLO. Los macrólidos se acumulan en las células eucariotas y se consideran ventajosos para el tratamiento de infecciones intracelulares. Los cetólidos son activos frente a organismos resistentes a eritromicina. La acumulación celular y la actividad intracelular de CEM-101 hacia las formas intracelulares de *Staphylococcus aureus* (*S. a.*), *Listeria monocytogenes* (*L. m.*), y *Legionella pneumophila* (*L. p.*) en comparación con AZI, CLR y TEL se muestra en la siguiente tabla.

	MIC ^a	Cs ^b	E _{máx} ^c
		CEM-101	

ES 2 565 083 T3

S. a.	0,06	0,022	-0,86
L. m.	0,004	0,11	-0,66
L. p.	0,004	0,018	-1,03
		AZI	
S. a.	0,5	> 50	0,04
L. m.	1	11,6	-0,81
L. p.	0,016	2,90	-0,83
		CLR	
S. a.	0,5	0,84	-0,18
L. m.			
L. p.	0,007	0,12	-0,71
		TEL	
S. a.	0,25	0,63	-0,29
L. m.			
L. p.	0,007	0,06	-0,63
^a mg/l; ^b concentración estática (mg/l) a las 24 h; ^c Una UFC log ₁₀ a las 24 h en comparación con el inóculo post-fagocitosis			

EJEMPLO. Las MIC y las actividades extracelulares de los antibióticos se determinaron en MHB tanto a pH neutro como ácido. La actividad intracelular se determinó frente a *S. aureus* (ATCC 25923) fagocitado por macrófagos THP-1 como se ha descrito previamente (AAC, 2006, 50: 841-851). Los resultados se expresaron como un cambio de eficiencia en comparación con el momento 0 h.

Condiciones	CEM-101	AZI	CLR	TEL
MIC (mg/l)				
(i) pH 7,4	0,125	0,5	0,5	0,5
(ii) pH 5,5	1-2	256	16	8
Actividad extracelular (24 h): Δ log ufc desde el momento 0 h				
(i) pH del caldo de cultivo 7,4				
Em _{máx} ¹	-1,4 ± 0,1	-1,2 ± 0,6	-1,4 ± 0,2	-1,0 ± 0,4
Dosis estática ²	~ 0,06	~ 3,63	~ 1,41	~ 0,28
R ²	0,964	0,860	0,965	0,868
(ii) pH del caldo de cultivo 5,5				
Em _{máx} ¹	-1,6 ± 0,4	+ 2,1 ± 0,1	-1,5 ± 0,8	-1,4 ± 0,9
Dosis estática ²	~ 1,48	/	~ 10,47	~ 9,33
R ²	0,915	/	0,911	0,879
Actividad intracelular (24 h): Δ log ufc desde el momento 0 h				
Em _{máx} ¹	- 0,8 ± 0,2	0,10 ± 0,0	- 0,1 ± 0,1	-0,4 ± 0,2
Dosis estática ²	~ 0,02	~ 7,8	~ 0,98	~ 0,23
R ²	0,906	0,980	0,974	0,935
THP-1				
Em _{máx} ¹	-0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,1	-0,1 ± 0,1	-0,4 ± 0,1
Dosis estática ²	~0,02	~10	~0,98	~0,28

1 - Descenso máximo de ufc intracelulares en comparación con el inóculo post-fagocitosis inicial (calculado a partir de una regresión no lineal [sigmoidea] de respuesta dosis-efecto) realizado en caldo de cultivo (extracel.) o con macrófagos infectados (intracel.) 2 - Concentración extracelular (Cs en mg/l) que produce un efecto estático aparente. Descriptores farmacológicos comparativos (Em_{máx} y concentraciones estáticas [Cs]) obtenidos de los estudios de dosis-respuesta. Estudios de dosis-respuesta en caldo de cultivo Mueller-Hinton. Frente a S. aureus ATCC 25923 y en caldo de cultivo, a pH 7,4, CEM-101 es más activa sistemáticamente que AZI, CLR y TEL; a pH 5,5, AZI, CLR y TEL muestran un descenso significativo de sus potencias, aunque CEM-101 muestra menos cambio.

En comparación con AZI, CLR y TEL, la actividad de CEM-101 se vio menos afectada por el pH ácido del caldo de cultivo y mostró mayor potencia (dosis estática inferior) y mayor eficacia máxima (Em_{máx}) frente a S. aureus intracelular.

EJEMPLO. Líneas celulares. Los experimentos se realizaron con células THP-1 (ATCC TIB-202; American Tissue Culture Collection, Manassas, VA), una línea celular mielomonocítica humana que muestra actividad tipo macrófago (véase, por ejemplo, Barcia-Macay y col., Antimicrob. Agents Chemother. 50: 841-851 (2006)). Ensayo de los macrólidos asociados a las células y el cálculo de las relaciones de concentración celular-extracelular aparente. Los macrólidos se ensayaron mediante un procedimiento microbiológico, usando S. aureus ATCC 25923 como organismo de ensayo. Las proteínas celulares se midieron en paralelo usando el procedimiento de Folin-Ciocalteu/biuret. El contenido asociado a las células en los macrólidos se expresó por referencia al contenido de proteínas celulares total y se convirtió en concentraciones aparentes usando un factor de conversión de 5 µl por mg de proteína celular, un valor medio encontrado para muchas células de cultivo.

Cepas bacterianas, ensayos de susceptibilidad y estudios de la curva dosis-respuesta de 24 h con caldo de cultivo. En el presente estudio se usaron S. aureus ATCC 25923 (sensible a la meticilina [meticilina]), L. monocytogenes cepa EGD, y L. pneumophila cepa ATCC 33153. Las determinaciones de MIC se realizaron el caldo de cultivo Mueller-Hinton (para S. aureus) y caldo de cultivo de soja trípico (para L. monocytogenes) después de 24 h de incubación, o en caldo de cultivo de extracto de levadura tamponado con α -cetogluturato (para L. pneumophila) después de 48 h de incubación. Para los estudios de S. aureus, se realizaron experimentos de concentración-respuesta de 24 h en medio acelular en caldo de cultivo Mueller-Hinton.

Infección celular y evaluación de las actividades intracelulares de los antibióticos. La infección de células THP-1 y la

evaluación de la actividad intracelular de los antibióticos se realizaron usando métodos convencionales para *S. aureus* y *L. monocytogenes*, o con adaptaciones menores para *L. pneumophila* usando (i) una multiplicidad de infección de 10 bacterias por macrófago y (ii) gentamicina (50 mg/litro) durante 30 a 45 min para la eliminación de las bacterias no fagocitadas.

5

Análisis estadísticos. Los análisis estadísticos de ajuste de curva se realizaron con GraphPad Prism versión 4.03 y GraphPad InStat versión 3.06 (GraphPad Software, San Diego, CA).

EJEMPLO. Susceptibilidad hacia *S. aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* EGD, y *Legionella pneumophila* ATCC 33153. CEM-101 mostró MIC inferiores que AZI frente a los tres organismos seleccionados (*S. aureus*, 0,06 y 0,5 mg/litro; *L. monocytogenes*, 0,004 y 1 mg/litro; y *L. pneumophila*, 0,004 y 0,016 mg/litro) en ensayos de susceptibilidad convencionales. Las MIC de CEM-101, TEL, AZI y CLR frente a *S. aureus* y *L. monocytogenes* se midieron en caldo de cultivos ajustados a valores de pH que variaban de 5,5 a 7,4. El intervalo se seleccionó para incluir los valores a los que los antibióticos podrían exponerse en el medio extracelular o intracelularmente para los dos organismos considerados. Como se ilustra en la figura 3, los cuatro fármacos mostraron un descenso marcado de la potencia frente a ambos organismos cuando el pH se disminuyó de 7,4 a 5,5, demostrando AZI la pérdida más significativa de actividad. CEM-101 conservó la mayor actividad, mostrando uniformemente las menores MIC a lo largo de todo el intervalo de pH investigado, con valores (mg/litro) que variaban de 0,06 (pH 7,4) a 0,5 (pH 5,5) para *S. aureus* (ATCC 25923) y de 0,0039 (pH 7,4) a 0,25 (pH 5,5) para *L. monocytogenes* (EDG). Para *L. pneumophila* (datos no mostrados), la MIC de CEM-101 aumentó de 0,005 a 0,01 y la de AZI de aproximadamente 0,01 a 0,25 mg/litro cuando el pH del caldo de cultivo se redujo de 7,4 a 6,5 (no pudo hacerse ninguna determinación a valores de pH inferiores debido a la ausencia de crecimiento).

EJEMPLO. Efectos temporales y de concentración frente a *S. aureus* extracelular e intrafagocítico. Se obtuvieron las curvas del tiempo hasta la muerte a corto plazo (6 h) para CEM-101 en comparación con las de AZI frente a *S. aureus* (ATCC 25923) en caldo de cultivo y después de la fagocitosis por macrófagos THP-1 usando dos concentraciones fijas individuales de 0,7 y 4 mg/litro. La concentración inferior se escogió para ser relevante a la concentración sérica de AZI y CEM-101, y la mayor concentración se seleccionó para estar por encima de la MIC de AZI para los organismos de interés. Los resultados presentados en la figura 5 muestran que en estas condiciones, únicamente CEM-101 fue capaz de disminuir significativamente las UFC en caldo de cultivo, así como en los macrófagos THP-1 a la concentración de 0,7 mg/litro. A la concentración de 4 mg/litro en caldo de cultivo, AZI consiguió eventualmente el mismo efecto antibacteriano que CEM-101, pero a una menor velocidad (5 h en comparación con 1 h). En los macrófagos THP-1, no se detectó ninguna actividad consecuente para AZI, ni siquiera a la concentración de 4 mg/litro, mientras que CEM-101 consiguió de nuevo una reducción de aproximadamente 1,5 UFC \log_{10} , similar a la magnitud observada a la concentración de 0,7 mg/litro. En todas las situaciones con CEM-101, el descenso máximo de UFC se obtuvo en 1 h y se mantuvo posteriormente.

Después, se realizaron experimentos de concentración-respuesta en un punto temporal fijo (24 h) para obtener los descriptores farmacológicos pertinentes de la actividad de CEM-101 (potencia relativa [concentración efectiva al 50 % {EC₅₀}], concentración estática aparente [C_s], y eficacia máxima relativa [E_{máx}]) en comparación con la actividad de CLR, AZI y TEL (se describen detalles adicionales en Barcia-Macay y col., Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 841-851 (2006)). Los datos se presentan en la figura 4 en función de (i) las concentraciones en peso (mg/litro) y (ii) múltiplos de las MIC (como se determina en caldo de cultivo a pH 7,4). Los valores numéricos de los descriptores farmacológicos correspondientes se muestran en la Tabla. Parámetros de regresión pertinentes^a (con intervalos de confianza [CI]), y análisis estadístico de las curvas dosis-respuesta ilustradas en la figura 4.

ES 2 565 083 T3

antibiótico	E _{máx} * (CI)	caldo de cultivo +		C _S [∞]	R ²
		mg/l	EC ₅₀ [∅] (CI)		
CEM-101	-1,37	mg/l	0,03	0,06	0,973
	(-1,67 a -1,08)		(0,02 a 0,06)		
	a; A		a; A		
	x MIC	0,48	0,88		
			(0,26 a 0,91)		
			a; A		
TEL	-1,00	mg/l	0,12	0,96	0,29 0,892
	(-1,78 a -0,22)		(0,03 a 0,52)		
	a; A		b; A		
	x MIC	0,46	6,87		
			(0,11 a 2,06)		
			a; A		
AZI	-1,23	mg/l	1,78	3,4	0,872
	(-2,55 a 0,083)		(0,45 a 7,02)		
	a; A		c; A		
	x MIC	3,55	6,87		
			(0,90 a 14,0)		
			b; A		
CLR	-1,41	mg/l	0,80	2,65	1,32 0,956
	(-1,95 a -0,87)		(0,41 a 1,56)		
	a; A		c; A		
	x MIC	1,59	2,65		
			(0,81 a 3,1)		
			a, b; A		
macrófagos THP-1 ++					
antibiótico	E _{máx} * (CI)	mg/l	EC ₅₀ [∅] (CI)	C ₅ [∞]	R ² (CI)
CEM-101	-0,86	mg/l	0,0068	0,022	0,927
	(-1,36 a -0,37)		(0,0023 a 0,020)		
	a; B		a; B		
	x MIC	0,11	0,35		
			(0,037 a 0,32)		
			a; B		
TEL	-0,29	mg/l	0,024	0,63	0,954
	(-0,70 a 0,12)		(0,007 a 0,088)		
	b; B		b; B		
	x	MIC	0,097		
			0,027 a 0,35		
			a; B		
AZI	0,04	mg/l	0,11	> 50	0,983
	(-0,23 a 0,32)		(0,05 a 0,22)		
	b; B		c; B		
	x	MIC	0,22		
			0,11 a 0,45		
			a; B		
CLR	-0,18	mg/l	0,046	0,84	0,974
	(-0,52 a 0,16)		(0,018 a 0,12)		
	b; B		b, c; B		
	x MIC	0,093	1,68		
			0,035 a 0,25		
			a; B		

^a usando todos los puntos de datos mostrados en la figura 6 (datos de muestras sin antibiótico cuando la concentración extracelular de un antibiótico es inferior a 0,01 x MIC (5))
⁺ inóculo original [tiempo = 0 h]: 0,97 ± 0,24 x 10⁶ UFC/ml (n = 3)
⁺⁺ inóculo original (post-fagocitosis) [tiempo = 0 h]: 2,74 ± 0,55 x 10⁶ UFC/mg de proteína (n = 3)
[♦] Descenso de UFC (en unidades log₁₀) en tiempo = 24 h del inóculo original correspondiente, como se extrapola

para la concentración de antibiótico = ∞; las muestras que produjeron menos de 5 recuentos se consideraron por debajo del nivel de detección.

^Δconcentración (en mg/l o en x MIC) que causa una reducción del inóculo a medio camino entre los valores iniciales (E₀) y máximos (E_{máx}), como se obtiene a partir de la ecuación de Hill (usando un factor de pendiente de 1);

^{∞∞}concentración (en mg/l o en x MIC) que da como resultado un crecimiento bacteriano nulo aparente (número de UFC idénticas al inóculo original), como se determina por intrapolación gráfica; Análisis Estadísticos. Análisis de las diferencias entre antibióticos (por columna para las filas correspondientes; ANOVA unidireccional con prueba de Tuckey para múltiples comparaciones entre cada parámetro para todos los fármacos): Las figuras con letras minúsculas diferentes son diferentes significativamente entre sí (p < 0,05). Análisis de las diferencias entre el caldo de cultivo y los macrófagos THP-1 (por fila para las columnas correspondientes; prueba t bilateral independiente): Las figuras con diferentes letras en mayúsculas son significativamente diferentes entre sí (p < 0,05).

Las actividades tanto en caldo de cultivo como en los macrófagos THP-1 se desarrollaron de manera dependiente de la concentración, como se representa por la forma sigmoidea de cada función de mejor ajuste (ecuación de Hill). En el caldo de cultivo, la eficacia relativa de CEM-101 (E_{máx} de -1,37 log₁₀) fue similar a la de los demás fármacos 5 (valores de E_{máx} de -1,00 a -1,41 log₁₀). En los macrófagos THP-1, la eficacia relativa de CEM-101 se disminuyó significativamente en comparación con la del caldo de cultivo (E_{máx} de -0,86 log₁₀), pero no en la misma medida que la de los demás fármacos, que se volvieron básicamente bacteriostáticos únicamente (valores de E_{máx} de 0,04 a -0,29 log₁₀). En una base en peso, CEM-101 tenían mayores potencias relativas (valores E₅₀ inferiores) y menores concentraciones estáticas (valores C_s inferiores) que los tres fármacos comparadores tanto en caldo de cultivo como 10 en macrófagos THP-1. Cuando los datos se analizaron en función de la concentración equipotente (múltiplos de la MIC), estas diferencias en los valores de EC₅₀ se redujeron, indicando que la MIC era el parámetro impulsor principal en este contexto. En el caldo de cultivo, incluso al analizarse como múltiplos de la MIC, CEM-101 y CLR aún mostraron significativamente EC₅₀ inferiores que TEL y AZI.

15 Ejemplo. Actividad frente a *L. monocytogenes* y *L. pneumophila* intrafagocíticos. Se usó el mismo procedimiento que para *S. aureus* para evaluar las actividades de CEM-101 y AZI frente a *L. monocytogenes* y *L. pneumophila* fagocitados para obtener información sobre las relaciones de concentración-efecto y sobre los descriptores farmacológicos pertinentes correspondientes. Como se muestra en la figura 6, se observó una relación compatible con la ecuación de Hill en todos los casos, aunque el crecimiento limitado de *L. pneumophila* hizo el ajuste de las 20 funciones algo más incierto. Cuando los datos se trazaron frente a la concentración en peso, parecía que CEM-101 tenía una potencia relativa mayor (EC₅₀ inferior) que AZI tanto para *L. monocytogenes* como para *L. pneumophila*. Esta diferencia se redujo pero, sin embargo, siguió siendo significativa cuando se trazaron los datos para *L. pneumophila* frente a múltiplos de la MIC, indicando que la MIC era un impulsor importante pero no el impulsor exclusivo de la actividad intracelular contra este organismo. Por el contrario, no se observó ninguna diferencia en las 25 respuestas para *L. monocytogenes* cuando se expresaron los datos como múltiplos de la MIC. Los valores numéricos de los descriptores farmacológicos pertinentes y el análisis estadístico de sus diferencias se muestran en la Tabla.

Parámetros de regresión pertinentes^a (con intervalos de confianza [CI]), y análisis estadístico de las curvas dosis-respuesta ilustradas en la figura 6. 30

antibiótico	E _{máx} ^Δ (CI)	L. monocytogenes EGD +		C _s ^{∞∞}	R ²
		mg/l	EC ₅₀ ^Δ (CI)		
CEM-101	-0,66		0,020	0,11	0,934
	(-1,28 a -0,037)		(0,005 a 0,073)		
	a		A		
		X MIC	5,00		
			(1,36 a 18,5)		
			A		
AZI	-0,81	mg/l	2,66	11,6	0,953
	(-2,11 a 0,48)		(0,91 a 7,73)		
	a		B		
		X MIC	2,66		
			(0,81 a 3,1)		
			A		
		L. pneumophila ATCC 33153			
		++			

antibiótico	$E_{m\acute{a}x}^{\diamond}$ (CI)		EC_{50}° (CI)	C_s^{∞}	R^2
	-1,03	mg/l	0,052	0,018	0,920
CEM-101	(-1,34 a -0,72)		(0,012 a 0,23)		
	a		A		
		x MIC	13,1	4,56	
			(3,02 a 57,0)		
			A		
AZI	-0,83	mg/l	2,86	2,90	0,903
	(-2,00 a 0,34)		(0,17 a 48,6)		
	a		B		
		x MIC	179,0	181	
			(10,5 a 3038)		
			B		

^a usando todos los puntos de datos mostrados en la figura 6 (no se usaron datos de muestras sin antibiótico debido a la evidencia de crecimiento extracelular cuando la concentración extracelular de un antibiótico es inferior a 0,01 x MIC (5)

⁺ inóculo original (post-fagocitosis) [tiempo = 0h; UFC/mg de proteína]: *L. monocytogenes*, $1,67 \pm 0,22 \times 10^6$ (n = 3); *L. pneumophila*, $0,94 \pm 0,60 \times 10^6$. [♦] Descenso de UFC (en unidades logarítmicas) en tiempo = 24 h (*L. monocytogenes*) o 48 h (*L. pneumophila*) del inóculo original correspondiente, como se extrapola para la concentración de antibiótico = ∞ ; las muestras que produjeron menos de 5 recuentos se consideraron por debajo del nivel de detección; [°]concentración (en mg/l o en x MIC) que causa una reducción del inóculo a medio camino entre los valores iniciales (E_0) y máximos ($E_{m\acute{a}x}$), como se obtiene a partir de la ecuación de Hill (usando un factor de pendiente de 1); [∞]concentración (en mg/l o en x MIC) que da como resultado un crecimiento bacteriano nulo aparente (número de UFC idénticas al inóculo original), como se determina por interpolación gráfica; Análisis Estadísticos. Análisis de las diferencias entre los dos antibióticos (por columna para las filas correspondientes; prueba t bilateral independiente): Las figuras con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes entre sí (p < 0,05).

EJEMPLO. Estudios de dosis-respuesta en macrófagos THP-1 infectados frente a *S. aureus* intracelular ATCC 25923. CEM-101 es más potente que AZI, CLR y TEL (C_s inferior). Además, CEM-101 es capaz de reducir el inóculo intracelular ($E_{m\acute{a}x} \sim 1$ log), que no se observa con ninguno de AZI, CLR y TEL.

5

Captación de CEM-101 en las células (ii): función del tipo celular

Células	THP-1 (macrófagos humanos)	J774 (macrófagos murinos)	MDCK (células epit. caninas)	MDCK que sobreexpresa los transportadores de eflujo de MDR1
Cc/Ce en 5 h	~ 50 - 150	~ 60	~45	~ 30

EJEMPLO. Estudios de dosis respuesta ejemplares de CEM-101 frente a los comparadores (AZI, CLR y TEL) contra *S. aureus* intracelular ATCC 25923 (macrófagos THP-1). Véanse la figura 9 y la Tabla.

10

	CEM-101	AZI	CLR	TEL
$E_{m\acute{a}x}$	$-0,80 \pm 0,11$	$0,04 \pm 0,11$	$-0,18 \pm 0,13$	$-0,29 \pm 0,16$
C_s (mg/l)	~0,01	>50	~ 0,86	~ 0,27

EJEMPLO. Actividad intracelular: Estudios comparativos con otros agentes anti-estafilocócicos. Se midió la respuesta estática a la dosis comparativa de los antibióticos frente a *Staphylococcus aureus* intracelular (cepa ATCC 25923) en macrófagos THP-1. Véase la figura 8, las barras representan las MIC (en mg/l) o la dosis estática extracelular.

15

PROCEDIMIENTO. Macrófagos peritoneales de ratón se infectaron con *M. leprae* viable, los fármacos se añadieron y se incubaron a 33 °C durante 3 días. Después de 3 días, los macrófagos se lisaron para liberar el *M. leprae* intracelular, y después se ensayaron para comprobar la viabilidad por radiorespirometría y tinción de viabilidad. CEM-101 muestra eficacia frente a la viabilidad de *M. leprae* intracelular.

20

El aislado Thai-53 de *M. leprae*, mantenido por pases seriados en almohadillas de ratones nu/nu atímicos, se usó para todos los experimentos. Para ensayos axénicos, se incubaron *M. leprae* viables recién cosechados en medio junto con diferentes concentraciones de los fármacos (CEM-101, CLR y rifampicina) durante 7 días a 33 °C. Al final de esta incubación, *M. leprae* tratados con fármaco se sometieron a radiorespirometría para evaluar la viabilidad basada en la oxidación de palmitato y tinción con colorantes de viabilidad para evaluar la extensión del daño de la

25

membrana. Para los ensayos intracelulares, se infectaron macrófagos peritoneales de ratones suizos con *M. leprae* viable recién cosechados a una MOI de 20:1 durante 12 horas. Al final de la infección, las bacterias extracelulares se lavaron y los fármacos se añadieron a diferentes concentraciones y se incubaron durante 3 días a 33 °C. Al final de los 3 días, las células se lisaron para obtener *M. leprae* intracelular para radiorespirometría y tinción de viabilidad.

5

CEM-101 a 0,15 µg/ml fue capaz de reducir significativamente ($P < 0,001$) la viabilidad de *M. leprae* tanto en cultivos axénicos como intracelulares en comparación con los controles. La inhibición por CEM-101 no fue estadísticamente diferente de la inhibición obtenida con CLR en condiciones idénticas y a la misma concentración.

10 EJEMPLO. La alta potencia de CEM-101 frente a *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos del grupo β-hemolítico y viridans, *Staphylococcus* spp. y enterococos se ha documentado en estudios de cribado anteriores realizados usando los métodos de referencia del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Dado que los mecanismos y casos de resistencia están aumentando rápidamente, lo que puede comprometer la clase de MLSB-cetólidos, se evaluó la actividad bactericida (MBC y curvas de eliminación) de CEM-101 con cinco clases seleccionadas de

15 agentes antimicrobianos al ensayar subconjuntos de organismos resistentes de tipo salvaje (WT) y definidos fenotípica/genotípicamente. Las determinaciones de MBC para CEM-101, TEL y CLR usaron los métodos de CLSI para 40 cepas (6 grupos de especies). KC usaron 8 cepas (6 grupos de especies). PAE se ensayó (5 cepas) a una concentración 4 x durante 1 o 2 horas de exposición; control de TEL.

20 Estudios de MBC y curvas de eliminación: Un total de 40 cepas (10 *S. pneumoniae*, 10 *S. aureus*, y 5 cada una de estreptococos β-hemolíticos, estreptococos del grupo viridans, estafilococos negativos a coagulasa [CoNS] y enterococos) se ensayaron por MIC seguidos de determinaciones de MBC usando procedimientos del CLSI (MIC e intervalo de MBC, 0,008-16 µg/ml). La concentración inferior de un agente ensayado que eliminó ≥99,9 % del inóculo inicial se definió como el criterio de valoración de MBC (Tablas 2 y 3). La actividad bactericida del tiempo hasta la

25 muerte se realizó para CEM-101, TEL, CLR y AZI en ocho cepas seleccionadas de acuerdo con los métodos descritos por Moody & Knapp, NCCLS M21-A3 y M26-A. Los compuestos se ensayaron a una MIC 2 x, 4 x, 8 x; y se realizaron recuentos de colonias en T0, T2, T4, T8 y T24.

CEM-101 mostró bajas proporciones de MBC/MIC (≤ 4) para BSA, SA y estafilococos negativos a coagulasa; y una potencia 2 veces mayor que TEL. SA, los enterococos y algunas cepas resistentes a macrólidos/CLN (R) tuvieron proporciones mayores. Los resultados de KC mostraron una actividad cidal más rápida y mayor (dependiente de la concentración) para CEM-101 en comparación con TEL. CEM-101 mostró actividad cidal frente a varias especies Gram-positivas a velocidades y una extensión mayores que TEL.

35 Distribución de aislados de acuerdo con la proporción MBC/MIC para CEM-101, TEL, CLR y AZI

Organismo/Agente antimicrobiano (Nº ensayado)	Nº de cepas con valor MBC/MIC de:					
	1	2	4	8	16	≥32
<i>S. pneumoniae</i> (10)						
CEM-101	3	5	0	0	0	2
Telitromicina	2	6 ^a	0	0	0	2
Claritromicina	2	3	1	0	0	- ^b
Azitromicina	2	4	0	0	0	- ^b
Estreptococos β-hemolíticos (5)						
CEM-101	0	1	2	0	0	2
Telitromicina	0	1	1	1	0	2
Claritromicina	0	0	1	1	0	2 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	2	2 ^b
Estreptococos del grupo viridans (5)						
CEM-101	3	0	1	0	0	1
Telitromicina	2		1	0	0	1
Claritromicina	0	0	1	0	0	3 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	1	3 ^b
<i>S. aureus</i> (10)						
CEM-101	1	0	0	0	1	8
Telitromicina	0	0	0	0	0	10
Claritromicina	0	0	0	0	0	6 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	6 ^b
Estafilococos neg. a coagulasa (5)						
CEM-101	1	1	0	3	0	0

Telitromicina	0	0	0	0	2	3
Claritromicina	0	0	0	0	0	4 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	4 ^b
<i>Enterococcus</i> spp. (5)						
CEM-101	0	0	0	0	0	5
Telitromicina	0	0	0	0	0	5
Claritromicina	0	0	0	0	0	2 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	2 ^b
a. Incluye seis aislados con una MIC de $\leq 0,008 \mu\text{g/ml}$ y una MBC de $0,015 \mu\text{g/ml}$ (comparaciones fuera de escala).						
b. MBC no se evaluó en aislados con resultados de MIC de nivel resistente.						

CEM-101 mostró una rápida actividad bactericida (reducción de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/ml) frente a cepas susceptibles a macrólidos de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* (únicamente a MIC 8 x) y estreptococos del grupo viridans, así como *S. pyogenes* resistentes a macrólidos. CEM-101 produjo una mayor reducción de UFC/ml y una eliminación más rápida en comparación con TEL o los macrólidos CLR y AZI.

Resumen de resultados de la curva de tiempo hasta la muerte.

Organismo	Agente antimicrobiano	Actividad antimicrobiana
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	CEM-101	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x
	Telitromicina	Cidal a 8 x únicamente
	Claritromicina	Cidal a 8 x únicamente
	Azitromicina	Cidal a 8 x únicamente
<i>S. epidermidis</i> (095-2777A)	CEM-101	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x
	Telitromicina	Estática
	Claritromicina	Estática
	Azitromicina	Estática
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	CEM-101	Estática
	Telitromicina	Estática
	Claritromicina	Estática
	Azitromicina	Estática
<i>S. pneumoniae</i> (ATCC 49619)	CEM-101	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x
	Telitromicina	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x
	Claritromicina	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x (muerte lenta)
	Azitromicina	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x (muerte lenta)
<i>S. pneumoniae</i> (075-241B)	CEM-101	Estática
	Telitromicina	Estática
<i>S. pyogenes</i> (117-1612A)	CEM-101	Cidal a 8 x únicamente
	Telitromicina	Cidal a 8 x únicamente (muerte lenta)
	Claritromicina	Cidal a 8 x únicamente (muerte lenta)
	Azitromicina	Cidal a 8 x únicamente (muerte lenta)
<i>S. pyogenes</i> (088-11708A)	CEM-101	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x
	Telitromicina	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x (muerte lenta)
<i>S. mitis</i> (112-1885A)	CEM-101	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x
	Telitromicina	Cidal a 2 x, 4 x, 8 x
	Claritromicina	Cidal a 8 x únicamente (muerte lenta)
	Azitromicina	Cidal a 4 x y 8 x (muerte lenta)

10 CEM-101 mostró actividad bactericida al ensayarse frente a estreptococos susceptibles a macrólidos, CoNS y *S. pneumoniae* susceptibles a CLN y resistentes a macrólidos. Las proporciones de MBC/MIC para CEM-101 pueden ser altas para *S. aureus*, pero algunas cepas mostraron resultados de MBC que permanecieron dentro del intervalo susceptible de las concentraciones.

15 EJEMPLO. Actividad sobre Chlamydia. Se proporcionaron CEM-101, TEL, AZI, CLR y doxiciclina en forma de polvos y solubilizadas de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Las suspensiones de fármacos se fabricaron frescas cada vez que se realizó el ensayo.

20 *C. pneumoniae*: Los aislados de *C. pneumoniae* ensayados incluían una cepa de referencia (TW 183), 9 aislados de niños y adultos con neumonía de Estados Unidos (AR39, T2023, T2043, W6805, CWL 029, CM-1), un aislado de un niño con neumonía de Japón (J-21), y 2 cepas de especímenes de lavado broncoalveolar de pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y neumonía de Estados Unidos (BAL15 y BAL16).

C. trachomatis: 10 aislados de C. trachomatis, incluyendo aislados estándares de la ATCC (E-BOUR, F-IC-CAL3, C-HAR32, J-UW-36, L2434, D-UW-57kx, B- HAR-36) y aislados clínicos recientes (N18 (cervical), N19 (cervical), 7015 (ojo de infantil))

5

Ensayos de susceptibilidad *in vitro*: El ensayo de susceptibilidad de C. pneumoniae y C. trachomatis se realizó en cultivo celular usando células HEp-2 cultivadas en placas de microtitulación de 96 pocillos. Cada pocillo se inoculó con 0,1 ml de la cepa de ensayo diluida para producir de 10³ a 10⁴ IFU/por ml, se centrifugó a 1.700 x g durante 1 h y se incubó a 35 °C durante 1 h. Los pocillos se aspiraron y se revistieron con 0,2 ml de medio que contenía 1 µg de

10 cicloheximida por ml y diluciones seriadas dos veces del fármaco de ensayo.

Se inocularon placas duplicadas. Después de la incubación a 35 °C durante 48-72 h, los cultivos se fijaron y se tiñeron para inclusiones con anticuerpo conjugado con fluoresceína para el antígeno del género lipopolisacárido (Pathfinder, Kallestad Diagnostics, Chaska, Minn). La concentración inhibitoria mínima (MIC) es la concentración de

15

antibióticos inferior a la que no se observó ninguna inclusión. La concentración bactericida mínima (MBC) se determinó aspirando el medio que contenía el antibiótico, lavando los pocillos dos veces con solución salina tamponada con fosfato y añadiendo medio sin antibiótico. Los cultivos se congelaron a -70 °C, se descongelaron, se pasaron sobre nuevas células, se incubaron durante 72 h, después se fijaron y se tiñeron como anteriormente. La MBC es la concentración de antibióticos inferior que no da como resultado ninguna inclusión después del pase.

20 Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Actividades de CEM-101 y otros antibióticos frente a 10 aislados de C. pneumoniae

Fármaco	MIC (µg/ml)			MBC (µg/ml)	
	Intervalo	50 %	90 %	Intervalo	90 %
CEM 101	0,25-1,0	0,25	0,25	0,25-1,0	0,25
Telitromicina	0,015-0,25	0,06	0,06	0,015-0,25	0,06
Azitromicina	0,015-0,125	0,125	0,125	0,015-0,125	0,125
Claritromicina	0,015-0,125	0,06	0,06	0,015-0,125	0,06
Doxiciclina	0,015-0,06	0,06	0,06	0,015-0,06	0,06

25

Actividades de CEM-101 y otros antibióticos frente a 10 aislados de C. trachomatis

Fármaco	MIC (µg/ml)			MBC (µg/ml)	
	Intervalo	50 %	90 %	Intervalo	90 %
CEM 101	0,125-0,5	0,25	0,25	0,125-0,5	0,25
Telitromicina	0,015-0,25	0,06	0,06	0,015-0,25	0,06
Azitromicina	0,015-0,125	0,125	0,125	0,015-0,125	0,125
Claritromicina	0,015-0,125	0,06	0,06	0,015-0,125	0,06
Doxiciclina	0,015-0,06	0,06	0,06	0,015-0,06	0,06

Los resultados de este estudio demostraron que CEM-101 tiene una actividad *in vitro* frente a C. trachomatis y C. pneumoniae comparable a otros macrólidos y cetólidos.

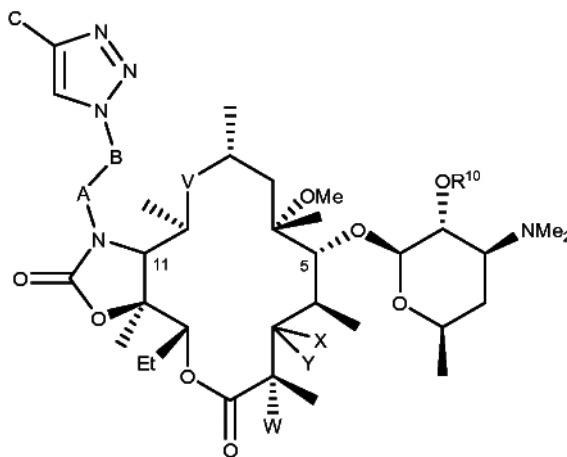
30

EJEMPLO. Distribución tisular. CEM-101 se absorbió bien y se distribuyó al tejido. En la rata a 250 mg/kg/d, las concentraciones medias en pulmón e hígado de CEM-101 fueron 17 y 15 veces mayores que en plasma. Las concentraciones en pulmón e hígado fueron 503 y 711 veces mayores que las concentraciones en plasma a la dosis de 200 mg/kg/d en monos. Las concentraciones de CEM-101 en el corazón fueron significativamente inferiores que

35 los niveles encontrados en el pulmón o el hígado con niveles 5 y 54 veces mayores que las concentraciones en plasma en rata y mono, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto para uso en el tratamiento de una enfermedad causada, al menos en parte, por un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* y *Burkholderia mallei*, y combinaciones de los mismos; donde el compuesto es de la fórmula



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

10

R¹⁰ es hidrógeno o acilo;

X es H; e Y es OR⁷; donde R⁷ es un monosacárido o disacárido, alquilo, arilo, heteroarilo, acilo o C(O)NR⁸R⁹, donde cada uno de R⁸ y R⁹ se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, aralquilo, alquilarilo, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, dimetilaminoalquilo, acilo, sulfonilo, ureido y carbamoilo; o X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar carbonilo;

15

V es C(O), C(=NR¹¹), CH(NR¹², R¹³), o N(R¹⁴)CH₂, donde N(R¹⁴) está unido al carbono C-10; donde R¹¹ es hidroxilo o alcoxi, cada uno de R¹² y R¹³ se selecciona independientemente de entre el grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, aralquilo, alquilarilo, alcoxi, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, dimetilaminoalquilo, acilo, sulfonilo, ureido y carbamoilo; R¹⁴ es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, aralquilo, alquilarilo, alcoxi, heteroalquilo, arilo, heteroarilo, dimetilaminoalquilo, acilo, sulfonilo, ureido o carbamoilo;

20

W es H, F, Cl, Br, I u OH;

25

A es CH₂, C(O), C(O)O, C(O)NH, S(O)₂, S(O)₂NH, C(O)NHS(O)₂;

B es (CH₂)_n donde n es un número entero que varía en un rango de entre 0 y 10, o B es una cadena de carbono insaturada de 2-10 carbonos; y

30

C es hidrógeno, hidroxilo, alquilo, aralquilo, alquilarilo, alcoxi, heteroalquilo, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, aminoarilo, alquilaminoarilo, acilo, aciloxi, sulfonilo, ureido o carbamoilo.

2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, donde X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar carbonilo.

35

3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, donde X es H e Y es OR⁷, donde R⁷ es cladinosilo.

4. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, donde A y B se toman juntos para formar propileno, butileno o pentileno.

40

5. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, donde A y B se toman juntos para formar butileno.

6. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, donde C es arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido.

45

7. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde V es -C(O)-.
8. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde W es H o F.
- 5 9. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde A es CH₂, B es (CH₂)_n, y n es un número entero de 2-4.
10. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde C es 3-aminofenilo o 3-piridinilo.
- 10 11. El compuesto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde R¹⁰ es hidrógeno.
12. El compuesto para el uso de la reivindicación 8, donde W es F.
- 15 13. El compuesto para el uso de la reivindicación 10, donde C es 3-aminofenilo.
14. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, donde R¹⁰ es hidrógeno, X e Y se toman junto con el carbono al que están unidos para formar C(O), V es C(O), W es F, A es CH₂, B es (CH₂)_n, n es 3, y C es 3-aminofenilo.
- 20 15. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento de la exposición aguda de un paciente expuesto a uno o más organismos seleccionados de entre el grupo que consiste en Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Francisella tularensis y Burkholderia mallei, y combinaciones de los mismos.

FIG. 1

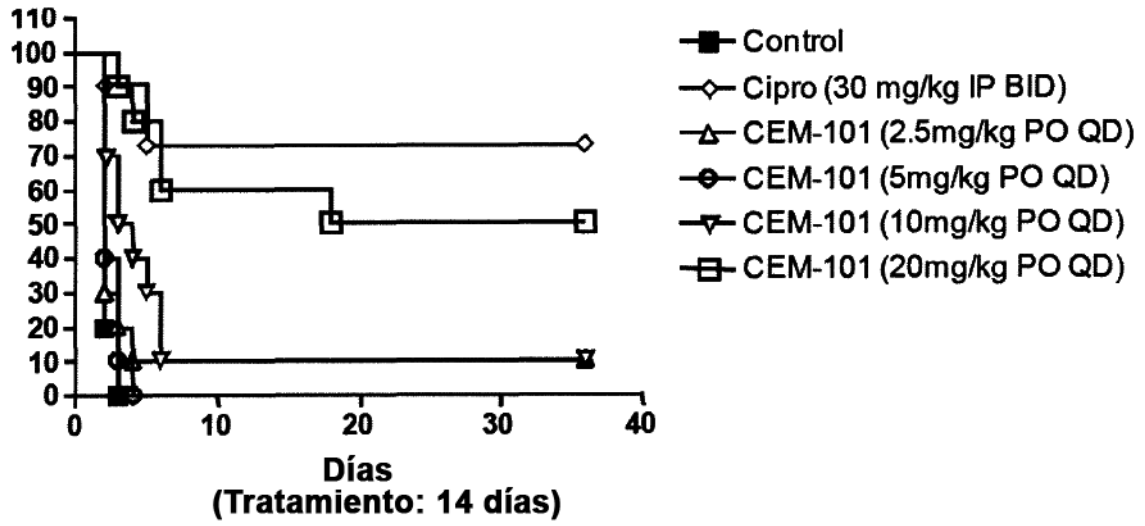


FIG. 2

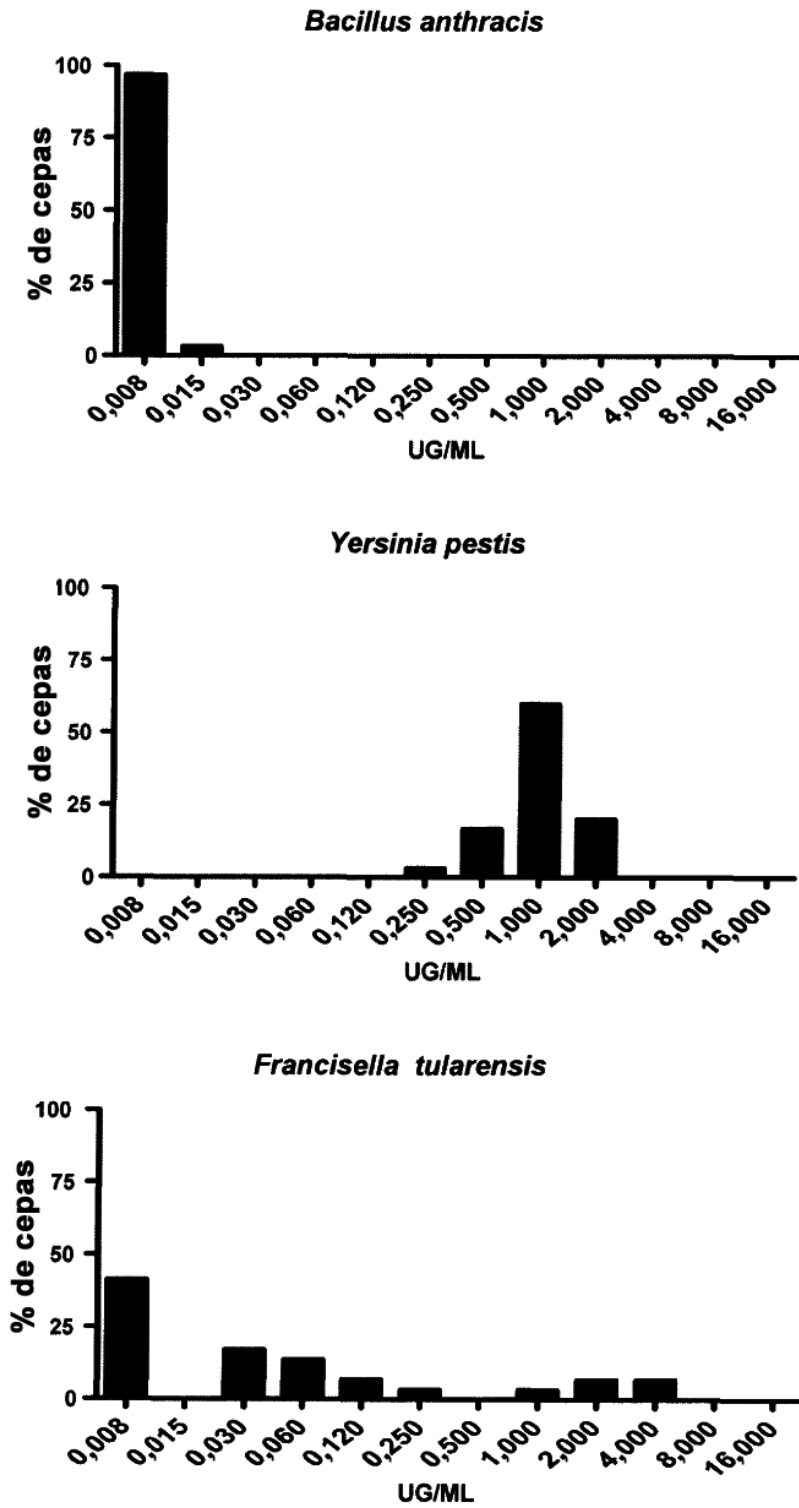
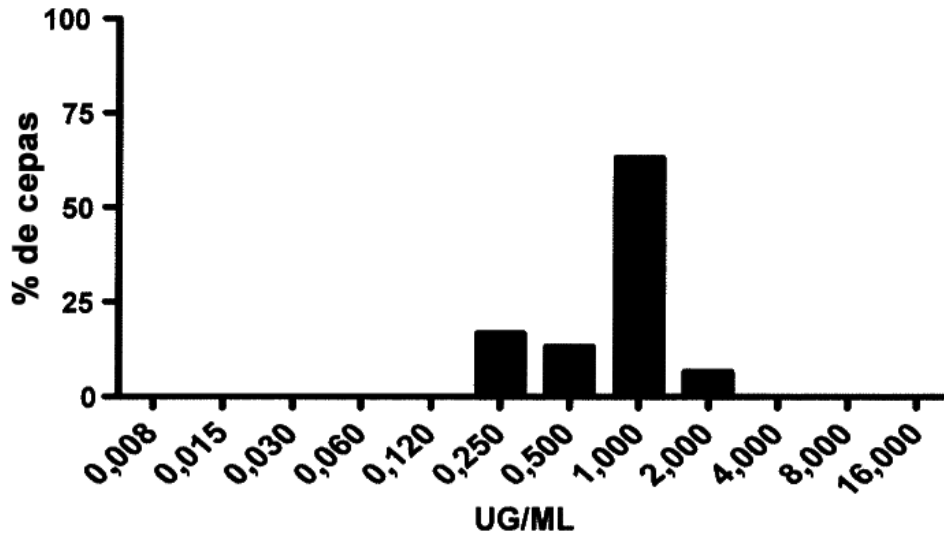


FIG. 2 (CONTINUACIÓN)

Burkholderia mallei



Burkholderia pseudomallei

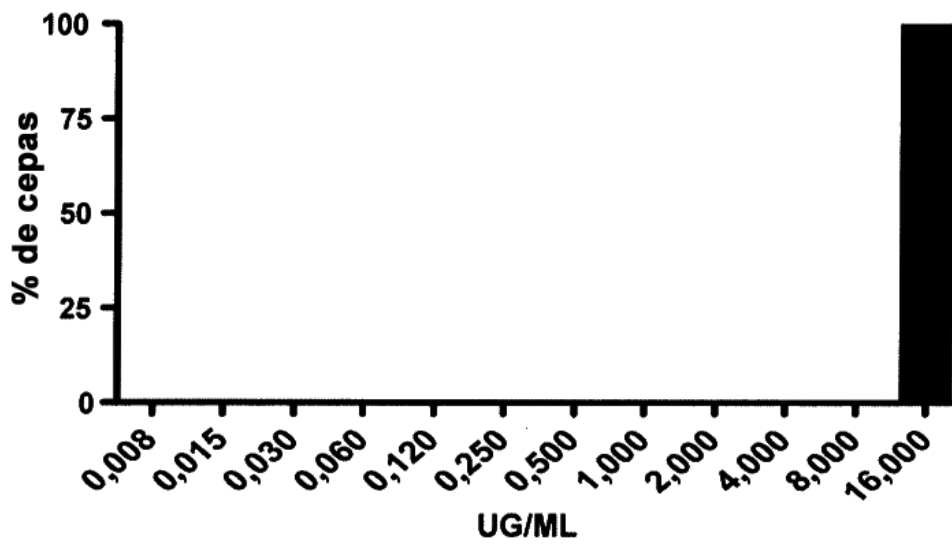


FIG. 3

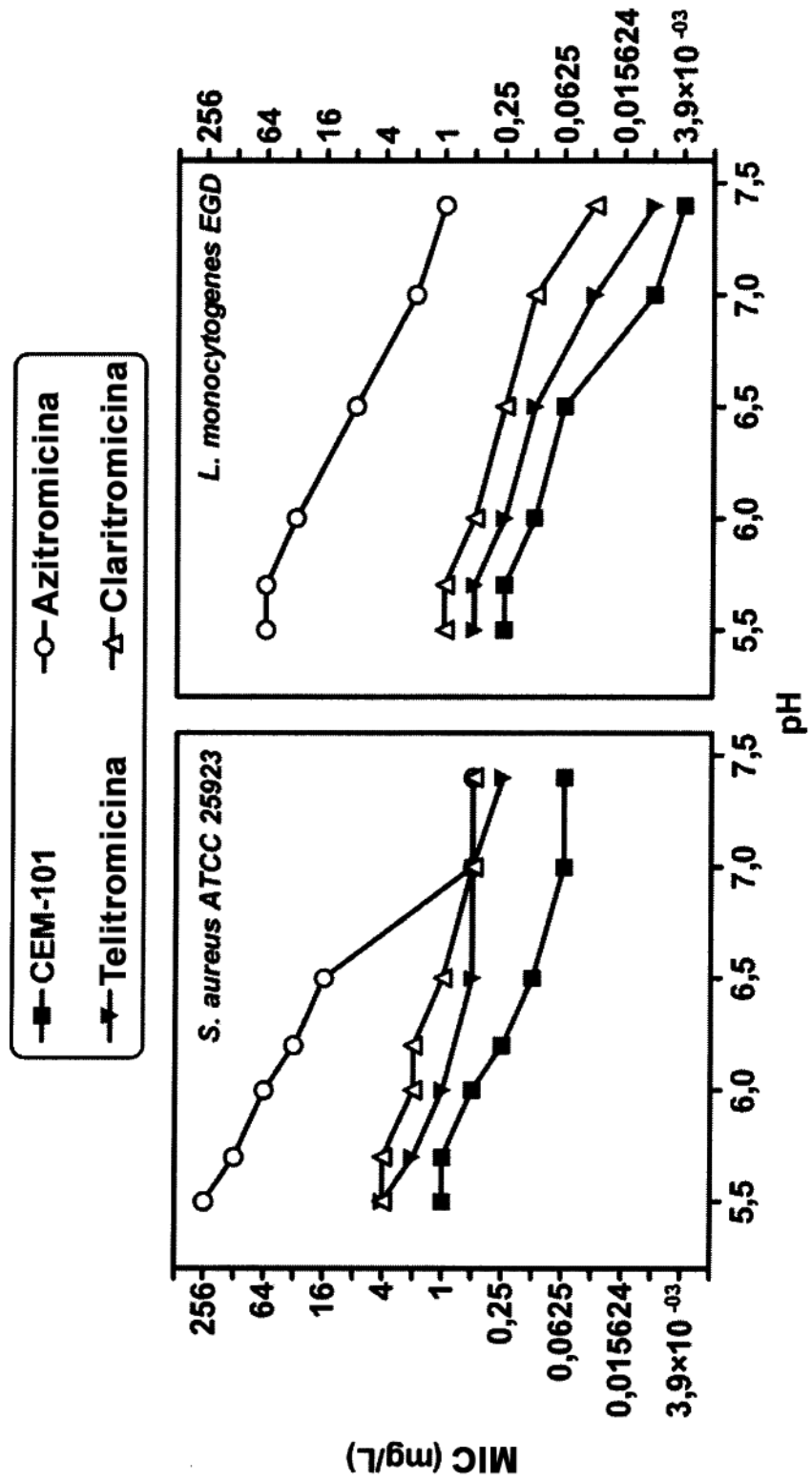


FIG. 4

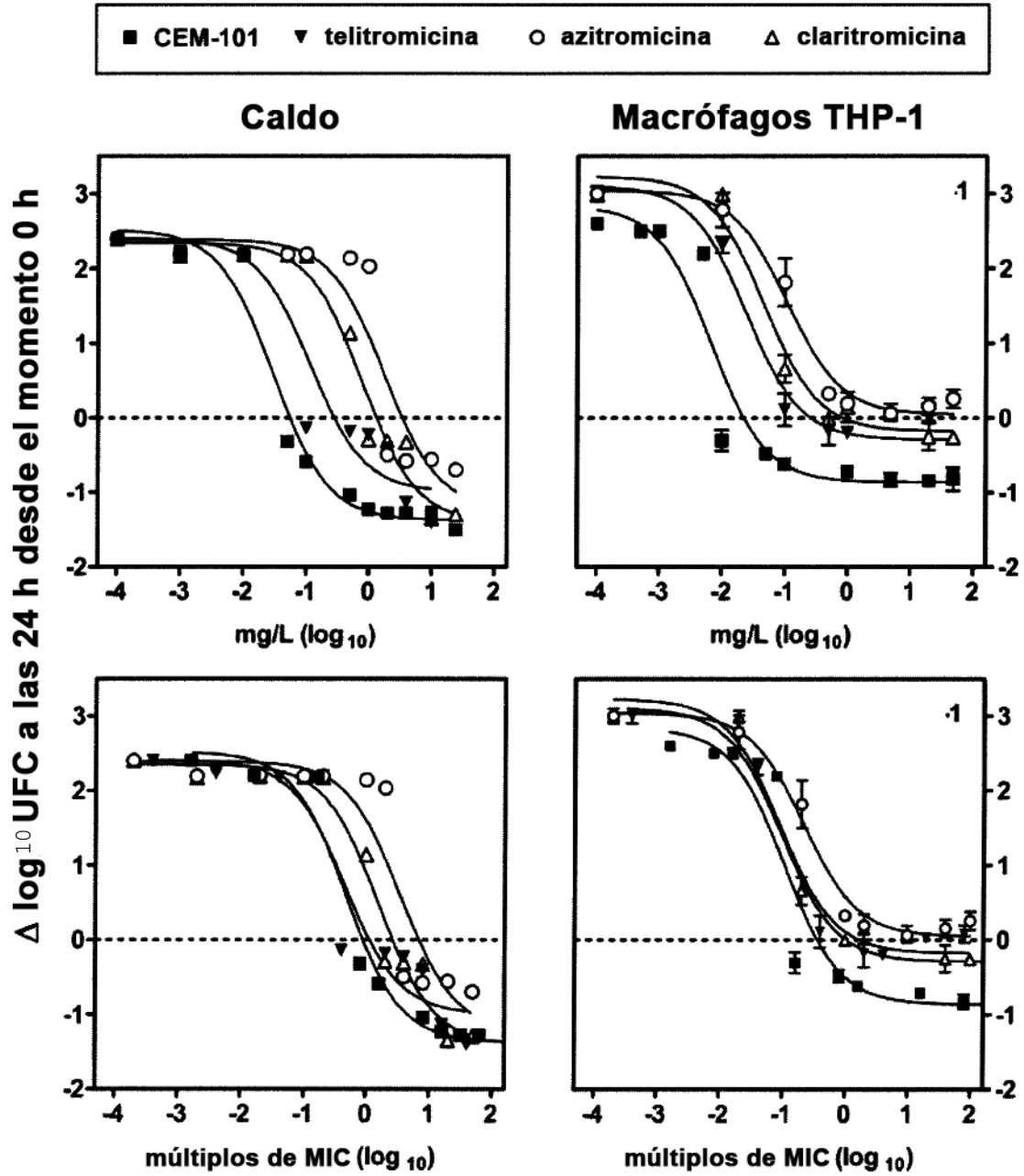


FIG. 5

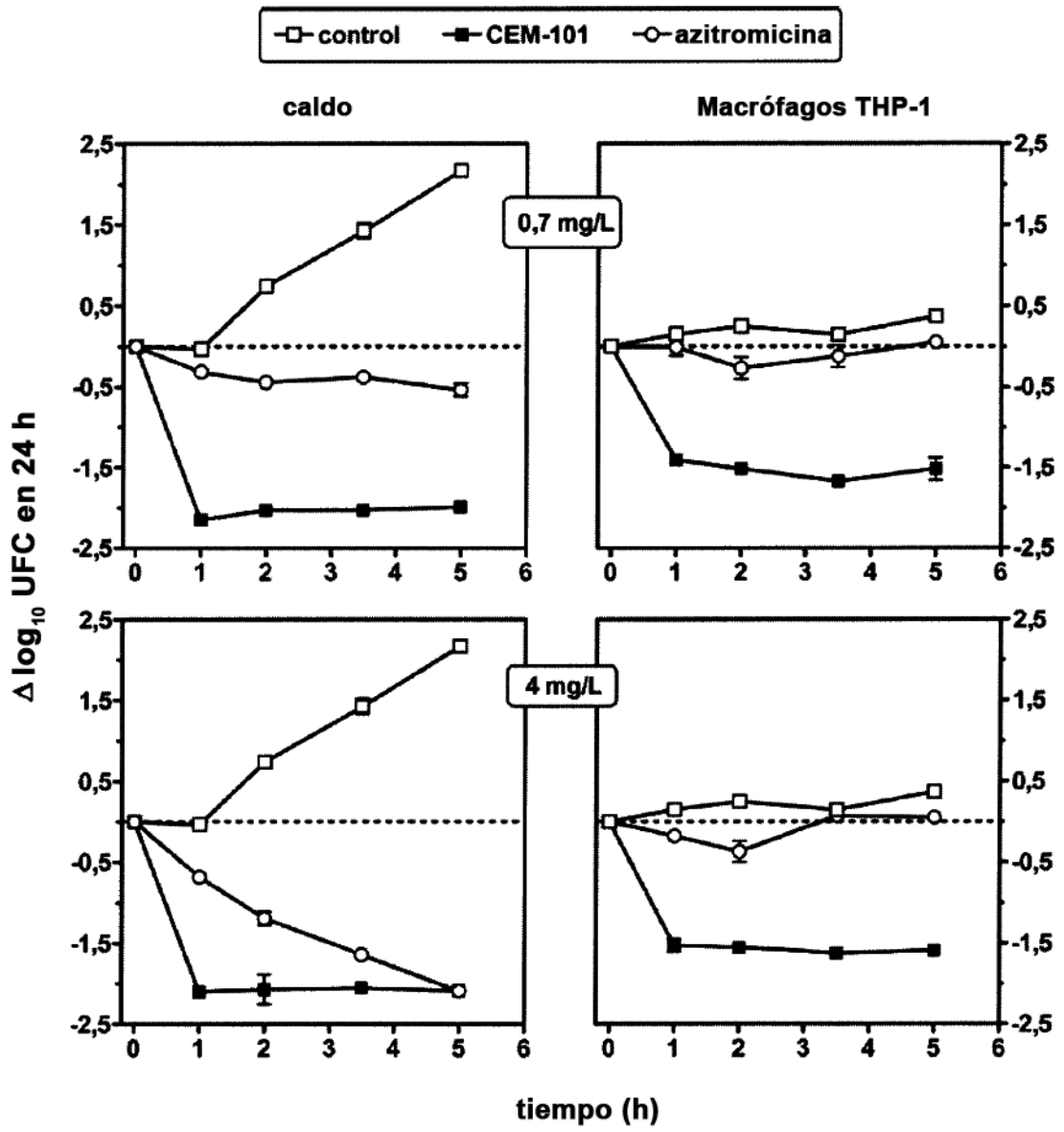


FIG. 6

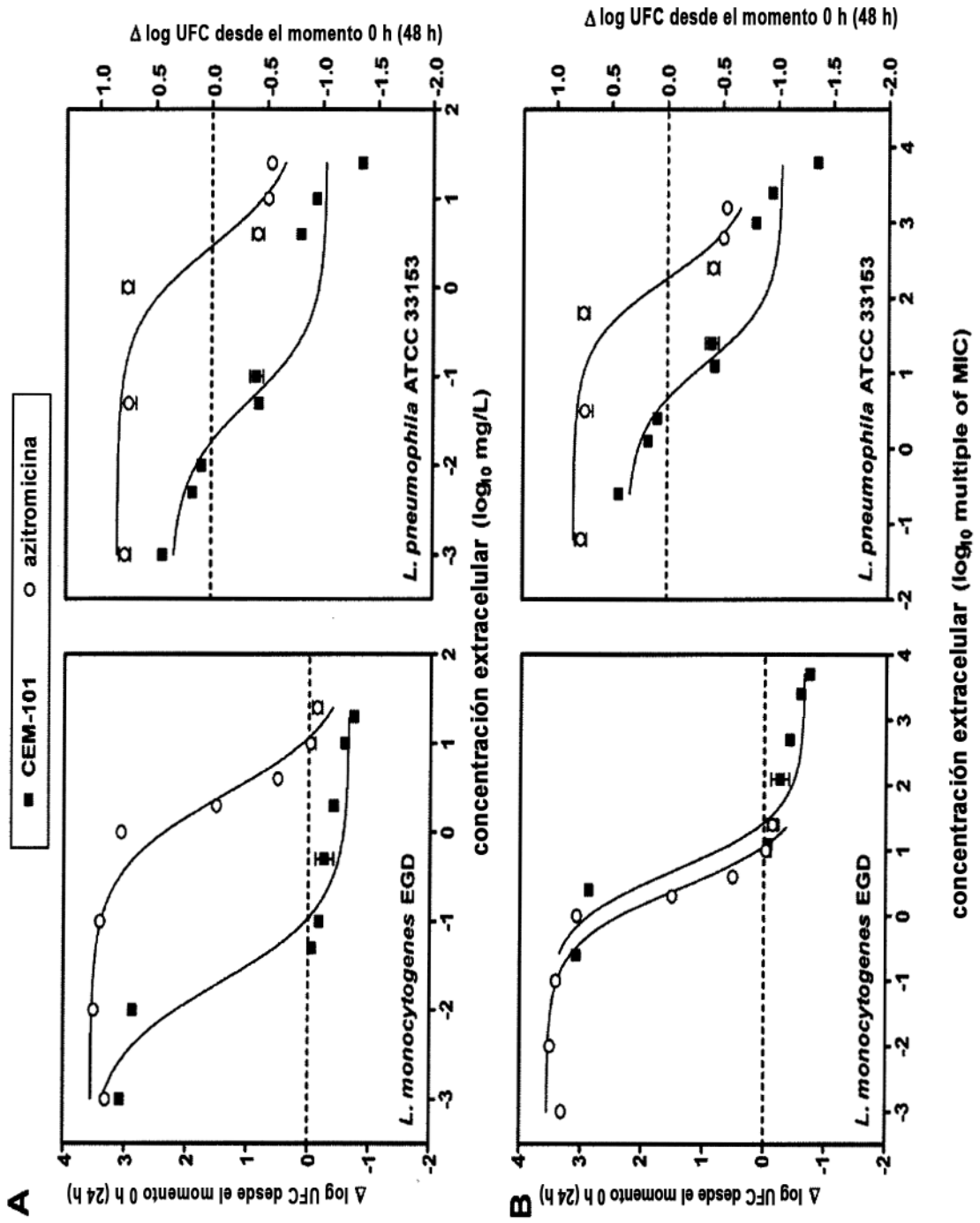


FIG. 7

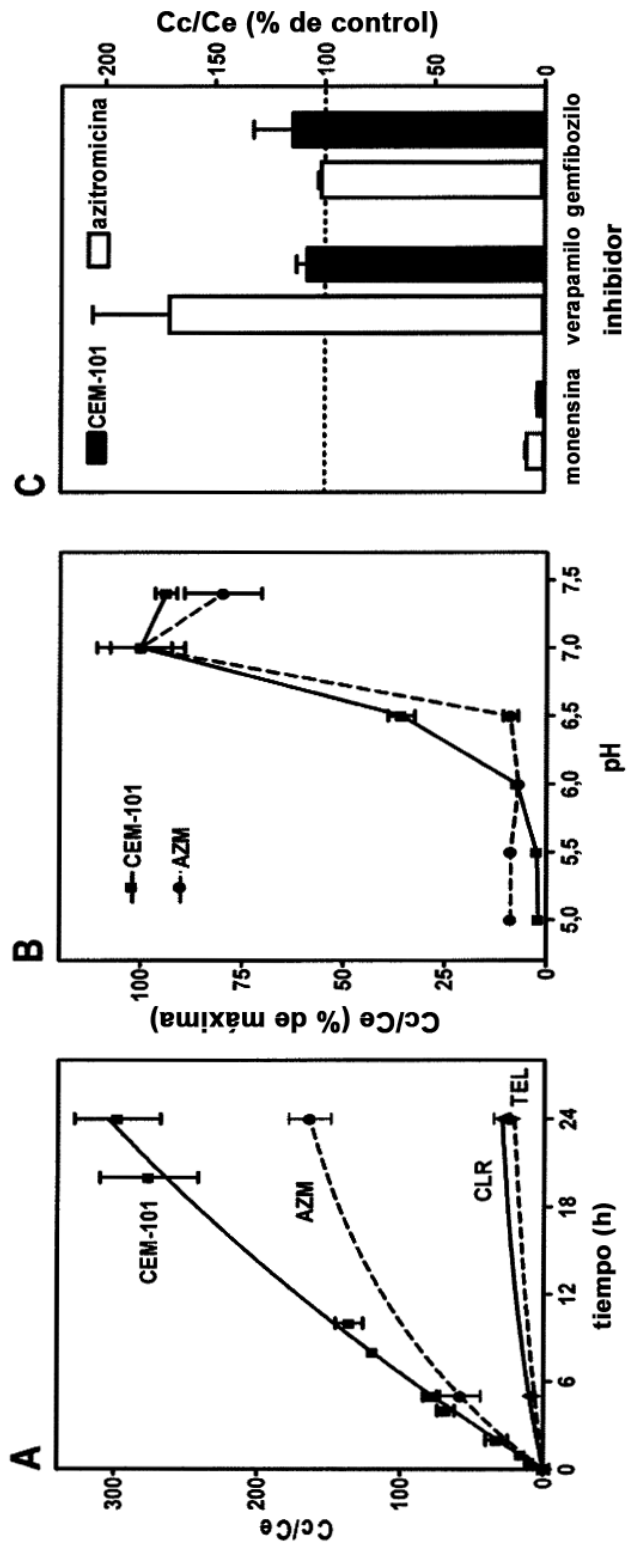


FIG. 8

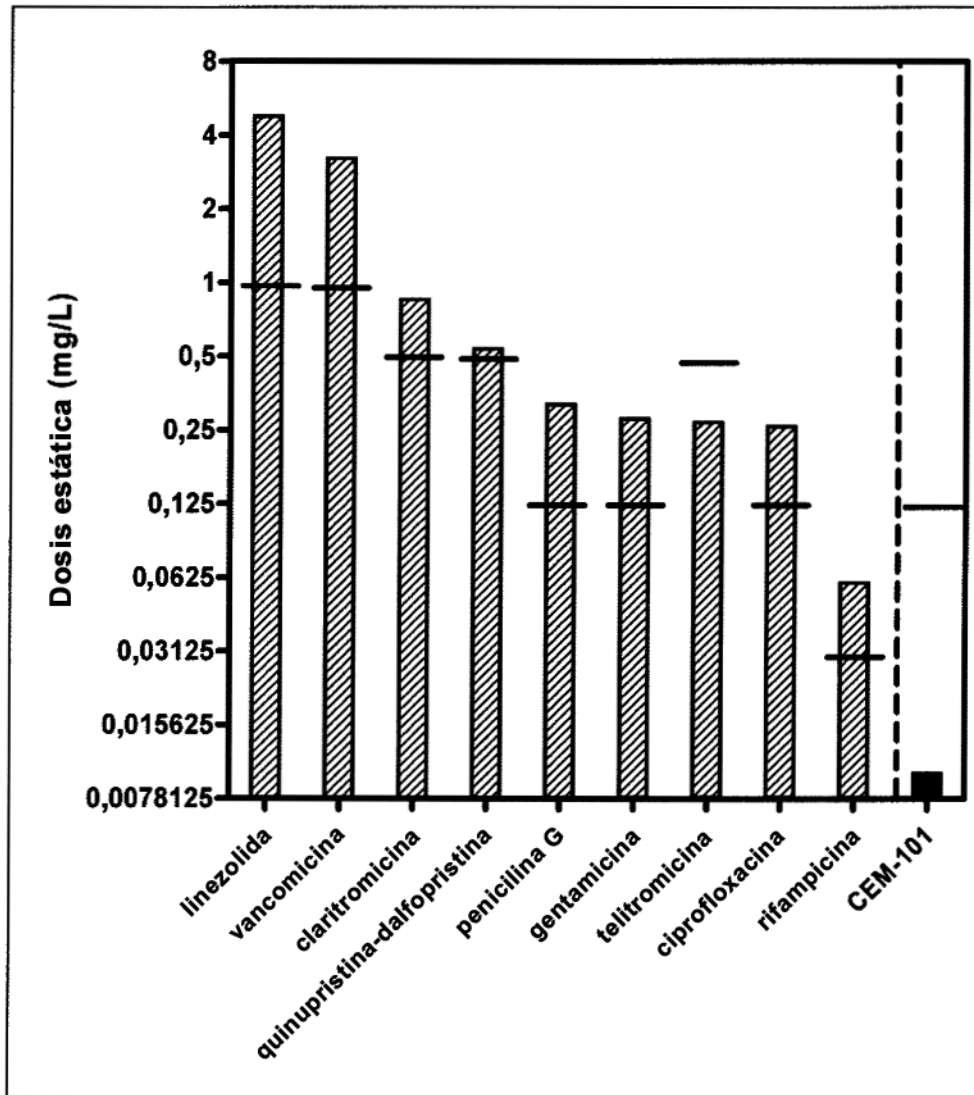


FIG. 9

