

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 753**

51 Int. Cl.:

C07K 11/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2013 PCT/US2013/072838**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14089053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013 E 13812290 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2925772**

54 Título: **Nuevo depsipéptido y usos del mismo**

30 Prioridad:

03.12.2012 US 201261732894 P

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

14.05.2018

73 Titular/es:

**NOVOBIOTIC PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)
767c Concord Avenue
Cambridge, MA 02138, US**

72 Inventor/es:

**PEOPLES, AARON, J.;
HUGHES, DALLAS;
LING, LOSEE, LUCY;
MILLETT, WILLIAM;
NITTI, ANTHONY;
SPOERING, AMY;
STEADMAN, VICTORIA, ALEXANDRA;
CHIVA, JEAN-YVES, CHRISTOPHE;
LAZARIDES, LINOS;
JONES, MICHAEL, KENYON;
POULLENNEC, KARINE, GAELLE;
LEWIS, KIM y
EPSTEIN, SLAVA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 667 753 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).

Nuevo depsipéptido y usos del mismo**Descripción**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Entre los grandes logros de la medicina moderna es el desarrollo y la utilización con éxito de los antimicrobianos contra los microbios que causan enfermedades. Los antimicrobianos han salvado numerosas vidas y reducido las complicaciones de muchas enfermedades e infecciones. Sin embargo, los antimicrobianos actualmente disponibles no son tan efectivos como lo fueron antes.

[0002] Con el tiempo, muchos microbios han desarrollado formas de burlar las acciones antimicrobianas de los antimicrobiales conocidos, y en los últimos años ha habido un aumento mundial de las infecciones causadas por microbios resistentes a múltiples agentes antimicrobianos. Con la mayor disponibilidad y la facilidad de viajar a nivel mundial, la rápida propagación de microbios resistentes a los medicamentos en todo el mundo se está convirtiendo en un problema grave. En la comunidad, la resistencia microbiana puede ser el resultado de la adquisición nosocomial de patógenos resistentes a medicamentos (*p. ej.*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), enterococos resistentes a vancomicina (ERV), aparición de resistencia debido al uso de antibióticos en la comunidad (*p. ej.*, *Neisseria gonorrhoeae* resistente a penicilina y quinolonas), adquisición de patógenos resistentes como resultado de viajes (*p. ej.*, *Shigella* resistente a antibióticos), o como resultado del uso de agentes antimicrobianos en animales con posterior transmisión de patógenos resistentes a humanos (*p. ej.*, antibiótico resistente *Salmonella*). La resistencia a los antibióticos en los hospitales suele ser resultado del uso excesivo de antibióticos y ha sido un problema grave con MRSA, VRE y bacilos gramnegativos resistentes a múltiples fármacos (MDR-GNB) (*p. ej.*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* y *E. coli*). En particular, las infecciones de la corriente sanguínea relacionadas con el catéter por bacterias y las infecciones de la piel y los tejidos blandos (SSTI) se están convirtiendo en un problema creciente.

[0003] Las bacterias, virus, hongos y parásitos tienen toda resistencia desarrollada a los agentes antimicrobianos conocidos. La resistencia suele ser el resultado de tres mecanismos: (i) alteración de la diana del fármaco de manera que el agente antimicrobiano se une mal y, por lo tanto, tiene un efecto reducido en el control de la infección; (ii) un acceso reducido del fármaco a su objetivo como resultado de la penetración del fármaco alterada o la salida activa del fármaco; e (iii) inactivación enzimática del fármaco por enzimas producidas por el microbio. La resistencia a los antimicrobianos proporciona una ventaja de supervivencia a los microbios y hace que sea más difícil eliminar las infecciones microbianas del cuerpo. Esta mayor dificultad en la lucha contra las infecciones microbianas ha llevado a un mayor riesgo de desarrollar infecciones en hospitales y otros entornos. Enfermedades como la tuberculosis, la malaria, la gonorrea y las infecciones infantiles de oído son ahora más difíciles de tratar que hace unas pocas décadas. La resistencia a los medicamentos es un problema importante para los hospitales que albergan pacientes críticamente enfermos que son menos capaces de combatir infecciones sin la ayuda de antibióticos. Desafortunadamente, el uso intensivo de antibióticos en estos pacientes selecciona cambios en los microbios que provocan la resistencia a los medicamentos. Estas bacterias resistentes a los medicamentos son resistentes a nuestros antibióticos más fuertes y afectando a los pacientes vulnerables del hospital. Se ha informado que del 5 al 10 por ciento de los pacientes ingresados en hospitales adquieren una infección durante su estancia y que este riesgo ha aumentado constantemente en las últimas décadas.

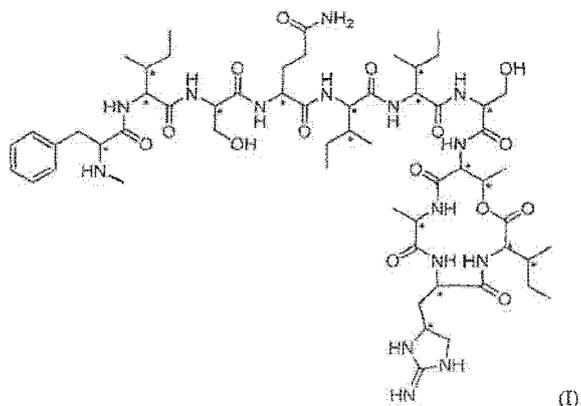
[0004] En vista de estos problemas, existe una creciente necesidad de nuevos agentes antimicrobianos para combatir infecciones microbianas y el problema de aumentar la resistencia a fármacos. Un enfoque renovado en el descubrimiento de medicamentos antimicrobianos es fundamental ya que los patógenos están desarrollando resistencia a los medicamentos disponibles.

[0005] Los compuestos sintéticos han fracasado hasta ahora para reemplazar a los antibióticos naturales y para conducir a nuevas clases de compuestos de amplio espectro, a pesar de los esfuerzos combinados de síntesis combinatoria, el cribado de alto rendimiento, la química médica avanzada, la genómica y la proteómica, y diseño racional de fármacos. El problema con la obtención de nuevos antibióticos sintéticos puede estar relacionado en parte con el hecho de que los antibióticos sintéticos se bombean invariablemente a través de la barrera de la membrana externa de las bacterias mediante bombas de resistencia multidroga (MDR). La membrana externa de las bacterias es una barrera para los compuestos anfipáticos (que esencialmente son todas las drogas), y los MDR extruyen las drogas a través de esta barrera. La evolución ha producido antibióticos que pueden eludir en gran medida este mecanismo dual de barrera/extrusión, pero los compuestos sintéticos casi invariablemente fallan.

60 SUMARIO DE LA INVENCION

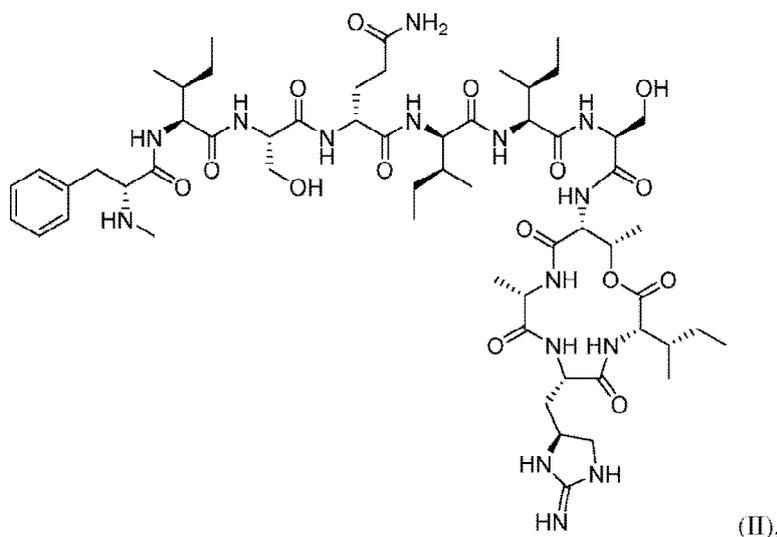
[0006] Esta solicitud está dirigida, al menos en parte, a un nuevo depsipéptido que es útil en el tratamiento de una serie de trastornos, incluyendo infecciones microbianas.

65 [0007] Se describe un compuesto aislado de Fórmula (I):



20 o un enantiómero, diastereómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que cada estereocentro (indicado con un "*"") puede ser la configuración R o S.

25 **[0008]** En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) es un producto natural aislado de una especie bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) es un producto natural aislado del aislado bacteriano ISO18629. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) es producible a partir de una especie bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) es producible a partir del aislado bacteriano ISO18629. La presente invención se refiere a un compuesto aislado de Fórmula (II):

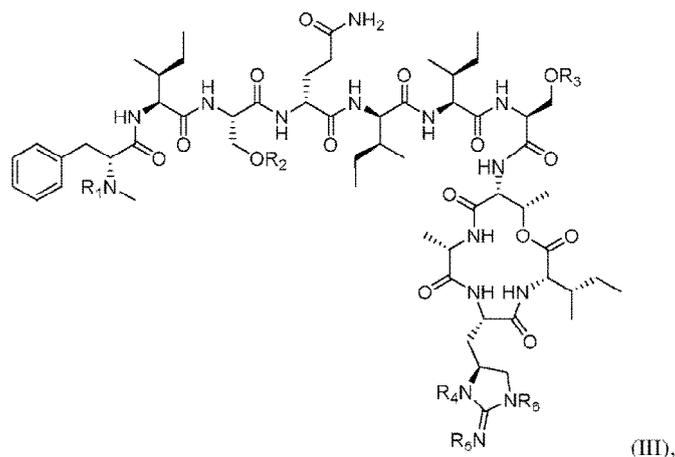


50 o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 **[0009]** En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (II) es un producto natural aislado de una especie bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (II) es un producto natural aislado del aislado bacteriano ISO18629. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (II) es producible a partir de una especie bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (II) es producible a partir del aislado bacteriano ISO18629. El compuesto de Fórmula (I) se caracteriza por al menos diez picos de resonancia magnética nuclear de ¹³C en desplazamientos químicos (+/- 0,2 ppm) en DMSO-d₆ seleccionados de 36,3 ppm, 36,5 ppm, 36,9 ppm, 37,4 ppm, 52,1 ppm, 52,2 ppm, 52,7 ppm, 53,5 ppm, 55,7 ppm, 56,1 ppm, 56,4 ppm, 56,7 ppm, 57,3 ppm, 57,8 ppm, 57,9 ppm, 61,8 ppm y 71,1 ppm. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se caracteriza por picos de resonancia magnética nuclear ¹³C en los desplazamientos químicos (+/- 0,2 ppm) en DMSO-d₆ de 36,3 ppm, 36,5 ppm, 36,9 ppm, 37,4 ppm, 52,1 ppm, 52,2 ppm, 52,7 ppm, 53,5 ppm, 55,7 ppm, 56,1 ppm, 56,4 ppm, 56,7 ppm, 57,3 ppm, 57,8 ppm, 57,9 ppm, 61,8 ppm y 71,1 ppm. El compuesto de Fórmula (I) que se caracteriza por al menos uno de: un peso molecular de aproximadamente 1242,47 g/mol; un espectro de resonancia magnética nuclear de protones sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 1; un espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 2; un espectro de resonancia magnética nuclear COSY sustancialmente igual al que se muestra en la FIG. 3; un espectro de resonancia magnética nuclear DEPT-135 sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 4; un espectro de

resonancia magnética nuclear HSQC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 5; o un espectro de resonancia magnética nuclear HMBC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 6. En otra realización más, las presentes enseñanzas se refieren a un compuesto de Fórmula (I) que se caracteriza por: un peso molecular de aproximadamente 1242,47 g/mol; un espectro de resonancia magnética nuclear de protones sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 1; un espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 2; un espectro de resonancia magnética nuclear COSY sustancialmente igual al que se muestra en la FIG. 3; un espectro de resonancia magnética nuclear DEPT-135 sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 4; un espectro de resonancia magnética nuclear HSQC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 5; y un espectro de resonancia magnética nuclear HMBC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 6.

[0010] En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto aislado de la fórmula (III):

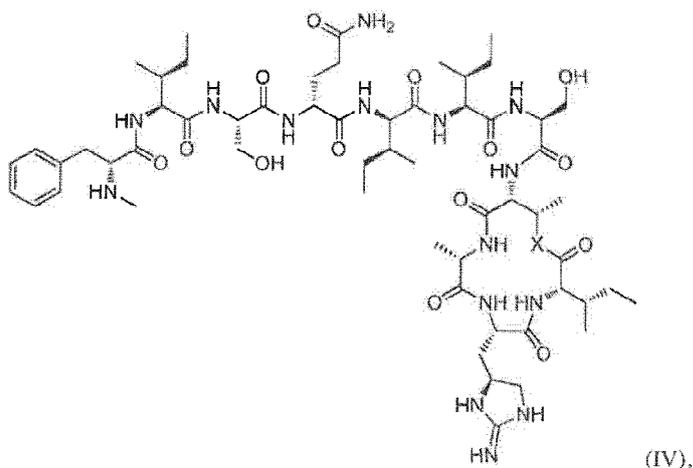


o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Cada R_1 - R_6 se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, $C(=O)R_a$ y $S(=O)_2R_b$; cada R_a es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, o arilo; y cada R_b es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o arilo.

Cualquier carbono o hidrógeno también puede reemplazarse con ^{13}C o 2H , respectivamente.

[0011] Se describe un compuesto aislado de Fórmula (IV):



en donde X es NH, O o S;

o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0012] En aún otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los compuestos descritos en el presente documento, por ejemplo, un compuesto de Fórmula (II) o (III), y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que

comprende cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria puede incluir además un agente seleccionado del grupo que consiste en un antibiótico, un agente antifúngico, un agente antiviral, un agente antiprotozoario, un agente antihelmíntico, un agente antineoplásico, un agente inmunorregulador, un agente anti-hipercolesterolemia y combinaciones de los mismos.

5

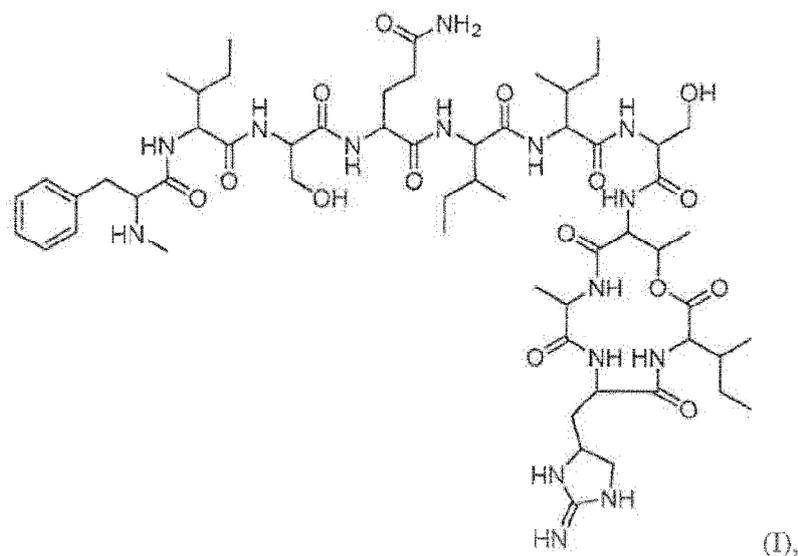
[0013] Se describe un método para producir un compuesto de Fórmula (I):

10

15

20

25



30

o un enantiómero, diastereómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el método el cultivo de un aislado bacteriano, ISO18629 en un cultivo que comprende fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas en condiciones aerobias, produciendo de este modo un compuesto de Fórmula (I). En algunas realizaciones, el método incluye además el aislamiento del compuesto de Fórmula (I) del cultivo.

35

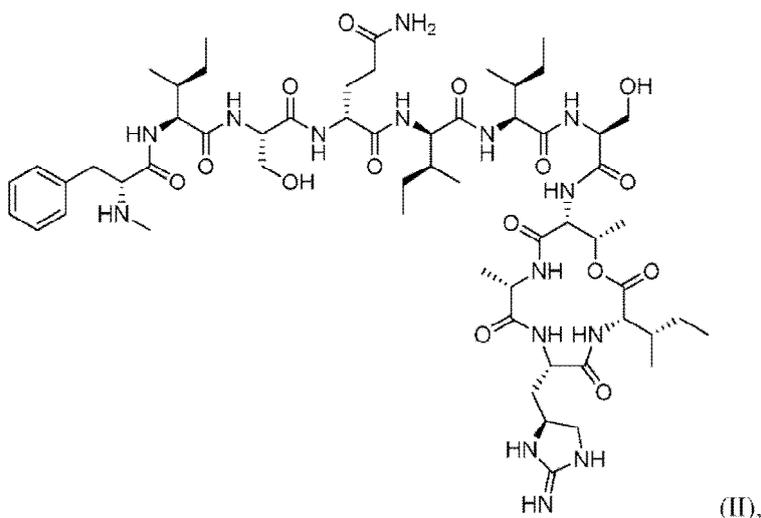
[0014] En todavía otra realización, la presente invención se refiere a un método para producir un compuesto de Fórmula (II):

40

45

50

55



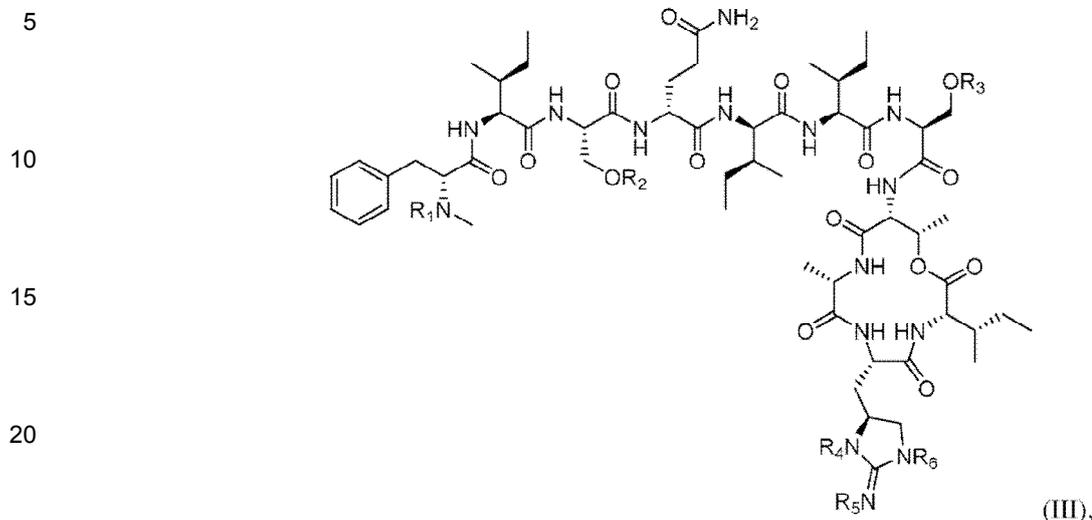
60

o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el método el cultivo de un aislado bacteriano, ISO18629 en un cultivo que comprende fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas en condiciones aerobias, produciendo de este modo un compuesto de Fórmula (II). En algunas realizaciones, el método incluye además el aislamiento del compuesto de Fórmula (II) del cultivo.

65

[0015] En aún otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (II) preparado de acuerdo con el método descrito en el presente documento.

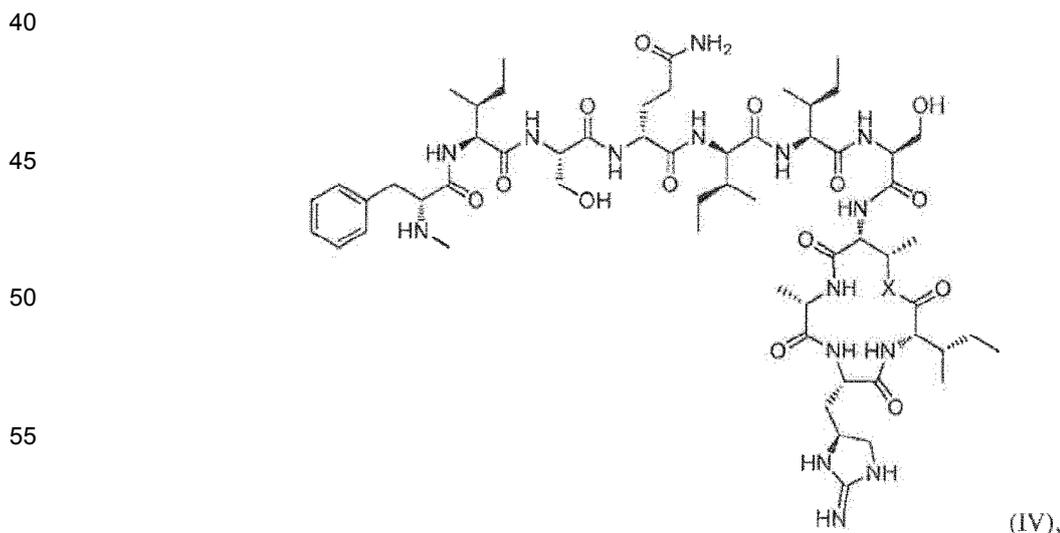
[0016] En todavía otra realización, la presente invención se refiere a un método para producir un compuesto de Fórmula (III):



25 o tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde las variables se describen anteriormente, comprendiendo el método el cultivo de un aislado bacteriano, ISO18629 en un cultivo que comprende fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas en condiciones aerobias, produciendo de este modo un compuesto de Fórmula (III). En algunas realizaciones, ^{13}C o ^2H pueden incorporarse en el compuesto de Fórmula (III) cultivando un aislado bacteriano, ISO18629 en un cultivo que comprende fuentes asimilables de carbono marcado, nitrógeno y sales inorgánicas que están marcadas con ^{13}C y/o ^2H bajo condiciones aeróbicas, produciendo de este modo un compuesto de Fórmula (III) que contiene ^{13}C o ^2H . Por ejemplo, aminoácidos marcados ^{13}C y/o ^2H pueden ser utilizados. En algunas realizaciones, el método incluye además aislar el compuesto de Fórmula (III) del cultivo.

35 [0017] En aún otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (III) preparado de acuerdo con el método descrito en el presente documento.

[0018] Se describe un método para producir un compuesto de Fórmula (IV):



60 o tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde X es NH, O o S; comprendiendo el método el cultivo de un aislado bacteriano, ISO18629 en un cultivo que comprende fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas en condiciones aerobias, produciendo así un compuesto de Fórmula (IV). En algunas realizaciones, el método incluye adicionalmente aislar el compuesto de Fórmula (IV) del cultivo.

65 [0019] En aún otra realización, la presente invención se refiere a un cultivo aislado que comprende una especie

bacteriana, que tiene las características de identificación de un ISO18629.

[0020] La presente invención también se refiere a un método de tratamiento de un trastorno en un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en necesidad del mismo. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en la presente, por ejemplo, un compuesto de Fórmula (II) o (III) tratando de este modo el trastorno en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, un ser humano, un animal o una planta. En una realización específica, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el trastorno es causado por un agente tal como, pero no limitado a, una bacteria, un hongo, un virus, un protozoario, un helminto, un parásito y combinaciones de los mismos.

[0021] En una realización particular, el agente es una bacteria. En una realización, la bacteria es una bacteria Gram-positiva. Los ejemplos no limitantes de bacterias Gram-positivas incluyen *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacteria*, *Listeria*, *Bacillus*, *Erysipelothrix* y *Actinomycetes*. En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se usan para tratar una infección por uno o más de: *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium sporozoites*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (grupo A de *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae pyogenes* (Grupo B de *Streptococcus*), *Streptococcus dysgalactia*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, esporozoitos patógenos *Campylobacter*, esporozoitos de *Enterococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeium*, esporozoitos *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Lepsochloa* y *Actinomyces israelii*. En particular, la bacteria Gram positiva es *Bacillus anthracis*.

[0022] En otra realización, la bacteria es una bacteria Gram-negativa. Ejemplos no limitantes de bacterias Gram-negativas incluyen *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter sporozoites* patógenos, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxitoca*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sporozoites*, *Bacteriodes fragilis*, *Bacteriodes thetaiotaomicron*, *Bacteriodes uniformis*, *Bacteriodes vulgatus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Leptospira*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella salamae*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella diarizonae*, *Salmonella houtenae*, *Salmonella bongori*, *Salmonella indica*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella typhi*, y *Citrobacter freundii*.

[0023] En otras realizaciones, los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos virales. Los ejemplos no limitantes de virus infecciosos que pueden tratarse con los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también mencionado como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV) o VIH-III y otros aislados, como HIV-LP; *Picornaviridae* (*p. ej.*, virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus, virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS)), *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia), *Filoviridae* (por ejemplo, virus de ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la influenza); *Bungaviridae* (*p. ej.*, virus de Hantaan, virus bunga, phlebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (*p. ej.*, Reovirus, orbiviruses y rotavirus); *Bimnaviridae*; *Hepadnaviridae* (por ejemplo, virus de la Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (*p. ej.*, virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (por ejemplo, virus de variola, virus de vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis δ (que se piensa que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis A no B (clase 1 = clase transmitida internamente) 2 = transmitido por los padres, es decir, hepatitis C); Norwalk y virus relacionados, y astrovirus). En realizaciones específicas, los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se usan para tratar un virus de influenza, virus de inmunodeficiencia humana o virus de herpes simple.

[0024] En otras realizaciones, los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de trastornos causados por protozoario. Los ejemplos no limitantes de protozoario que pueden inhibirse por los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen, pero sin limitación, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma gambiense*, *Leishmania donovani* y *Naegleria fowleri*.

[0025] En ciertas realizaciones, los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de trastornos causados por helmintos. Ejemplos de helmintos que pueden ser inhibidos por los compuestos de Fórmula (I), (II), no limitativos (III) o (IV) incluyen, pero no se limitan a: *Schistosoma mansoni*,

Schistosoma cercariae, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma hematobium*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus constaricensis*, *Fasciolopsis Buski*, *Capillaria philippinensis*, *Paragonimus westermani*, *Ancylostoma dudodenale*, *Necator americanus*, *Trichinella spiralis*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Brugia Timori*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxocara vitulorum*, *Caenorhabditis elegans*, y las especies de *Anisakis*.

[0026] En algunas realizaciones, los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de trastornos causados por parásitos. Los ejemplos no limitantes de parásitos que pueden inhibirse por los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen, pero no se limitan a, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium yoelli*, *Hymenolepis nana*, *Clonorchis sinensis*, *Loa loa*, *Paragonimus westermani*, *Fasciola hepatica* y *Toxoplasma gondii*. En realizaciones específicas, el parásito es un parásito de la malaria.

[0027] En realizaciones adicionales, los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) pueden ser útiles para tratar trastornos causados por hongos. Los ejemplos no limitantes de hongos que pueden inhibirse por los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen, pero sin limitación, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium audouinii*, *Microsporium canis*, *Microsporium canis var. distortum*, *Microsporium cookei*, *Microsporium equinum*, *Microsporium ferrugineum*, *Microsporium fulvum*, *Microsporium gallinae*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium nanum*, *Microsporium persicolor*, *Trichophyton ajelloi*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton flavescens*, *Trichophyton gloriae*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes var. erinacei*, *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*, *Trichophyton phaseoliforme*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton rubrum cepa strain*, *Trichophyton rubrum cepa granular*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton simii*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton terrestre*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton vanbreuseghemii*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton yaoundei*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus clavatus*. En aún otra realización, la presente invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento de un agente infeccioso, comprendiendo el método poner en contacto el agente con un compuesto descrito en la presente, por ejemplo, un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), inhibiendo así el crecimiento del agente infeccioso.

[0028] En una realización particular, el agente infeccioso se cultiva *in vitro*.

[0029] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante la siguiente descripción detallada y dibujos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0030] Los anteriores y otros objetos de la presente invención, las diversas características de los mismos, así como la propia invención puede entenderse más completamente a partir de la siguiente descripción, cuando se lee junto con los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es una representación esquemática del espectro de resonancia magnética nuclear de protones (en DMSO- d_6 de un compuesto aislado de una cepa creciente de ISO18629.

La Figura 2 es una representación esquemática del espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (en DMSO- d_6 de un compuesto aislado de una cepa creciente de ISO18629.

La Figura 3 es una representación esquemática del espectro de resonancia magnética nuclear COSY (en DMSO- d_6 de un compuesto aislado de una cepa creciente de ISO18629.

La Figura 4 es una representación esquemática del espectro de resonancia magnética nuclear DEPT-135 (en DMSO- d_6 de un compuesto aislado de una cepa creciente de ISO18629.

La Figura 5 es una representación esquemática del espectro de resonancia magnética nuclear HSQC (en DMSO- d_6 de un compuesto aislado de una cepa creciente de ISO18629.

La Figura 6 es una representación esquemática del espectro de resonancia magnética nuclear HMBC (en DMSO- d_6 de un compuesto aislado de una cepa creciente de ISO18629.

La Figura 7 es un gráfico que representa el efecto de un compuesto de Fórmula (II) sobre la síntesis macromolecular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0031] La presente invención se refiere en general a nuevos depsipéptidos, a procedimientos para la preparación de estos nuevos depsipéptidos, a composiciones farmacéuticas que comprenden los nuevos depsipéptidos, y a métodos de uso de los depsipéptidos novedosos para tratar o inhibir diversos trastornos, por ejemplo, infecciones

bacterianas. La presente invención se refiere a un nuevo antibiótico que tiene una amplia actividad contra muchos patógenos bacterianos, incluyendo cepas resistentes a otros antibióticos, y en particular, patógenos Gram-positivos. Los compuestos descritos en este documento tienen una biodisponibilidad favorable y baja toxicidad.

5 Definiciones

10 **[0032]** Por conveniencia, ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se recogen aquí. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. La definición inicial proporcionada para un grupo o término en este documento se aplica a ese grupo o término a lo largo de la presente especificación individualmente o como parte de otro grupo, a menos que se indique lo contrario.

15 **[0033]** Los artículos "un" y "una" se usa aquí para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

[0034] El término "o" se utiliza aquí para significar, y se utiliza de forma intercambiable con el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20 **[0035]** El término "sustancialmente igual" se usa aquí para significar que dos sujetos que se comparan comparten al menos 90% de una característica común. En ciertas realizaciones, los dos sujetos comparten al menos el 95% de una característica común. En ciertas otras realizaciones, los dos sujetos comparten al menos el 99% de una característica común.

25 **[0036]** El término "aislado" se utiliza aquí para referirse a compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) que está sustancialmente libre de otros materiales asociados en su entorno natural. Por ejemplo, un compuesto aislado puede estar sustancialmente libre de materiales contaminantes, tales como material celular, materiales contaminantes de la célula de la que deriva el compuesto, precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Sustancialmente libre de otros materiales se refiere generalmente a, por ejemplo, menos de 30 **[0036]** aproximadamente 30%, o 20%, o 15%, o 10%, o 5%, o 2% (en peso seco) de impurezas. En algunas realizaciones, los compuestos aislados son sustancialmente puros. En algunas realizaciones, la preparación de un compuesto que tiene menos de aproximadamente 10% (en peso seco) de materiales contaminantes de la célula, o de precursores químicos se considera que es sustancialmente pura. En otras realizaciones, se considera que es sustancialmente pura la preparación de un compuesto que tiene menos de aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, 35 aproximadamente 3%, aproximadamente 2%, aproximadamente 1% (en peso seco) de materiales contaminantes de la célula, o de precursores químicos.

[0037] A menos que se indique lo contrario, se supone que cualquier heteroátomo con valencias insatisfechas tiene átomos de hidrógeno suficientes para satisfacer las valencias.

40 **[0038]** El término "calentamiento" incluye, pero no se limita al calentamiento por calentamiento convencional (por ejemplo, calefacción eléctrica, calefacción de vapor, calefacción de gas, etc.), así como el calentamiento por microondas.

45 **[0039]** El término "excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo o diluyente" tal como se utiliza en este documento significa un material aceptable farmacéuticamente, composición o vehículo, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en llevar o transportar al sujeto agente farmacéutico de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para un 50 paciente.

[0040] El término "tratar" con respecto a un sujeto, se refiere a la mejora de al menos un síntoma del trastorno del sujeto. El tratamiento puede curar el trastorno o la afección, o mejorarla.

55 **[0041]** El término "trastorno" se usa en la presente memoria para significar, y se usa de forma intercambiable con los términos enfermedad o condición, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0042] El término "microbio" se usa aquí para significar un organismo tal como una bacteria, un virus, un protozooario, o un hongo, especialmente uno que transmite la enfermedad.

60 **[0043]** La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de humanos seres, animales y plantas sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

65 **[0044]** A lo largo de la especificación, grupos y sustituyentes de los mismos pueden elegirse para proporcionar

restos y compuestos estables.

Compuestos de la invención

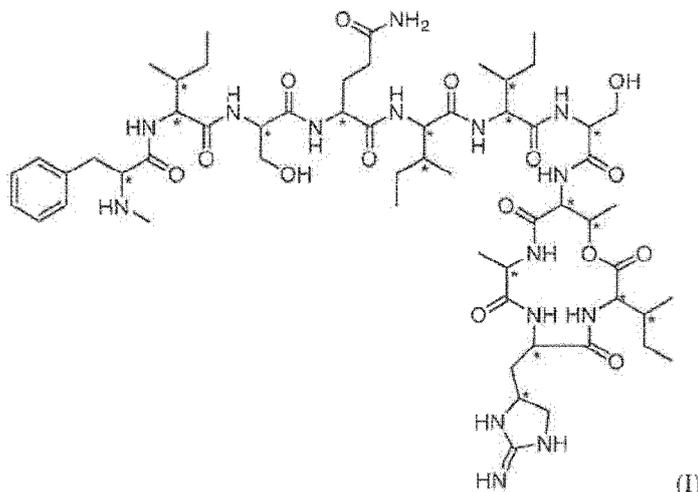
5 **[0045]** Se describen compuestos aislados de Fórmula (I):

10

15

20

25



30

35

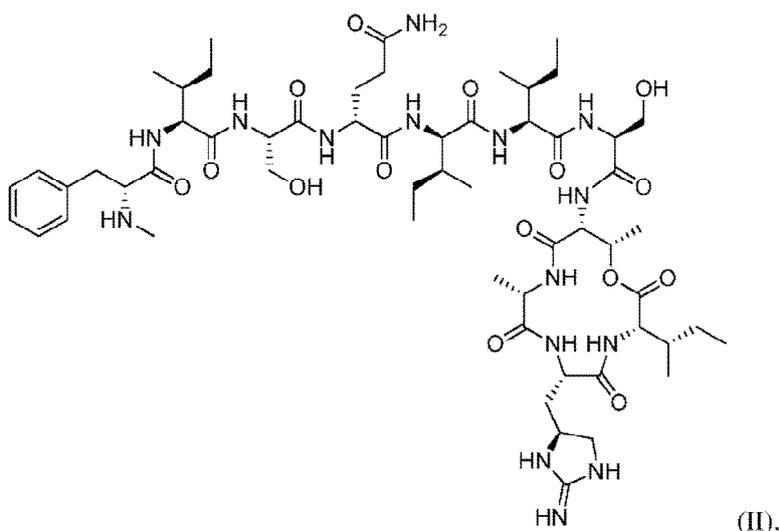
y enantiómeros, diastereómeros, tautómeros o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde cada estereocentro (indicado con un "*"") puede ser la configuración R o S. Por consiguiente, cuando la frase "un compuesto de Fórmula (I)" se usa en el presente documento, se pretende que incluya enantiómeros, diastereómeros, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos depsipeptídicos de la presente invención, y las sales de los mismos, pueden existir en su forma tautomérica (por ejemplo, como una amida o guanidina). Todas estas formas tautoméricas se contemplan aquí como parte de la presente invención. Un compuesto de Fórmula (I), por ejemplo, un compuesto aislado del aislado bacteriano ISO18629, también se puede denominar "NOVO26". En algunas realizaciones, las presentes enseñanzas se refieren a una mezcla de estereoisómeros. En otras realizaciones, las presentes enseñanzas se refieren específicamente a un solo estereoisómero de un compuesto de Fórmula (I). La invención se refiere a un estereoisómero único de un compuesto de Fórmula (I) que es un compuesto de Fórmula (II):

40

45

50

55



60

o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

65

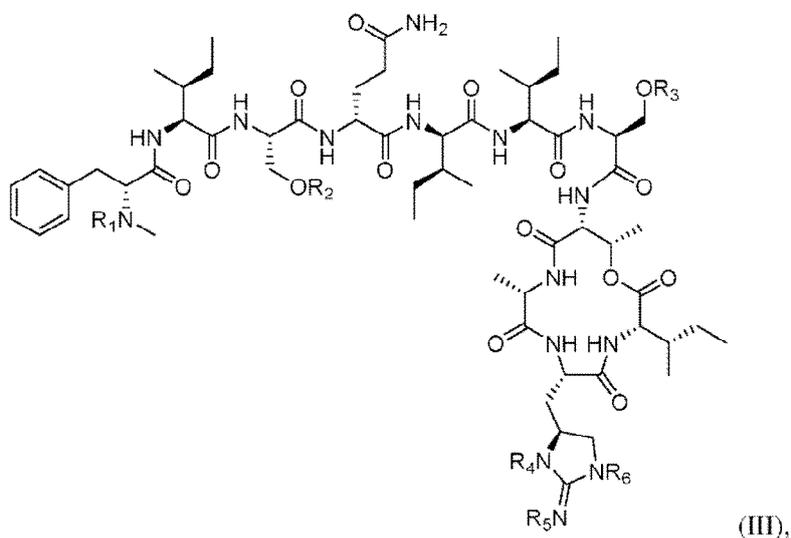
[0046] Todos los estereoisómeros de los compuestos depsipeptídicos de la presente invención (por ejemplo, aquellos que pueden existir debido a carbonos asimétricos en diversos sustituyentes), incluyendo formas enantioméricas y formas diastereoméricas, se contemplan dentro del alcance de esta presente invención. En una realización, los compuestos de Fórmula (I) son mezclas. Alternativamente, sin embargo, los compuestos de Fórmula (I) son estereoisómeros individuales sustancialmente libres de otros estereoisómeros (por ejemplo, como un isómero

óptico puro o sustancialmente puro que tiene una actividad especificada). En una realización particular, el compuesto de Fórmula (I) es un estereoisómero individual representado por la Fórmula (II). En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un estereoisómero único en presencia de menos de aproximadamente 10% (en peso seco) de otros isómeros. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un estereoisómero único en presencia de menos de aproximadamente 5% (en peso seco) de otros isómeros. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un estereoisómero único en presencia de menos de aproximadamente 2% (por peso seco) de otros isómeros. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un estereoisómero único en presencia de menos de aproximadamente 1% (en peso seco) de otros isómeros. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un estereoisómero único en presencia de aproximadamente 5% (en peso seco) a aproximadamente 10% (en peso seco) de otros isómeros. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un estereoisómero único en presencia de aproximadamente 1% (en peso seco) a aproximadamente 5% (en peso seco) de otros isómeros. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un estereoisómero único en presencia de aproximadamente 1% (en peso seco) a aproximadamente 10% (en peso seco) de otros isómeros. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un estereoisómero único en presencia de aproximadamente 5% (en peso seco) a aproximadamente 10% (en peso seco) de otros isómeros. Los compuestos no relacionados representan menos del 2% (en peso seco). En otras realizaciones, las presentes enseñanzas están dirigidas a mezclas de estereoisómeros. Los centros quirales de los compuestos de Fórmula (I) pueden tener la configuración S o R tal como se define en las Recomendaciones IUPAC 1974. Las formas estereoisoméricas pueden resolverse mediante métodos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccionada, separación o cristalización de derivados diastereoméricos o separación mediante cromatografía en columna quiral. Los isómeros ópticos individuales se pueden obtener a partir de una mezcla de estereoisómeros por cualquier método adecuado, que incluye, sin limitación, métodos convencionales, tales como, por ejemplo, formación de sal con un ácido ópticamente activo seguido de cristalización.

[0047] Compuestos depsipeptídicos de la presente invención pueden ser, después de su preparación, *p. ej.*, aislados y purificados para obtener una composición que contiene una cantidad en peso igual o mayor que 90% (en peso seco), que luego se usa o formula como se describe en este documento. Los compuestos depsipeptídicos de la presente invención pueden ser, después de su preparación, *p. ej.*, aislados y purificados para obtener una composición que contiene una cantidad en peso igual o superior al 95% (en peso seco), que luego se usa o formula como se describe en este documento. Los compuestos depsipeptídicos de la presente invención pueden ser, después de su preparación, *p. ej.*, aislados y purificados para obtener una composición que contiene una cantidad en peso de aproximadamente 90% (en peso seco) a aproximadamente 95% (en peso seco), que luego se usa o formula como se describe en este documento. Los compuestos depsipeptídicos de la presente invención pueden ser, después de su preparación, por ejemplo, aislados y purificados para obtener una composición que contiene una cantidad en peso de aproximadamente 85% (en peso seco) a aproximadamente 95% (en peso seco), que es entonces usado o formulado como se describe aquí. Los compuestos depsipeptídicos de la presente invención pueden, después de su preparación, por ejemplo, aislarse y purificarse para obtener una composición que contiene una cantidad en peso de aproximadamente 95% (en peso seco) a aproximadamente 99% (en peso seco), que es entonces usada o formulada como se describe aquí.

[0048] Se contemplan todos los isómeros configuracionales de los compuestos de la presente invención, bien en mezcla o en forma pura o sustancialmente pura.

[0049] En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto aislado de Fórmula (III):



o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Cada $R_1 - R_6$ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, arilo, $C(=O)R_a$ y $S(=O)_2R_b$; cada R_a es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, o arilo; y cada R_b es independientemente alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno o arilo. Cualquier carbono o hidrógeno también puede reemplazarse con ^{13}C o 2H , respectivamente. En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto aislado de Fórmula (III), o un enantiómero, un diastereómero, un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0050] Los términos "alquilo" se refiere a un alcano de cadena lineal o ramificada (hidrocarburo) que contiene de 1 a 12 átomos de carbono, por ejemplo, de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos "alquilo" incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, y similares.

[0051] El término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 12 átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono. Ejemplos de tales grupos incluyen etenilo o alilo.

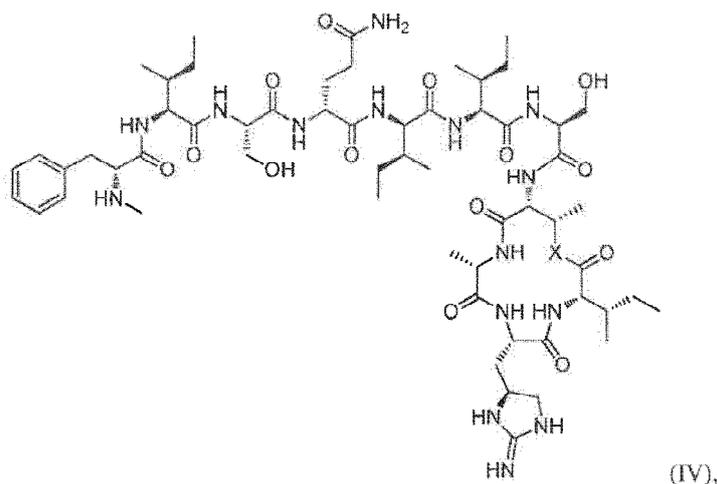
[0052] El término "alquino" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 12 átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono a carbono. Ejemplos de tales grupos incluyen etinilo.

[0053] El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico totalmente saturado que contiene de 1 a 4 anillos y 3 a 8 carbonos por anillo. Ejemplos de tales grupos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, etc.

[0054] El término "cicloalqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico parcialmente insaturado que contiene 1 a 4 anillos y 3 a 8 carbonos por anillo. Ejemplos de tales grupos incluyen ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, etc.

[0055] El término "arilo" se refiere a grupos de hidrocarburos cíclicos, aromáticos que tienen de 1 a 5 anillos aromáticos, grupos monocíclicos o bicíclicos especialmente tales como fenilo, bifenilo o naftilo. Cuando contengan dos o más anillos aromáticos (bicíclicos, etc.), los anillos aromáticos del grupo arilo se pueden unir en un único punto (por ejemplo, bifenilo) o fusionarse (por ejemplo, naftilo, fenantrenilo y similares).

[0056] Se describe un compuesto aislado de Fórmula (IV):



en donde X es NH, O o S;

o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización específica, X es NH. Alternativamente, X es O. Alternativamente, X es S. En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto aislado de Fórmula (IV), o un enantiómero, diastereómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0057] En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) es un producto natural de una especie bacteriana. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) es un producto natural aislado de una especie bacteriana. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) es un producto natural del aislado bacteriano ISO18629. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV)

se deriva de cultivos de bacterias del aislado bacteriano ISO18629. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) es un producto natural aislado del aislado bacteriano ISO18629.

[0058] En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se caracteriza por al menos cinco picos de resonancia magnética nuclear ^{13}C en los desplazamientos químicos (+/- 0,2 ppm) en DMSO- d_6 seleccionados de 36,3 ppm, 36,5 ppm, 36,9 ppm, 37,4 ppm, 52,1 ppm, 52,2 ppm, 52,7 ppm, 53,5 ppm, 55,7 ppm, 56,1 ppm, 56,4 ppm, 56,7 ppm, 57,3 ppm, 57,8 ppm, 57,9 ppm, 61,8 ppm y 71,1 ppm. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se caracteriza por al menos siete picos de resonancia magnética nuclear ^{13}C en los desplazamientos químicos (+/- 0,2 ppm) en DMSO- d_6 seleccionados de 36,3 ppm, 36,5 ppm, 36,9 ppm, 37,4 ppm, 52,1 ppm, 52,2 ppm, 52,7 ppm, 53,5 ppm, 55,7 ppm, 56,1 ppm, 56,4 ppm, 56,7 ppm, 57,3 ppm, 57,8 ppm, 57,9 ppm, 61,8 ppm y 71,1 ppm. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se caracteriza por al menos diez picos de resonancia magnética nuclear ^{13}C en los desplazamientos químicos (+/- 0,2 ppm) en DMSO- d_6 seleccionados de 36,3 ppm, 36,5 ppm, 36,9 ppm, 37,4 ppm, 52,1 ppm, 52,2 ppm, 52,7 ppm, 53,5 ppm, 55,7 ppm, 56,1 ppm, 56,4 ppm, 56,7 ppm, 57,3 ppm, 57,8 ppm, 57,9 ppm, 61,8 ppm y 71,1 ppm. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se caracteriza por al menos doce picos de resonancia magnética nuclear ^{13}C en los desplazamientos químicos (+/- 0,2 ppm) en DMSO- d_6 seleccionados de 36,3 ppm, 36,5 ppm, 36,9 ppm, 37,4 ppm, 52,1 ppm, 52,2 ppm, 52,7 ppm, 53,5 ppm, 55,7 ppm, 56,1 ppm, 56,4 ppm, 56,7 ppm, 57,3 ppm, 57,8 ppm, 57,9 ppm, 61,8 ppm y 71,1 ppm. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se caracteriza por picos de resonancia magnética nuclear ^{13}C en los desplazamientos químicos (+/- 0,2 ppm) en DMSO- d_6 de 36,3 ppm, 36,5 ppm, 36,9 ppm, 37,4 ppm, 52,1 ppm, 52,2 ppm, 52,7 ppm, 53,5 ppm, 55,7 ppm, 56,1 ppm, 56,4 ppm, 56,7 ppm, 57,3 ppm, 57,8 ppm, 57,9 ppm, 61,8 ppm y 71,1 ppm. En ciertas realizaciones, los cambios químicos se informan a partir de los espectros de resonancia magnética nuclear obtenidos usando un imán de 500 MHz. Los cambios químicos se informan aquí dentro de un error de +/- 0,2 ppm. Se describe un compuesto de Fórmula (I), caracterizado por al menos uno de: un peso molecular de aproximadamente 1242,47 g/mol, un espectro de resonancia magnética nuclear de protones sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 1, un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 2, un espectro de resonancia magnética nuclear COSY sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 3, un espectro de resonancia magnética nuclear DEPT-135 sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 4, un espectro de resonancia magnética nuclear HSQC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 5, o un espectro de resonancia magnética nuclear HMBC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 6. En otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (I), caracterizado por al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis de las características anteriores. En otra realización más, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (I), caracterizado por: un peso molecular de aproximadamente 1242,47 g/mol, un espectro de resonancia magnética nuclear de protones sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 1, un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 2, un espectro de resonancia magnética nuclear COSY sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 3, un espectro de resonancia magnética nuclear DEPT-135 sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 4, un espectro de resonancia magnética nuclear HSQC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 5, y un espectro de resonancia magnética nuclear HMBC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 6.

[0059] En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un producto natural aislado de ISO18629 aislado bacteriano caracterizado por picos de resonancia magnética nuclear ^{13}C en los desplazamientos químicos (+/- 0,2 ppm) en DMSO- d_6 de 36,3 ppm, 36,5 ppm, 36,9 ppm, 37,4 ppm, 52,1 ppm, 52,2 ppm, 52,7 ppm, 53,5 ppm, 55,7 ppm, 56,1 ppm, 56,4 ppm, 56,7 ppm, 57,3 ppm, 57,8 ppm, 57,9 ppm, 61,8 ppm y 71,1 ppm. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un producto natural aislado del aislado bacteriano ISO18629 caracterizado por: un peso molecular de aproximadamente 1242,47 g/mol, un espectro de resonancia magnética nuclear de protones sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 1, un espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 2, un espectro de resonancia magnética nuclear COSY sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 3, un espectro de resonancia magnética nuclear DEPT-135 sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 4, un espectro de resonancia magnética nuclear HSQC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 5, y/o un espectro de resonancia magnética nuclear HMBC sustancialmente el mismo que el mostrado en la FIG. 6.

[0060] En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención descrito en este documento y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición incluye además un agente seleccionado entre un antibiótico, un agente antifúngico, un agente antiviral, un agente antiprotzoario, un agente antihelmíntico, un agente antineoplásico, un agente inmunorregulador, un agente anti-hipercolesterolemia y combinaciones de los mismos.

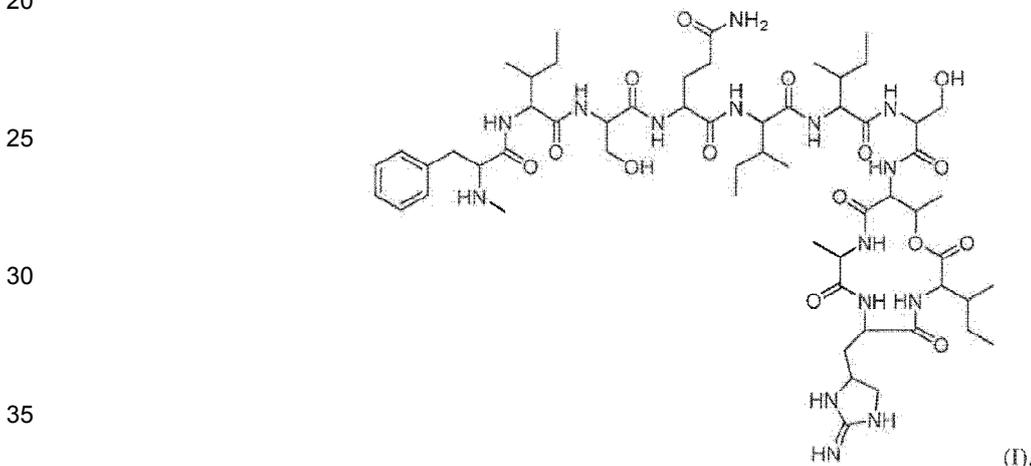
[0061] Los compuestos depsipeptídicos de la presente invención pueden formar sales que también están dentro del alcance de esta presente invención. La referencia a un compuesto de la presente invención en el presente documento se entiende que incluye una referencia a sus sales, a menos que se indique lo contrario. El término "sal(es)", como se emplea en el presente documento, indica sales ácidas formadas con ácidos inorgánicos y/u orgánicos. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables (es decir, no tóxicas, fisiológicamente aceptables), aunque también son útiles otras sales, por ejemplo, en etapas de aislamiento o purificación que pueden emplearse durante la preparación. Las sales de los compuestos de la presente invención se pueden formar, por ejemplo,

haciendo reaccionar un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) con una cantidad de ácido, tal como una cantidad equivalente, en un medio tal como uno en el que la sal precipita o en un medio acuoso o acuoso y orgánico seguido de liofilización.

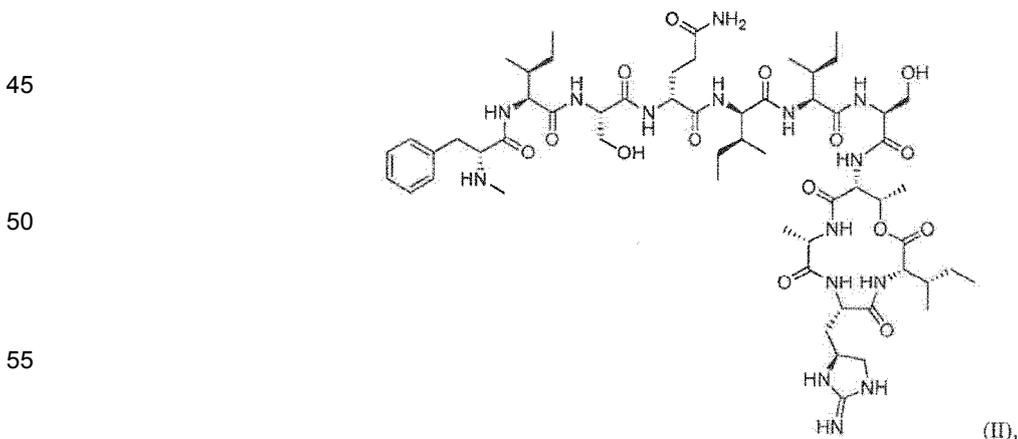
5 **[0062]** Los compuestos depsipeptídicos de la presente invención que contienen un resto básico, tal como, pero no limitado a una amina o una guanidina, pueden formar sales con una variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos. Ejemplos de sales de adición de ácido incluyen acetatos (tales como los formados con ácido acético o ácido trihaloacético, por ejemplo, ácido trifluoroacético), adipatos, alginatos, ascorbatos, aspartatos, benzoatos, bencenosulfonatos, bisulfatos, boratos, butiratos, citratos, alcanforados, canforsulfonatos, propuestos de
10 ciclopentano, digluconatos, dodecilsulfatos, etanosulfonatos, fumaratos, glucoheptasoatos, glicerofosfatos, hemisulfatos, heptanoatos, hexanoatos, hidroclouros, hidrobromuros, hidroyodurosulfonatos (por ejemplo, 2-hidroxietanosulfonatos), lactatos, maleatos, metanosulfonatos, naftalenosulfonatos (*p. ej.*, 2-naftalenosulfonatos), nicotinatos, nitratos, oxalatos, pectinatos, persulfatos, fenilpropionatos (*p. ej.*, 3-fenilpropionatos), fosfatos, picratos, pivalatos, propionatos, salicilatos, succinatos, sulfatos (como los formados con ácido sulfúrico), sulfonatos, tartratos, tiocianatos, toluenosulfonatos tales como tosilatos, undecanoatos y similares.

Métodos de preparación de los compuestos de la invención

20 **[0063]** Se describe un método para producir un compuesto de Fórmula (I):



40 o un enantiómero, diastereómero, tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente invención se refiere a un método para producir un compuesto de Fórmula (II):



60 o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

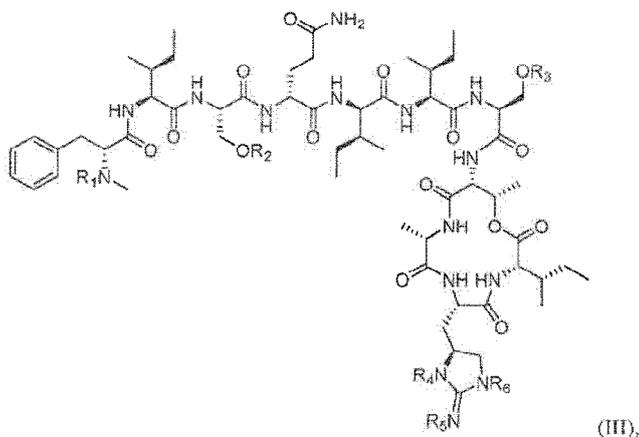
[0064] En una realización, la presente invención se refiere a un método para producir un compuesto de Fórmula (III)

65

5

10

15



o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

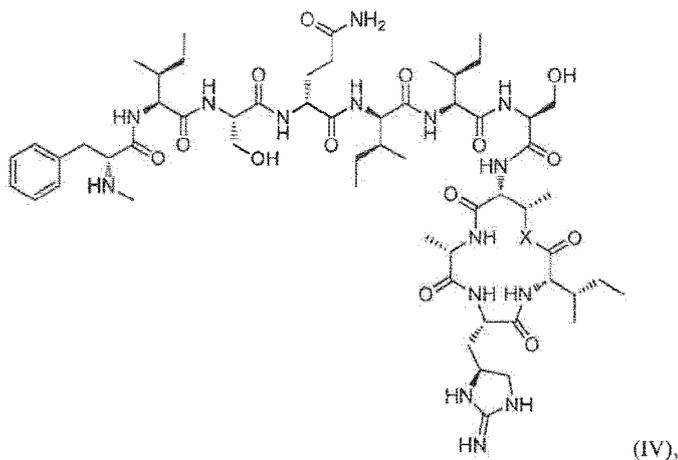
Cada R_1 - R_6 se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, $C(=O)R_a$, y $S(=O)_2R_b$; cada R_a es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, o arilo; y cada R_b es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o arilo. Cualquier carbono o hidrógeno también puede reemplazarse con ^{13}C o 2H , respectivamente.

[0065] Se describe un método para producir un compuesto de Fórmula (IV):

30

35

40



en donde X es NH, O o S,
o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0066] El método incluye el cultivo de una ISO18629 aislada bacteriana en un medio de cultivo que comprende fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas en condiciones aeróbicas, y permitiendo la producción de una cantidad analizable del compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV). Las condiciones específicas para cultivar el aislado bacteriano ISO18629 se describen en la sección de ejemplos a continuación.

[0067] En ciertas realizaciones, el método comprende además aislar el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV). El compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) puede aislarse centrifugando el caldo de fermentación (por ejemplo, centrifugando a 10.000 rpm durante 20 minutos). El sobrenadante de la centrifugación se adsorbe a continuación sobre una resina polimérica de fase inversa (por ejemplo, HP-20, Mitsubishi). Después de lavar la columna con agua y acetona acuosa al 80%, el compuesto se eluye con acetona. Este extracto de acetona se seca (por ejemplo, a presión reducida) dejando un aceite espeso de color naranja. Luego se agregan hexanos a este aceite y la mezcla se somete a ultrasonidos y se centrifuga. El sobrenadante se decanta y el residuo restante se seca a presión reducida. Esta residencia se disuelve en DMSO y se purifica. La purificación puede lograrse mediante RP-HPLC en una columna de preparación C-18 (H_2O/ACN con TFA al 0,1%, 10-100% durante 35 minutos). Las fracciones que contienen el compuesto se pueden liofilizar a continuación. Las condiciones específicas para aislar el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se describen en la sección de ejemplos a continuación.

[0068] En algunas realizaciones, el método comprende además aislar el compuesto de fórmula (I), (II), (III) o (IV) hasta al menos aproximadamente 75% de pureza (en peso seco). En otras realizaciones, el proceso comprende

además aislar el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) a al menos aproximadamente 80% de pureza (en peso seco). En otras realizaciones, el proceso comprende además aislar el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) a al menos aproximadamente 85% de pureza (en peso seco). En otras realizaciones, el proceso comprende además aislar el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) a al menos aproximadamente 90% de pureza (en peso seco). En otras realizaciones, el proceso comprende además aislar el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) a al menos aproximadamente 95% de pureza (en peso seco). En otras realizaciones, el proceso comprende además aislar el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) a al menos aproximadamente 97% de pureza (en peso seco). En otras realizaciones, el proceso comprende además aislar el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) a al menos aproximadamente 99% de pureza (en peso seco).

[0069] En aún otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (II) o (III) preparado de acuerdo con el método descrito en el presente documento.

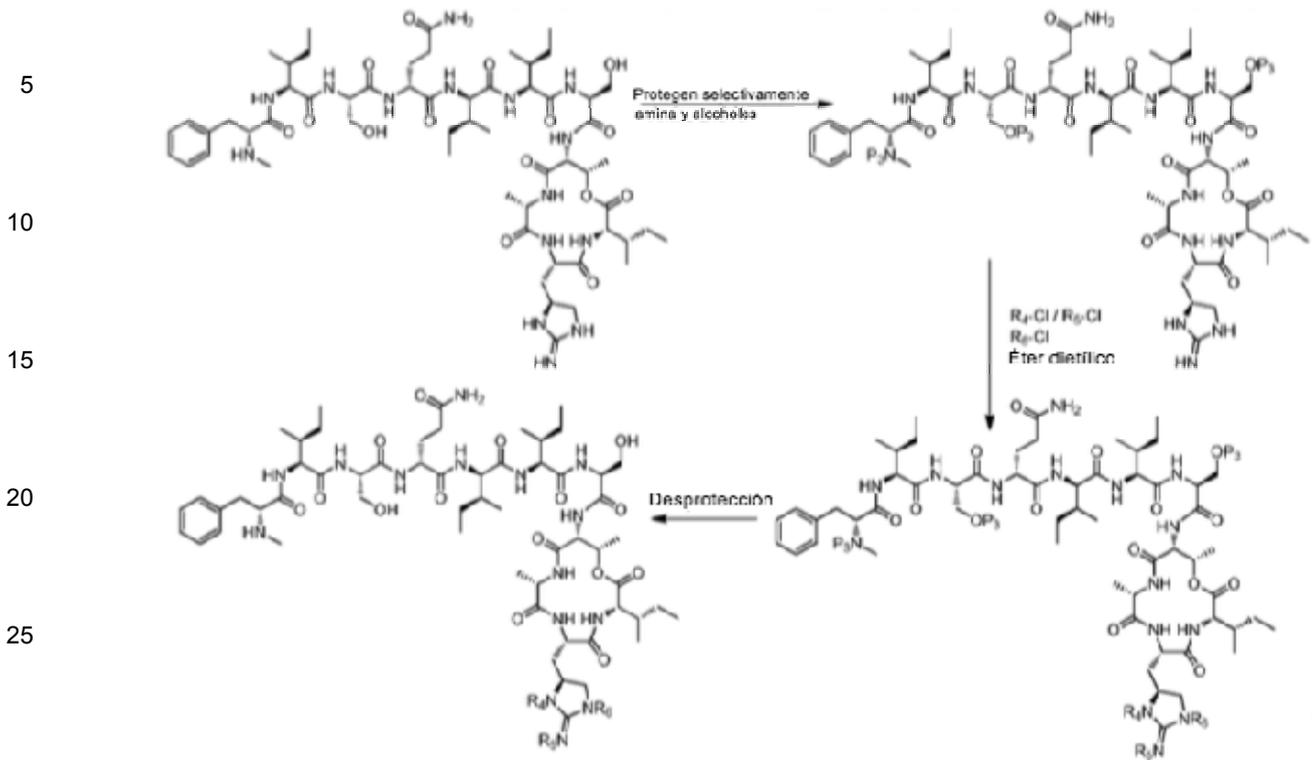
[0070] Un compuesto de Fórmula (II), *p. ej.*, NOVO26 es producido por el aislamiento ISO18629. El aislamiento bacteriano ISO18629 se depositó en Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), Centro Nacional de Investigación de Utilización Agrícola, Servicio de Investigación Agrícola, Departamento de Agricultura de EE.UU., 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, el 6 de septiembre de 2013 y se le asignó Número de acceso NRRL B-50868. Este depósito se mantendrá bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento de Patentes. Este depósito se hizo simplemente como una conveniencia para los expertos en la materia y no es una admisión de que se requiere un depósito bajo 35 U.S.C. § 112.

[0071] ISO18629 fue aislado de un suelo terrestre de Maine, utilizando la tecnología para aislar microorganismos "no cultivable" descritos en la Patente de Estados Unidos N° 7.011.957. Esta tecnología hace uso de una cámara de crecimiento que está sellada con una membrana semipermeable, y por lo tanto es permeable a la difusión de los componentes del medio ambiente, pero no a las células de los microorganismos. La secuencia de nucleótidos del gen 16S rADN de ISO18629 en comparación por alineación BLAST a la colección de nucleótidos GenBank mostró que estaba relacionada más estrechamente (97,4% de similitud) a una *Burkholderiales* YT0099 bacteria (N° de Acceso AB362826-1).

[0072] La cámara de crecimiento se ha diseñado para permitir el crecimiento, el aislamiento en cultivo puro, y caracterización de microorganismos que son "no cultivables" en el momento presente. Este resultado deseado puede lograrse porque las condiciones dentro de la cámara se parecen mucho, si no son idénticas, al entorno natural de los microorganismos. Una versión de dicha cámara se forma a partir de un sustrato sólido, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio o silicona o una arandela de nylon o acero inoxidable, que tiene un orificio que está emparedado con dos membranas robustas, *p. ej.*, policarbonato u otro material inerte, pegado al sustrato. Las membranas tienen tamaños de poro, *p. ej.*, 0,025 μm - 0,03 μm , que son suficientemente pequeños para retener todos los microorganismos dentro de la cámara pero que son suficientemente grandes para permitir que los componentes del ambiente se difundan en la cámara y los productos de desecho se difundan fuera de la cámara. Después de que una membrana se sella en el fondo del sustrato, la cámara se llena parcialmente con una suspensión de células en un medio de crecimiento apropiado.

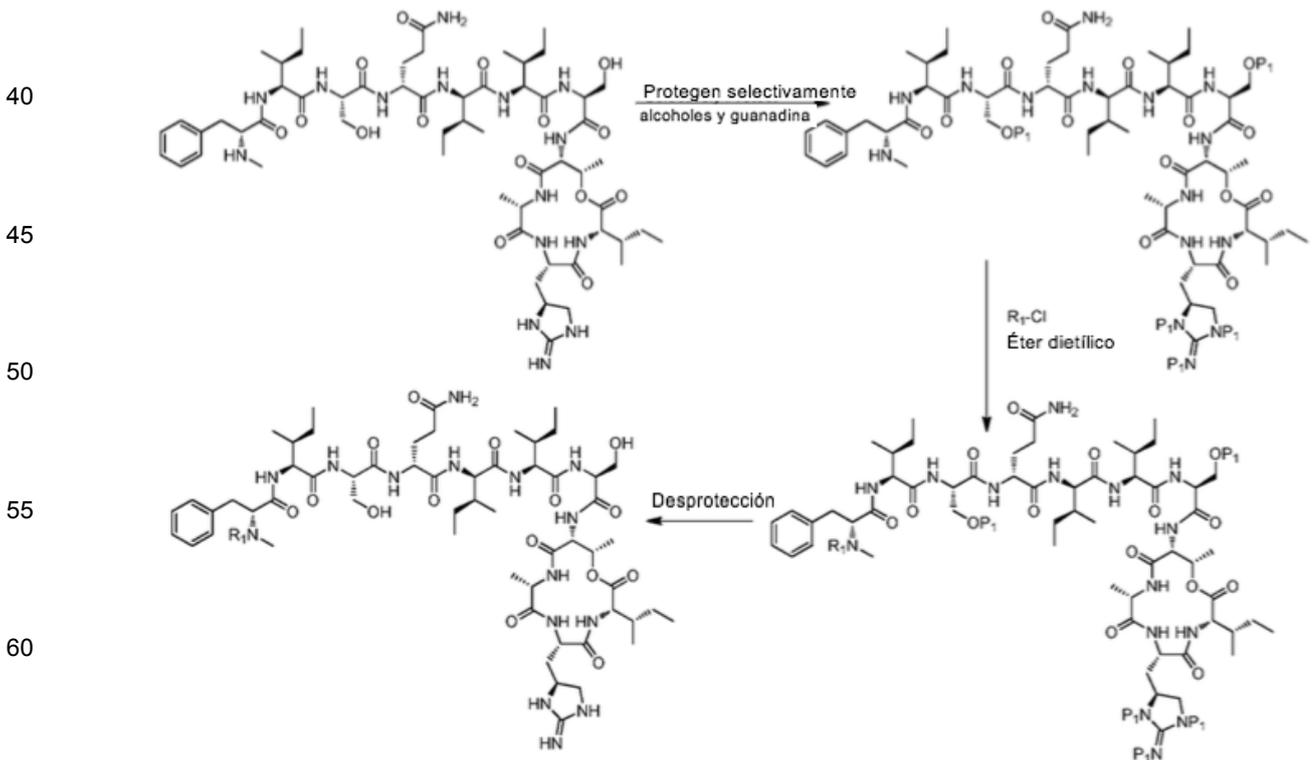
[0073] Los compuestos de la presente invención se pueden aislar del aislado bacteriano ISO18629, por ejemplo, usando el siguiente método. El aislado bacteriano se puede cultivar en un soporte apropiado. Una colonia puede homogeneizarse y usarse para inocular un caldo de semillas. Después de la fermentación, el cultivo de siembra se puede usar para inocular un caldo de producción. Después de la fermentación adicional opcional, el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se puede recoger del caldo, por ejemplo, usando centrifugación y HPLC preparativa. Un método ejemplar específico para producir el compuesto de Fórmula (II) se analiza con más detalle a continuación, en la sección de Ejemplos.

[0074] Alternativamente, los compuestos de la divulgación pueden ser sintetizados. Por ejemplo, el Esquema 1 representa un método no limitante para sintetizar compuestos de fórmula (III) sustituidos con guanidina:



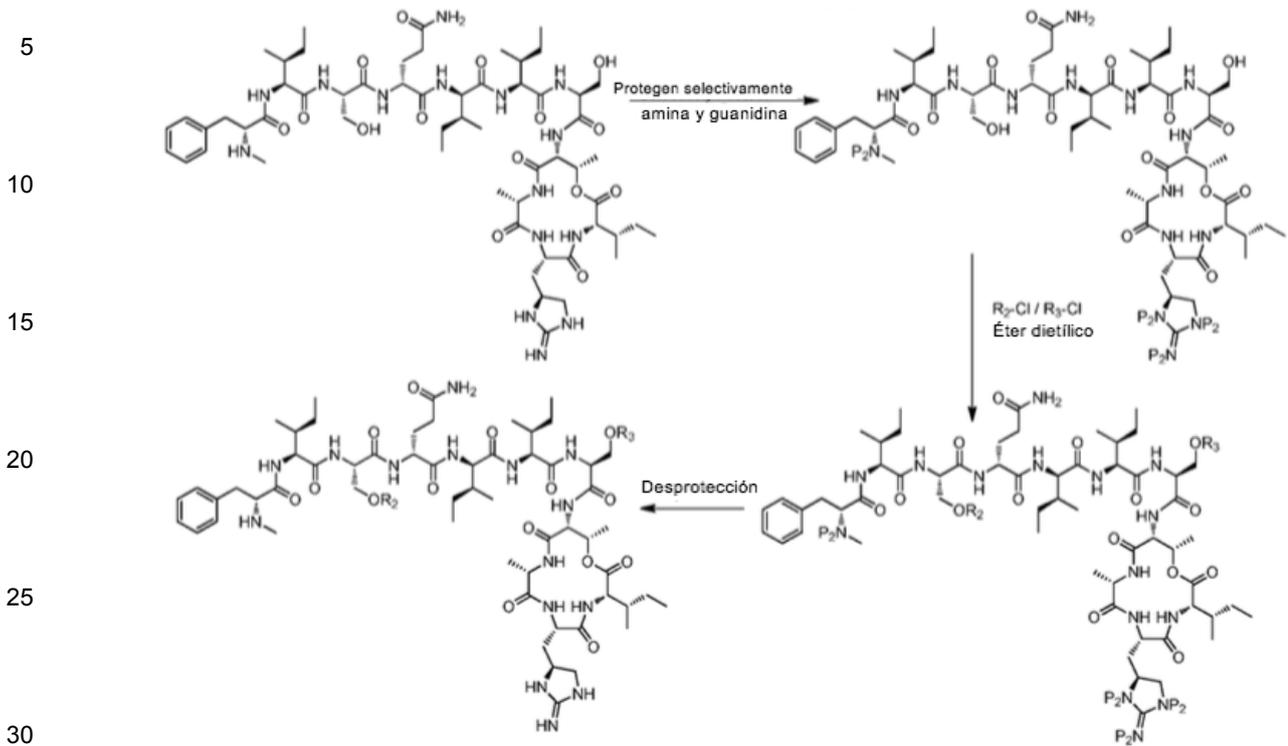
Esquema 1.

El Esquema 2 es un ejemplo representativo no limitante de un método para sintetizar compuestos sustituidos con aminas de fórmula (III):



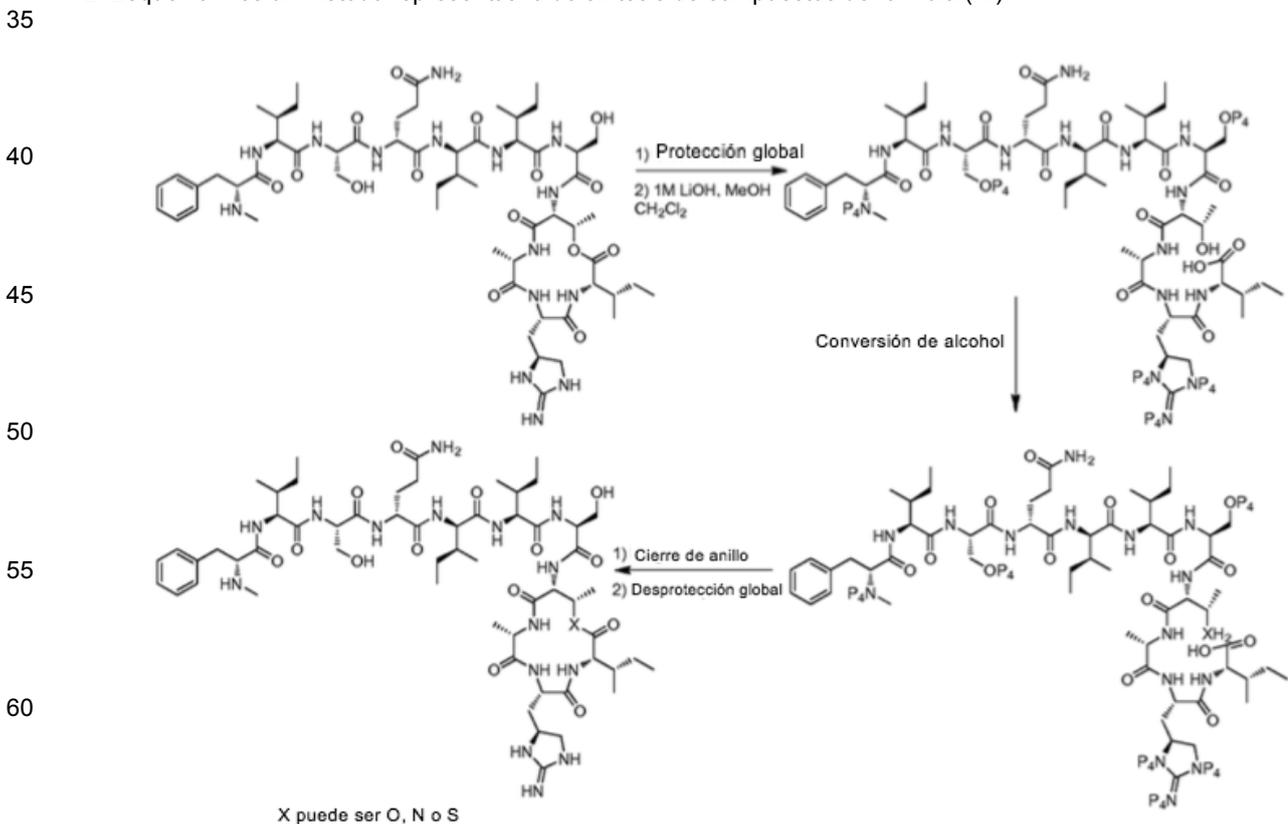
Esquema 2.

El Esquema 3 proporciona un método no limitante para sintetizar compuestos de fórmula (III) sustituidos en alcohol:



Esquema 3.

El Esquema 4 es un método representativo de síntesis de compuestos de fórmula (IV):



Esquema 4.

Métodos de tratamiento usando los compuestos de la invención

[0075] La presente invención también proporciona métodos para inhibir el crecimiento de un patógeno. Los métodos implican poner en contacto el patógeno con una cantidad eficaz de uno o más compuestos depsipeptídicos de Fórmula (II) o (III), inhibiendo de ese modo el crecimiento del patógeno en comparación con el crecimiento del patógeno en ausencia de tratamiento con el compuesto. En ciertas realizaciones, el método reduce el crecimiento del patógeno en comparación con el crecimiento del patógeno en ausencia de tratamiento con el compuesto. En otros casos, el tratamiento resulta en la muerte del patógeno. Los ejemplos no limitantes de un patógeno incluyen, pero no se limitan a, una bacteria, un hongo, un virus, un protozoario, un helminto, un parásito y combinaciones de los mismos. Estos métodos pueden practicarse *in vivo* o *in vitro*.

[0076] La actividad antibacteriana de los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) con respecto a una bacteria específica puede evaluarse mediante ensayos *in vitro* tales como el control de la zona de inhibición y los ensayos de concentración inhibitoria mínima (CIM). La actividad antifúngica de los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) puede determinarse, por ejemplo, siguiendo la viabilidad de los patógenos fúngicos deseados (tales como *Candida albicans* y especie *Aspergillus*) por ejemplo como se describe en Sanati et al. Un nuevo triazol, voriconazol (UK-109,496), bloquea la biosíntesis de esteroides en *Candida albicans* y *Candida krusei*, Antimicrob. Agents Chemother., 1997 noviembre; 41 (11): 2492-2496. Las propiedades antivirales de los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se pueden determinar, por ejemplo, controlando la inhibición de la neuraminidasa de influenza o analizando la viabilidad viral como se describe en Tisdale M., Monitoring of viral susceptibility: new challenges with the development of influenza NA inhibitors, Rev. Med. Virol., 2000 Ene-Feb; 10 (1): 45-55. La actividad antiprotozoaria de los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se puede determinar siguiendo la viabilidad de parásitos protozoarios tales como *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia* como se describe en Katiyar et al. Actividades antiprotozoarias de los bencimidazoles y correlaciones con la secuencia de beta-tubulina, Antimicrob. Agents Chemother., 1994 septiembre; 38 (9): 2086-2090. La actividad antihelmíntica de los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) puede determinarse, por ejemplo, siguiendo el efecto de los compuestos sobre la viabilidad de nematodos tales como *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma cercariae* y *Caenorhabditis elegans* como se describe en Mølgaard P. et al., Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe, J. Ethnopharmacol., 1994 Apr; 42 (2): 125-32.

[0077] En otras realizaciones, la presente invención se refiere a métodos de tratamiento de un trastorno, *p. ej.*, una infección de patógeno, en un sujeto que lo necesite, administrando al sujeto una cantidad eficaz de uno o más compuestos depsipeptídicos descritos en este documento. En ciertas realizaciones, el trastorno es causado por un patógeno tal como, pero no limitado a, una bacteria, un hongo, un virus, un protozoario, un helminto, un parásito o una combinación de los mismos.

[0078] En algunas realizaciones, el trastorno es causado por una bacteria. Los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento pueden ser útiles contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. En particular, el trastorno es causado por una bacteria Gram-positiva. Alternativamente, el trastorno es causado por una bacteria Gram-negativa. Los ejemplos no limitantes de bacterias Gram-positivas incluyen *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacteria*, *Listeria*, *Bacillus*, *Erysiploothrix* y *Actinomycetos*. En algunas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se usan para tratar una infección por uno o más de: *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae*, esporozoitos *Mycobacteria*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (grupo A de *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* pyogenes (*Streptococcus* del grupo B), *Streptococcus dysgalactia*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, esporozoitos *Campylobacter* patógenos, esporozoitos *Enterococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeium*, esporozoitos *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Leptospira* y *Actinomyces israelii*. En realizaciones específicas, los compuestos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) o por enterococos resistentes a la vancomicina (VRE). MRSA contribuye a aproximadamente 19.000 muertes anualmente en los Estados Unidos. Aunque la mayoría de estas muertes se deben a MRSA adquirido en el hospital (HA-MRSA), el SARM adquirido en la comunidad (CA-MRSA) es en realidad más virulento y se sabe que es potencialmente mortal para individuos previamente sanos. La virulencia de CA-MRSA se debe en parte a la expresión de modulinas solubles en fenol o péptidos PSM. Por consiguiente, en el tratamiento de CA-MRSA, se puede usar un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) en combinación con un agente que modula la expresión y/o actividad de factores de virulencia, tales como: pero no limitado a, péptidos PSM. En ciertas realizaciones, los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) pueden usarse para tratar espiroquetas tales como *Borelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* y *Treponema pertenue*.

[0079] En una realización particular, las bacterias Gram-positivas se seleccionan de *Staphylococcus* (incluyendo, por

ejemplo, *S. aureus* spp., *S. epidermidis* spp., *S. warneri* spp., y *S. haemolyticus* spp.); *Streptococcus* (que incluye, por ejemplo, *S. viridans* spp., *S. pneumoniae* spp., *S. agalactiae* spp., y *S. pyogenes* spp.); *Bacillus* (que incluye, por ejemplo, *B. anthracis* spp. y *B. subtilis*, spp.); *Clostridium* (que incluye, por ejemplo, *C. difficile* spp.); *Propionibacterium* (que incluye, por ejemplo, *P. acnes* spp.); *Enterococcus* (incluyendo, por ejemplo, *E. faecium* spp., *E. faecalis* spp., *E. Faecium* spp. resistentes a la vancomicina, y *E. faecalis* spp. resistentes a la vancomicina); y *Mycobacterium* (que incluye, por ejemplo, *M. smegmatis* spp. y *M. tuberculosis* spp.). Los compuestos descritos en este documento son útiles para tratar trastornos causados por estas bacterias. Los ejemplos de tales trastornos incluyen infecciones bacterianas agudas de la piel y de la estructura de la piel, diarrea asociada con *C.difficile*, ántrax, sepsis, botulismo, infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis bacteriana, diverticulitis, meningitis, neumonía y tuberculosis.

[0080] En una realización particular, las bacterias Gram-negativas se seleccionan de *Haemophilus* (incluyendo, por ejemplo, *H. influenzae* spp.); *Klebsiella* (que incluye, por ejemplo, *K. pneumoniae* spp.); *Pseudomonas* (que incluye, por ejemplo, *P. aeruginosa* spp.); *Escherichia* (que incluye, por ejemplo, *E. coli* spp.); *Yersinia* (que incluye, por ejemplo, *Y. pestis* spp.); *Neisseria* (que incluye, por ejemplo, *N. gonorrhoeae* spp.); *Bacteriodes* (que incluyen, por ejemplo, *B. fragilis* spp.); *Proteus* (incluyendo, por ejemplo, *P. mirabilis* spp. y *P. vulgaris* spp.); *Enterobacter* (que incluye, por ejemplo, *E. cloacae* spp. y *E. aerogenes* spp., *Serratia* (que incluye, por ejemplo, *S. marcescens* spp.), *Acinetobacter* (que incluye, por ejemplo, *A. baumannii* spp.) y *Moraxella* (incluyendo, por ejemplo, *M. catarrhalis* spp.). En una realización específica, las bacterias Gram-negativas son *Haemophilus*, y en particular, *H. influenzae*, o *Moraxella*, y en particular, *M. catarrhalis* spp. Los compuestos descritos en este documento son útiles para tratar trastornos causados por estas bacterias. Ejemplos de tales trastornos incluyen gripe, bacteriemia, neumonía, meningitis bacteriana aguda, gonorrea, infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto respiratorio, bacteriemia asociada al catéter, infecciones de la herida, otitis media, bronquitis, sinusitis y laringitis. En otras realizaciones, los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos virales. Ejemplos no limitantes de virus infecciosos que pueden tratarse mediante los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como HIV-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV) o HIV-III; y otros aislamientos, como HIV-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (*p. ej.*, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (*p. ej.*, virus de encefalitis equina, virus de rubéola); *Flaviridae* (*p. ej.*, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (*p. ej.*, coronavirus, virus del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS)); *Rhabdoviridae* (*p. ej.*, Virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus de ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (*p. ej.*, Virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (*p. ej.*, Reovirus, orbiviruses y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (por ejemplo, virus de la Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polio); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (*p. ej.*, virus herpes simplex (HSV) 1 y 2, virus de varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (por ejemplo, virus variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis δ (que se piensa que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A no B (clase 1 = clase transmitida internamente) 2 = transmitido por los padres, es decir, Hepatitis C); Norwalk y virus relacionados, y astrovirus). En realizaciones específicas, los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se usan para tratar un virus de la gripe, el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus del herpes simple.

[0081] En algunas realizaciones, los Compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) pueden ser útiles para tratar trastornos causados por hongos. Los ejemplos no limitantes de hongos que pueden inhibirse por los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen, pero sin limitación, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida lusitanae*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium audouinii*, *Microsporium canis*, *Microsporium canis var. distortum*, *Microsporium cookei*, *Microsporium equinum*, *Microsporium ferrugineum*, *Microsporium fulvum*, *Microsporium gallinae*, *Microsporium gypseum*, *Microsporium nanum*, *Microsporium persicolor*, *Trichophyton ajelloi*, *Trichophyton concentricum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton flavescens*, *Trichophyton gloriae*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton mentagrophytes var. erinacei*, *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*, *Trichophyton phaseoliforme*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton rubrum cepa strain*, *Trichophyton rubrum cepa granular*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton simii*, *Trichophyton soudanense*, *Trichophyton terrestre*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton vanbreuseghemii*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton yaoundei*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus clavatus*.

[0082] En otras realizaciones, los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de trastornos causados por protozoario. Los ejemplos no limitantes de protozoario que pueden inhibirse por los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen, pero sin limitación, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma gambiense*, *Leishmania donovani* y *Naegleria fowleri*.

[0083] En ciertas realizaciones, los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de trastornos causados por helmintos. Los ejemplos no limitantes de helmintos que pueden inhibirse por los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen, pero no se limitan a: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma cercariae*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma hematobium*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus constaricensis*, *Fasciolopsis buski*, *Capillaria philippinensis*, *Paragonimus westermani*, *Ancylostoma dudodenale*, *Necator americanus*, *Trichinella spiralis*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Brugia timori*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxocara vitulorum*, *Caenorhabditis elegans* y especies de *Anisakis*.

[0084] En algunas realizaciones, los compuestos depsipeptídicos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de trastornos causados por parásitos. Los ejemplos no limitantes de parásitos que pueden inhibirse por los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen, pero no se limitan a, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium yoelli*, *Hymenolepis nana*, *Clonorchis sinensis*, *Loa loa*, *Paragonimus westermani*, *Fasciola hepatica* y *Toxoplasma gondii*. En realizaciones específicas, el parásito es un parásito de la malaria.

[0085] En otras realizaciones, los compuestos depsipeptídicos se utilizan para inhibir el crecimiento de un agente infeccioso en comparación con el crecimiento del agente infeccioso en ausencia de ser tratado por el compuesto. Los ejemplos no limitantes de agentes infecciosos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, hongos, virus, protozoario, helmintos, parásitos y combinaciones de los mismos. Los compuestos depsipeptídicos se pueden usar para inhibir el agente *in vivo* o *in vitro*.

Composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la invención

[0086] La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (II) o (III), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones de depsipeptídicos son adecuadas para la administración a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). La composición farmacéutica puede usarse para tratar un trastorno. Los ejemplos no limitantes de tales trastornos se proporcionan anteriormente e incluyen una infección por un patógeno, por ejemplo, una bacteria.

[0087] En una realización, los compuestos depsipeptídicos se administran en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se puede usar cualquier vehículo adecuado conocido en la técnica. Se prefieren portadores que solubilicen eficazmente los compuestos de la invención. Los vehículos incluyen, pero no se limitan a, un sólido, líquido o una mezcla de un sólido y un líquido. Los portadores pueden tomar la forma de cápsulas, tabletas, píldoras, polvos, pastillas, suspensiones, emulsiones o jarabes. Los vehículos pueden incluir sustancias que actúan como agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, aglutinantes, estabilizantes, agentes desintegradores de comprimidos y materiales de encapsulación. La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance de un juicio médico sólido, son adecuadas para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

[0088] Los ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen no limitativos: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como celulosa de carboximetilo sódico, celulosa de etilo y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica, (18) solución de Ringer, (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

[0089] Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualesquiera métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se está tratando, el modo de administración particular y la afección particular que se está tratando, entre otros. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única generalmente será la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, lo más preferiblemente de aproximadamente 10 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

[0090] Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de poner en asociación un

compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima un compuesto depsipeptídico de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) con vehículos líquidos, o portadores sólidos divididos a tiempo, o ambos, y luego, si es necesario, dar forma al producto.

5
10
15
20
[0091] En formas sólidas de dosificación para administración oral (por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), el ingrediente activo se mezcla con uno o más ingredientes adicionales, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: cargas o extendedores, tales como, entre otros, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, pero sin limitación, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como, pero sin limitación, glicerol; agentes desintegrantes, tales como, a modo no taxativo, agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato sódico; agentes retardadores de la solución, tales como, pero sin limitación, parafina; aceleradores de la absorción, tales como, pero sin limitación, compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como, entre otros, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como, entre otros, caolín y arcilla de bentonita; lubricantes, tales como, aunque sin limitación, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

25
[0092] En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido, que se mezcla con una cantidad eficaz de un agente finamente dividido. Los polvos y aerosoles pueden contener, además de un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), excipientes, como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, como butano y propano.

30
35
[0093] Los comprimidos para administración oral sistémica pueden incluir uno o más excipientes conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio, azúcares (por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol), celulosas (por ejemplo, metilo, celulosa, carboximetilcelulosa sódica), gomas (*p. ej.*, árabe, tragacanto), junto con uno o más agentes desintegrantes (*p. ej.*, maíz, almidón o ácido alginico, agentes ligantes, tales como, por ejemplo, gelatina, colágeno o acacia), agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco), diluyentes inertes, conservantes, desintegrantes (por ejemplo, glicolato de almidón de sodio), agente tensioactivo y/o dispersante. Una tableta se puede hacer mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

40
45
[0094] En soluciones, suspensiones, emulsiones o jarabes, una cantidad eficaz del compuesto de depsipeptido se disuelve o suspende en un portador, tal como agua estéril o un disolvente orgánico, tal como propilenglicol acuoso. Se pueden preparar otras composiciones dispersando el compuesto en un almidón acuoso o solución de carboximetilcelulosa sódica o un aceite adecuado conocido en la técnica. Las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como, aunque sin limitación, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, semilla de algodón, maní, maíz, gérmenes, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos.

50
[0095] Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden también incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y agentes conservantes.

[0096] Las suspensiones, además del compuesto activo, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, sorbitol de polioxietileno y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

55
60
[0097] Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) con uno o excipientes o vehículos no irritantes más adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en el recto o la cavidad vaginal y libera a los agentes. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen dichos vehículos que se conocen en la técnica como apropiados.

65
[0098] Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) incluyen polvos, pulverizaciones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, gotas, parches e inhalantes. El compuesto depéptico activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo

farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda requerirse.

[0099] Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

[0100] Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar una administración controlada de un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) para el cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispersando los agentes en el medio apropiado. Los potenciadores de la absorción también se pueden usar para aumentar el flujo de los agentes a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse proporcionando una membrana controladora de la velocidad o dispersando el compuesto depsipeptídico en una matriz o gel polimérico.

[0101] Los compuestos depsipeptídicos se administran en una cantidad eficaz para un sujeto en necesidad de tal tratamiento. La frase "cantidad efectiva" como se usa en este documento significa la cantidad de un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), o una composición que comprende el compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), que es efectivo para producir algún efecto deseado en un animal. Se reconoce que cuando se usa un agente para lograr un efecto terapéutico, la dosis real que comprende la "cantidad efectiva" variará dependiendo de una serie de condiciones que incluyen, entre otras, la afección particular que se trata, la gravedad de la enfermedad, el tamaño y la salud del paciente, la vía de administración. Un médico experto puede determinar fácilmente la dosis apropiada usando métodos bien conocidos en las técnicas médicas. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad eficaz para tratar un trastorno en un sujeto que lo necesite. Además, un experto en la materia apreciará que la cantidad eficaz del compuesto depsipeptídico puede reducirse o aumentarse afinando y/o administrando más de un compuesto depsipeptídico, o administrando un compuesto de depéptido junto con un segundo agente (por ejemplo, antibióticos, antifúngicos, antivirales, AINE, DMARDS, esteroides, etc.). Se puede determinar una cantidad efectiva, por ejemplo empíricamente, comenzando en cantidades relativamente bajas y en incrementos escalonados con evaluación concurrente del efecto beneficioso (por ejemplo, reducción de los síntomas). La cantidad efectiva real se establecerá mediante ensayos de dosis/respuesta usando métodos estándar en la técnica (Johnson et al., Diabetes, 42: 1179, (1993)). Como es conocido por los expertos en la materia, la cantidad efectiva dependerá de la biodisponibilidad, bioactividad y biodegradabilidad del compuesto depsipeptídico.

[0102] En algunas realizaciones, una cantidad efectiva es una cantidad que es capaz de reducir los síntomas del trastorno en un sujeto. En consecuencia, la cantidad puede variar con el sujeto que se trata. Por ejemplo, la cantidad eficaz del compuesto depsipeptídico puede comprender de aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. En una realización, la cantidad eficaz del compuesto comprende de aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En una realización adicional, la cantidad eficaz del compuesto comprende desde aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Cuando uno o más compuestos depsipeptídicos o agentes se combinan con un vehículo, pueden estar presentes en una cantidad de aproximadamente 1 por ciento en peso a aproximadamente 99 por ciento en peso, estando compuesto el resto del vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz está entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 10 g por dosis, por ejemplo, entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 1 g por dosis. Los valores e intervalos intermedios a los intervalos antes citados están destinados a ser abarcados por las presentes enseñanzas.

[0103] La administración del compuesto depsipeptídico puede ser por hora, día, semana, mes, año o un solo evento. Además, la administración puede tener una duración de un día a un año o más. En algunas realizaciones, la administración se refiere a la administración diaria durante un período de tiempo, por ejemplo, durante aproximadamente una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses o un año. En algunas realizaciones, la administración se refiere a la administración semanal durante un período de tiempo, *p. ej.*, durante aproximadamente un mes, tres meses, seis meses, un año o más.

[0104] La presente invención también proporciona kits que comprenden al menos un compuesto depsipeptídico de Fórmula (I), (II), (III) o (IV). Los kits pueden contener al menos un contenedor y también pueden incluir instrucciones que indiquen el uso de estos materiales. En otra realización, un kit puede incluir un agente usado para tratar el trastorno en cuestión con o sin dichos materiales mencionados anteriormente que pueden estar presentes para determinar si un sujeto tiene una enfermedad inflamatoria.

Administración de las composiciones farmacéuticas de la invención

[0105] Los métodos de administración de las formulaciones de la presente invención que comprenden los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (II) o (III) descritos en la presente memoria pueden ser mediante cualquiera de una serie de métodos bien conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen administración local o sistémica. Las vías de administración ejemplares incluyen vía oral, parenteral, transdérmica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal (por ejemplo, nebulizador, inhalador, dispensador de aerosoles), intraocular (por ejemplo, para el tratamiento de la conjuntivitis), intraaural (por ejemplo, para el tratamiento de infecciones de oído), colorrectal, rectal, intravaginal y cualquier combinación de los mismos. Además, puede ser

deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la presente invención en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, que incluye la inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, como un depósito de Ommaya. Los métodos de introducción también pueden proporcionarse mediante dispositivos recargables o biodegradables, *p. ej.*, depósitos. Además, se contempla que la administración puede producirse recubriendo un dispositivo, implante, stent o prótesis. Los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) también pueden usarse para revestir catéteres en cualquier situación en la que se inserten catéteres en el cuerpo.

[0106] En otra realización, los compuestos depsipeptídicos objeto pueden administrarse como parte de una terapia de combinación con otros agentes. La terapia de combinación se refiere a cualquier forma de administración que combine dos o más compuestos terapéuticos diferentes de manera que el segundo compuesto se administre mientras que el compuesto terapéutico administrado previamente todavía es efectivo en el cuerpo (por ejemplo, los dos compuestos son simultáneamente efectivos en el paciente, que pueden incluir efectos sinérgicos de los dos compuestos). Por ejemplo, los diferentes compuestos terapéuticos pueden administrarse en la misma formulación o en una formulación separada, de forma simultánea o secuencial. Por lo tanto, un individuo que recibe dicho tratamiento puede tener un efecto combinado de diferentes compuestos terapéuticos.

[0107] Por ejemplo, los compuestos depsipeptídicos pueden usarse en combinación con otros antibióticos conocidos. Los compuestos depépticos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) pueden administrarse secuencialmente o sustancialmente al mismo tiempo. La variación del antibiótico puede ser útil para reducir la capacidad del patógeno para desarrollar resistencia a la droga. Ejemplos no limitantes de antibióticos incluyen penicilinas (por ejemplo, penicilinas naturales, penicilinas resistentes a penicilinas, penicilinas antipseudomonales, aminopenicilinas), tetraciclinas, macrólidos (por ejemplo, eritromicina), lincosamidas (por ejemplo, clindamicina), estreptograminas (por ejemplo, Synercid), aminoglucósidos y sulfonamidas. En algunas realizaciones, los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se usan en combinación con compuestos que se dirigen a factores de virulencia tales como, pero sin limitación, modulinas solubles en fenol. En algunas realizaciones, los compuestos depsipeptídicos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) se usan en combinación con compuestos que se dirigen a las bombas de flujo de los patógenos.

Kits y artículos de fabricación que comprenden composiciones farmacéuticas de compuestos de la invención

[0108] Se describen kits que comprenden los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, e instrucciones de uso. El término "kit" como se usa en el presente documento se refiere a un producto envasado que comprende componentes con los que administrar una composición farmacéutica que comprende los compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, de la invención para el tratamiento de un trastorno causado por un patógeno. El kit preferiblemente comprende una caja o contenedor que contiene los componentes del kit. La caja o contenedor está adherido con una etiqueta o un protocolo aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos. La caja o recipiente contiene componentes de la invención que están contenidos preferiblemente dentro de recipientes de plástico, polietileno, polipropileno, etileno o propileno. Los recipientes pueden estar cubiertos: tubos o botellas o botellas que contienen un gotero adecuado para la administración gota a gota de una solución que contiene los compuestos de la invención, por ejemplo, en la oreja u ojo de un sujeto. El kit también puede incluir instrucciones para administrar una composición farmacéutica que comprende compuestos de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En una realización particular, el kit puede comprender (a) una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), (II) o (III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la composición farmacéutica está en un recipiente; e (b) instrucciones que describen un método para usar la composición farmacéutica.

[0109] El kit puede contener además un reactivo adicional, tal como un antibiótico, un agente antifúngico, un agente antiviral, un agente anti-protozoario, un agente antihelmíntico, un agente anti-neoplásico, un agente inmunorregulador, una agente anti-hipercolesterolemia y combinaciones de los mismos. Los kits generalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier escritura, o material grabado suministrado en o con el kit, o que de otra manera acompaña al kit.

[0110] La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con una formulación líquida de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En una realización, un recipiente lleno con una formulación líquida de la invención es una jeringa precargada. En una realización específica, las formulaciones de la invención se formulan en viales de dosis única como un líquido estéril. Por ejemplo, las formulaciones pueden suministrarse en viales ámbar de borosilicato de Tipo 1 de 3 cc (West Pharmaceutical Services - Part N° 6800-0675) con un volumen objetivo de 1,2 mL. Opcionalmente asociado con dicho(s) contenedor(es) puede ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana.

[0111] Cualquier jeringa precargada conocida por un experto en la técnica se puede usar en combinación con una

formulación líquida de la invención. Las jeringas precargadas que se pueden usar se describen, por ejemplo, en publicaciones PCT WO05032627, WO08094984, WO9945985, WO03077976, patentes de los Estados Unidos US6792743, US5607400, US5893842, US7081107, US7041087, US5989227, US6807797, US6142976, US5899889, Publicaciones de Patente de los Estados Unidos US20070161961A1, US20050075611A1, US20070092487A1, US20040267194A1, US20060129108A1. Los anillos prellenados pueden estar hechos de diversos materiales. En una realización, una jeringa precargada es una jeringa de vidrio. En otra realización, una jeringa precargada es una jeringa de plástico. Un experto en la técnica entiende que la naturaleza y/o calidad de los materiales usados para fabricar la jeringa puede influir en la estabilidad de una formulación de compuesto almacenada en la jeringa. Por ejemplo, se entiende que los lubricantes basados en silicio depositados en la superficie interior de la cámara de jeringa pueden afectar la formación de partículas en la formulación del compuesto. En una realización, una jeringa precargada comprende un lubricante a base de silicona. En una realización, una jeringa precargada comprende silicona horneada. En otra realización, una jeringa precargada está libre de lubricantes a base de silicona. Un experto en la técnica también comprende que pequeñas cantidades de elementos contaminantes que se filtran en la formulación desde el cilindro de la jeringa, la tapa de la punta de la jeringa, el émbolo o el tapón también pueden influir en la estabilidad de la formulación. Por ejemplo, se entiende que el tungsteno introducido durante el proceso de fabricación puede afectar negativamente a la estabilidad de la formulación. En una realización, una jeringa precargada puede comprender tungsteno a un nivel por encima de 500 ppb. En otra realización, una jeringa precargada es una jeringa de tungsteno baja. En otra realización, una jeringa precargada puede comprender tungsteno a un nivel entre aproximadamente 500 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 400 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 300 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 200 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 100 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 50 ppb y aproximadamente 10 ppb, entre aproximadamente 25 ppb y aproximadamente 10 ppb.

[0112] La presente invención también abarca un producto farmacéutico terminado empaquetado y etiquetado. Este artículo de fabricación incluye la forma de dosificación unitaria apropiada en un recipiente o contenedor apropiado tal como un vial de vidrio, una jeringa precargada u otro recipiente herméticamente sellado. En una realización, la forma de dosificación unitaria se proporciona como una solución estéril exenta de partículas que comprende una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es adecuado para administración parenteral. En otra realización, la forma de dosificación unitaria se proporciona como un polvo liofilizado estéril que comprende una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), (II), (III) o (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es adecuado para la reconstitución.

[0113] En una realización, la forma de dosificación unitaria es adecuada para administración intravenosa, intramuscular, intranasal, oral, tópica o subcutánea. Por lo tanto, la invención abarca soluciones estériles adecuadas para cada ruta de administración. La invención abarca además polvos liofilizados estériles que son adecuados para la reconstitución.

[0114] Como con cualquier producto farmacéutico, el material de envasado y el recipiente están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y el envío. Además, los productos de la invención incluyen instrucciones de uso u otro material informativo que aconseja al médico, técnico o paciente sobre cómo prevenir o tratar adecuadamente la enfermedad o trastorno en cuestión, así como cómo y con qué frecuencia administrar el producto farmacéutico. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o sugieren un régimen de dosificación que incluyen, pero no se limitan a, dosis reales, procedimientos de control y otra información de control.

[0115] Específicamente, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado, tal como una caja, botella, tubo, vial, envase, jeringa precargada, rociador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.), sobres y similares; y al menos una forma de dosificación unitaria de un compuesto de la invención contenido dentro del material de envasado, en donde el compuesto comprende una formulación líquida que contiene un antibiótico. El material de envasado incluye medios de instrucción que indican cómo se puede usar el compuesto para prevenir, tratar y/o gestionar uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno.

[0116] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera. A lo largo de esta aplicación, se hace referencia a varias patentes, solicitudes de patente y publicaciones. La presente divulgación regirá en el caso de que exista alguna incoherencia entre las patentes, las solicitudes de patentes y las publicaciones y esta divulgación.

EJEMPLIFICACIÓN

Ejemplo 1: Preparación de un compuesto de Fórmula (II)

[0117] Se cultivó aislado bacteriano (ISO18629) en agar al 2% de bacto con digestión de caseína 0,125 g/l, almidón de patata 0,1 g/l, ácidos casamino 1g/l y se suplementó con R4 al 10% (R4 al 100% siendo 10 g/litro glucosa, extracto de 1 g/litro de levadura, ácidos 0,1 g/litro de casamino, 3 g/litro de L-prolina, 10 g/litro de MgCl₂·6H₂, 4 g/litro

5 CaCl₂ 2H₂O, 0,2 g/litro K₂SO₄, 5,6 g/l de TES 0,56%, 1 mL de elementos traza, todos llevados a un total de 1 litro de agua del grifo y ajustado a pH 7,0 con NaOH 1,0 M) y una colonia se homogeneizó y se utilizó para inocular 40 ml de caldo de semilla BP (15 g/kg litro de glucosa, 10 g/litro de extracto de malta, 10 g/litro de almidón soluble, 5 g/litro de extracto de levadura, 10 g/litro de casaminoácido, 0,05 g/litro de carbonato de calcio llevado a un total de 1 litro con agua del grifo) en un matraz de 250 mL. Después de 4 días de fermentación a 28°C (250 rpm), se usaron 12,5 mL de cultivo de siembra para inocular 0,5 L de caldo de producción de R4 al 2,5% de inóculo (v/v). La fermentación se realizó durante 7 días a 28°C (180 rpm) antes de la cosecha.

10 [0118] El caldo de fermentación se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se adsorbió sobre una resina polimérica de fase inversa (HP-20, Mitsubishi). Después de lavar la columna con agua y acetona acuosa al 80%, el compuesto se eluyó con acetona. Este extracto de acetona se secó luego a presión reducida, dejando un aceite espeso de color naranja. Luego se añadieron hexanos a este aceite y la mezcla se sometió a ultrasonidos y se centrifugó. El sobrenadante se decantó luego y el residuo restante se secó a presión reducida. Este residuo se disolvió en DMSO y se purificó por RP-HPLC en una columna de preparación C-18 (H₂O / AcN con TFA al 0,1%, 10-100% durante 35 minutos). Las fracciones que contienen el compuesto de Fórmula (I) o (II) se liofilizaron para dejar un polvo blanco.

20 [0119] La estructura 2D del compuesto de Fórmula (II) se determinó mediante ¹H, ¹³C, COSY, DEPT-135, HSQC y HMBC RMN experimentación, que se puede ver en en las Figuras 1-6, respectivamente. La asignación de ¹³C para la estructura es la siguiente:

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Posición	δ (¹³ C)	Posición	δ (¹³ C)
1	31,9	29	57,3
2	61,9	30	36,9
3	36,4	31	14,7 o 15,4 o 16,0
4	135,0	32	25,3
5,5'	129,7	33	10,6 o 11,2 u 11,8
6,6'	128,9	34	170,9 o 171,4 o 171,6 o 171,7 o 171,8
7	127,5	35	56,5
8	167,1	36	62,7
9	57,9	37	170,9 o 171,4 o 171,6 o 171,7 o 171,8
10	36,5	38	56,2
11	15,5	39	71,2
12	24,4	40	15,9
13	11,3	41	168,9
14	170,6	42	52,2
15	55,6	43	17,1
16	62,4	44	173,1
17	170,2	45	52,2
18	52,7	46	37,2
19	31,9	47	53,5
20	28,4	48	48,3
21	174,4	49	160,0
22	170,9 o 171,4 o 171,6 o 171,7 o 171,8	50	170,9 o 171,4 o 171,6 o 171,7 o 171,8
23	56,8	51	57,8
24	37,4	52	36,3
25	14,7 o 15,4 o 16,0	53	14,7 o 15,4 o 16,0
26	26,2	54	24,5
27	10,6 o 11,2 u 11,8	55	10,6 o 11,2 u 11,8
28	170,9 o 171,4 o 171,6 o 171,7 o 171,8	56	169,3

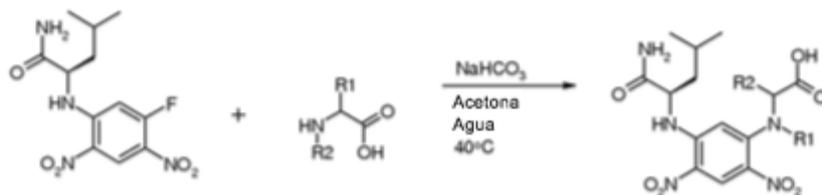
[0120] Además, esta estructura fue confirmada por MS/MS:

Tabla 2. Fragmentos de MS/MS y fórmulas correspondientes

Fragmento	Fórmula	Fragmento de masa
	$C_6H_{11}N_4O^+$	155,1
5	$C_{16}H_{23}N_2O_2^+$	275,1
	$C_{12}H_{24}N_5O_3^+$	286,2
	$C_{15}H_{29}N_6O_4^+$	357,2
	$C_{19}H_{28}N_3O_4^+$	362,2
10	$C_{19}H_{34}N_7O_5^+$	440,2
	$C_{24}H_{36}N_5O_6^+$	490,2
	$C_{22}H_{39}N_8O_7^+$	527,3
	$C_{30}H_{47}N_6O_7^+$	603,3
	$C_{28}H_{50}N_9O_8^+$	640,3
15	$C_{36}H_{58}N_7O_8^+$	716,4
	$C_{34}H_{61}N_1O_9^+$	753,4
	$C_{39}H_{69}N_{12}O_{11}^+$	881,5
	$C_{42}H_{74}N_{13}O_{13}^+$	968,5
20	$C_{48}H_{85}N_{14}O_{14}^+$	1.081,5
	$C_{52}H_{85}N_{14}O_{14}^+$	1.129,5

Todos los fragmentos que aparecen en la Tabla 2 son consistentes con la estructura 2D que se propuso en base a los datos de RMN.

[0121] Para determinar la estructura 3D del compuesto, se empleó un análisis estándar de Marfey. La preparación de los estándares de Marfey se realizó por reacción de todos los aminoácidos que se cree que están en la estructura del compuesto de Fórmula II en una matriz con L-FDLA, usando las condiciones mostradas en el Esquema 5, derivadas de Bhusan, R.; Bruckner, H. Amino Acids 2004, 27, 247, cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia.

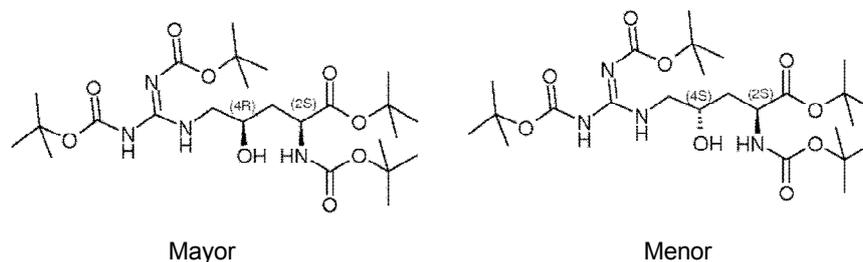


Esquema 5

[0122] Los aminoácidos utilizados fueron: L-isoleucina, D-isoleucina, alo-L-isoleucina, alo-D-isoleucina, L-serina, D-serina, ácido L-glutámico, ácido D-glutámico, N-metilo-L-fenilalanina, N-metilo-D-fenilalanina, L-alanina, D-alanina, L-treonina, D-treonina, Allo-L-treonina, Allo-D-treonina y los cuatro diastereómeros de enduracididina. Además, se prepararon los patrones de Marfey de las dos mezclas separadas de L- y L-Allo-enduracididina, sintetizadas como se describe a continuación. La hidrólisis del compuesto de Fórmula (II) seguido del aislamiento de fragmentos peptídicos permitió el posterior análisis de Marfey para determinar la estereoquímica y la posición de las isoleucinas y serinas.

(2S, 4R) como el diastereómero principal de una mezcla 6:1 con (2S, 4S) como el diastereómero menor).

[0123]



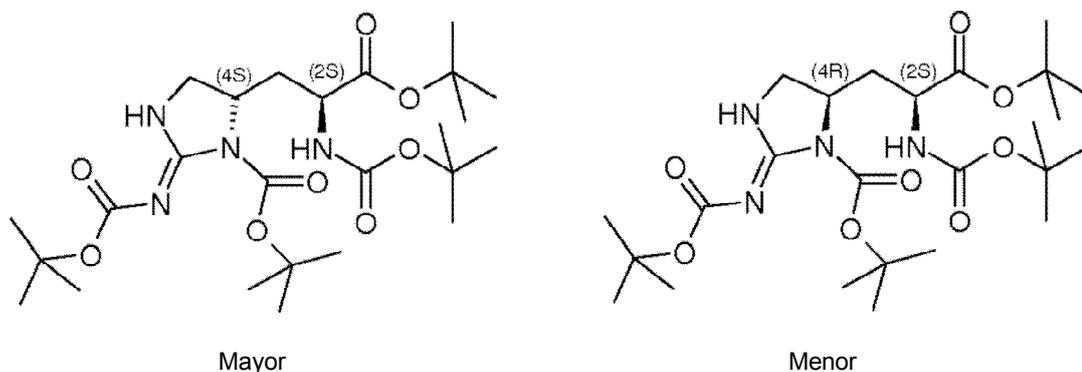
Mayor

Menor

[0124] A ácido (2S,4R)-2-terc-Butoxicarbonilamino-4-hidroxi-5-nitro-pentanoico éster terc-butílico (2,3 g, 6,9 mmol) en metanol anhidro (30 ml), a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió formato de amonio (4,4 g, 69 mmol) y 10% de paladio sobre carbono (735 mg, 0,7 mmol). La reacción se calentó a 40°C durante 1 hora, se enfrió y se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró a vacío para proporcionar un residuo oleoso que se disolvió en acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, que se volvió a extraer con acetato de etilo. Las capas combinadas de acetato de etilo se combinaron, se secaron a través de una frita hidrófoba y se concentraron a vacío. El aceite resultante se disolvió inmediatamente en acetonitrilo anhidro y a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de nitrógeno, se añadió 1-*H*-(pirazol)-1-*N*-terc-butoxicarbonilcarboxamida (2,1 g, 10,4 mmol). La reacción se agitó durante 20 horas antes de concentrarse al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice usando *iso*-hexanos/acetato de etilo (5/1) como eluyente para proporcionar el compuesto del título como un aceite viscoso (2,1 g, 56%, 3 pasos de Boc-Asp-OtBu). LCMS (m/z) = 547,3 [M+H], Tr = 3,45 min. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1,39-1,55 (m, 36H), 1,81- 2,01 (m, 2H), 3,37 - 3,49 (m, 1H), 3,56 - 3,66 (m, 1H), 3,88-4,01 (m, 1H), 4,19 - 4,30 (m, 1H), 5,19 - 5,30 (m, 1H), 5,38 - 5,52 (m, 1H), 8,67 - 8,78 (m, 1H), 11,45 (s, 1H).

Ácido (S)-5-((S)-2-terc-butoxicarbonilo-2-terc-butoxicarbonilamino-etilo)-2-[(E)-terc-butoxicarbonilimino]-imidazolidina-1-carboxílico éster terc-butílico (diastereómero principal de una mezcla 6:1 con (2S,4R) como el diastereómero menor).

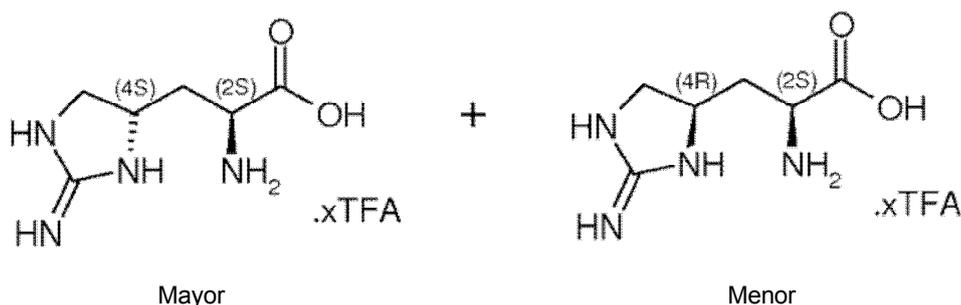
[0125]



[0126] Se enfrió una solución de éster terc-butílico del ácido (2S, 4R)-2-terc-Butoxicarbonilamino-4-hidroxi-5-nitro-pentanoico (900 mg, 1,7 mmol) en diclorometano anhidro (63 ml) a -78°C y bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (1,5 ml, 8,2 mmol). Esto fue seguido por la adición gota a gota de anhídrido trifluorometanosulfónico (0,3 ml, 1,8 mmol), manteniendo la temperatura por debajo de -76°C. Después de la adición, la reacción se agitó a -78°C durante 4 horas y luego se calentó a 0°C y se inactivó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La capa orgánica se separó, se lavó con 1M HCl (1x), se secó a través de una frita hidrófoba y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice usando *iso*-hexanos/acetato de etilo (1/2 luego 0/1) como eluyente para dar el compuesto del título como un aceite viscoso (740 mg, 85%). LCMS (m/z) = 529,5 [M+H], Tr = 2,38 min. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 1,38-1,66 (m, 36H), 1,87 - 2,02 (m, 1H), 2,14 - 2,34 (m, 1H), 3,60 - 3,84 (m, 1H), 3,91- 4,09 (m, 1H), 4,21 - 4,35 (m, 1H), 4,38 - 4,60 (m, 1H), 5,09 - 5,29 (m, 1H).

(2S,4S)-Sal de ácido trifluoroacético de enduracididina (diastereómero principal de una mezcla 6:1 con (2S, 4R) como el diastereómero menor).

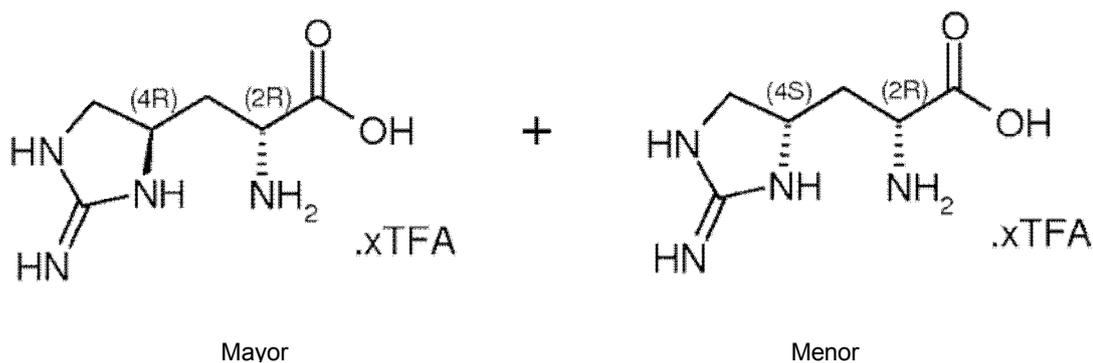
[0127]



[0128] Una solución de ácido (S)-5-((S)-2-terc-Butoxicarbonilo-2-terc-butoxicarbonilamino-etilo)-2-[(E)-terc-butoxicarbonilimino]-imidazolidina-1-carboxílico éster terc-butílico (740 mg, 1,4 mmol) en ácido trifluoroacético (20 ml) y agua (7 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La reacción se concentró a vacío y el residuo resultante se coevaporó en tolueno (3x). El aceite viscoso se secó a vacío durante 24 horas y el sólido resultante se trituró en éter dietílico. El sólido se filtró y se secó para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (600 mg, 83%). LCMS (m/z) = 173,3 [M+H], Tr = 0,22 min. ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 1,99-2,13 (m, 1H), 2,20 - 2,33 (m, 1H), 3,34 - 3,43 (m, 1H), 3,83 (t, J = 9,8 Hz, 1H), 3,96 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 4,17 - 4,31 (m, 1H).

(2R,4R)- Sal de ácido trifluoroacético de enduracididina (diastereómero principal de una mezcla 6:1 con (2R, 4S) como el diastereómero menor).

[0129]



[0130] (2R, 4R)-Enduracididine sal de ácido trifluoroacético se preparó, como el diastereómero principal de una mezcla 6:1 con el diastereómero menor (2R, 4S), al igual que (2S, 4S)-Enduracididine sal de ácido trifluoroacético

Ejemplo 2: Espectro antibacteriano

[0131] Un compuesto de Fórmula (II), preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, se sometió a un panel de especies bacterianas. El espectro antibacteriano del compuesto se muestra en la Tabla 3. La adición de suero al 10% no tuvo efecto sobre la concentración inhibidora mínima (CIM). Como se indica por los datos presentados en la Tabla 3, el compuesto tiene una actividad excelente contra patógenos Gram-positivos, incluyendo cepas resistentes. El compuesto también tiene baja potencia contra la mayoría de las bacterias Gram-negativas y buena actividad contra *H. influenzae*, lo que abre la posibilidad de tratar las infecciones del tracto respiratorio.

Tabla 3. Actividad antibacteriana de un compuesto de Fórmula (II)

Tensión	CIM (µg/mL)	Cepa	CIM (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococo resistente a vancomicina</i>	
ATCC 29213 (MSSA)	0,16-0,63	VRE <i>faecium</i> BM4147 (aac(6')-Ie-aph (2"))	0,31
NCTC 8325 (MSSA)	0,08-0,31	VSE <i>faecium</i> E4sol	0,31
ATCC 33591 (MRSA)	0,16-0,31	VRE <i>faecalis</i> ATCC51575	0,31-0,63
NRS54 (MRSA)	0,078-0,16	<i>E. faecalis</i> M192 (sensible a la vancomicina)	0,63
NRS108 (MRSA, también synergid R)	0,16	<i>Mycobacterium</i>	
NRS269 (MRSA, también tigeciclina R)	0,16-0,31	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	0,31
ATCC 700699 (GISA)	0,31	<i>M. tuberculosis</i> mc ² 6020 (Δ lysA, Δ panCD)	1,25
<i>S. epidermidis</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,125
ATCC 35984 = NRS101 (<i>mecA</i> positivo)	0,078-0,16	<i>M. tuberculosis</i> (aislado clínico 70)	0,125
NRS8 (<i>mecA</i> positivo)	0,16-0,31	<i>M. tuberculosis</i> (aislado clínico 76)	0,125-0,25
NRS34 (<i>mecA</i> positivo)	0,16	<i>M. tuberculosis</i> (aislado clínico 82)	0,125-0,25
<i>S. hemolyticus</i>		<i>M. tuberculosis</i> (aislado clínico 102)	0,25
NRS9 (<i>mecA</i> positivo)	0,08	Gram-negativo	
NRS69 (<i>mecA</i> positivo)	0,16	<i>Haemophilus influenzae</i> SJ7	2,5
Otros Gram-positivos		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	20
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC BAA 255	0,05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-01	> 100
<i>Streptococcus pneumoniae</i> VL-172	0,15	<i>E. coli</i> K12	12,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> VL-190	0,15	<i>E. coli</i> WO153 (AB1157; asmB1 Δ tol::kan)	2,5
SPN GSK 1629 (ATCC 10813)	0,08	<i>E. coli</i> WO159 (AB1157; asmB1 Δ rfaC::kan)	2,5
SPN 6303	0,04	<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,5
SPN BAA 1407	0,02-0,04	<i>E. coli</i> mutS	12,5
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615	0,31	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816	> 40
<i>S. warneri</i> NRS138	0,02	<i>Yersinia pestis</i> KIM 100 <i>delección</i> pDC1	50-100
<i>Bacillus anthracis</i> Sterne	0,02	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	25
<i>Bacillus subtilis</i> 1A1	0,02	<i>Bacteriodes fragilis</i>	200
<i>Clostridium difficile</i>	0,005		
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,078		

Además, hasta la fecha no se han identificado mutantes de *S. aureus* que sean resistentes a los compuestos de Fórmula (II). Los datos indican que la frecuencia de resistencia es $<10^{-10}$ (probados a 4XCIM). No se observó resistencia detectable después de 17 días de pases en serie.

[0132] El compuesto de fórmula (II) a continuación, se sometió a ensayo (en Micromyx, Kalamazoo, MI) contra 255 aislados clínicos contemporáneos, incluyendo linezolid, vancomicina, y las cepas resistentes/menos sensibles a la daptomicina. Los resultados de estos experimentos se resumen en las tablas 4-6 a continuación:

Tabla 4. Comparación de la actividad antibacteriana de un compuesto de Fórmula (II) contra Patógenos Gram-positivos Evaluados (CIM µg/mL)

Organismo	Droga	Intervalo CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%S ¹
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA (n=20)	Fórmula (II)	0,06-0,25	0,25	0,25	-
	Linezolid	2-4	2	4	100,0
	Vancomicina	0,5-1	0,5	1	100,0
	Daptomicina	0,12-0,25	0,25	0,25	100,0
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (n=20)	Fórmula (II)	0,06-0,5	0,12	0,25	-
	Linezolid	2-4	2	4	100,0
	Vancomicina	0,5-2	0,5	1	100,0
	Daptomicina	0,12-0,25	0,25	0,25	100,0
<i>Staphylococcus aureus</i> VISA (n=10)	Fórmula (II)	0,12-1	0,25	0,5	-
	Linezolid	1-4	2	2	100,0
	Vancomicina	1-8	4	8	10,0
	Daptomicina	0,25-1	0,5	1	100,0
<i>Staphylococcus aureus</i> Daptomicina ^{NS} (n=5)	Fórmula (II)	0,12-0,5	-	-	-
	Linezolid	1-32	-	-	80,0
	Vancomicina	0,5-8	-	-	40,0
	Daptomicina	2-8	-	-	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> Linezolid ^R (n=5)	Fórmula (II)	0,12-0,5	-	-	-
	Linezolid	16-> 32	-	-	0,0
	Vancomicina	1	-	-	100,0
	Daptomicina	0,25-0,5	-	-	100,0
<i>Estafilococo epidermidis</i> (n=20)	Fórmula (II)	≤ 0,03-0,25	0,12	0,12	-
	Linezolid	1-4	2	2	100,0
	Vancomicina	1-2	2	2	100,0
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=10) 50% VRE	Fórmula (II)	0,5-1	0,5	0,5	-
	Linezolid	1-2	2	2	100,0
	Vancomicina	0,5-> 32	1	> 32	50,0
	Daptomicina	0,12-8	0,25	0,5	90,0
<i>Enterococcus faecium</i> (n=10) 50% de VRE	Fórmula (II)	0,25-1	0,5	1	-
	Linezolid	1-2	2	2	100,0
	Vancomicina	0,5-> 32	0,5	> 32	50,0
	Daptomicina	0,5-1	0,5	1	100,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=20) 28,6% PSSP 33,3% PISP 38,1% PRSP	Fórmula (II)	≤ 0,03-0,06	≤ 0,03	≤ 0,03	-
	Linezolid	0,25-1	1	1	100,0
	Vancomicina	0,12-0,5	0,25	0,25	100,0
	Daptomicina	≤ 0,03-0,06	≤ 0,03	≤ 0,03	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=10)	Fórmula (II)	≤ 0,03-0,06	≤ 0,03	0,06	-
	Linezolid	0,5-1	1	1	100,0
	Vancomicina	0,25	0,25	0,25	100,0
	Daptomicina	≤ 0,03-0,06	≤ 0,03	0,06	100,0
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=10)	Fórmula (II)	0,06-0,12	0,12	0,12	-
	Linezolid	0,5-2	1	1	100,0
	Vancomicina	0,25-0,5	0,5	0,5	100,0
	Daptomicina	0,06-0,25	0,12	0,12	100,0
Estreptococos del grupo Viridans ² (n=5)	Fórmula (II)	≤ 0,03-0,12	-	-	-
	Linezolid	0,5-1	-	-	100,0
	Vancomicina	0,25-0,5	-	-	100,0
	Daptomicina	0,06-0,25	-	-	100,0

¹ criterios CLSI aplicados para la interpretación de % susceptible
² un aislado de cada uno de *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. intermedius* y *S. salivarius*
PISP: penicilina intermedia *S. pneumoniae*, PRSP: *S. pneumoniae* resistente a la penicilina

Tabla 5. Comparación de la actividad antibacteriana de un compuesto de Fórmula (II) contra CIM de Ciprofloxacina (µg/mL) contra Enterobacteriaceae Evaluadas

Organismo	Droga	Intervalo CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%S ¹
<i>Escherichia coli</i> (n=10) 40% ESBL	Formula (II)	32->32	>32	>32	-
	Ciprofloxacina	0,008->32	32	>32	20,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=10) 30% KPC	Formula (II)	>32	>32	>32	-
	Ciprofloxacina	0,03->32	0,25	>32	50,0
<i>Proteus spp.</i> ³ (n=10)	Formula (II)	>32	>32	>32	-
	Ciprofloxacina	0,015-1	0,015	0,06	100,0
<i>Enterobacter spp.</i> ² (n=10)	Formula (II)	>32	>32	>32	-
	Ciprofloxacina	0,015-0,12	0,015	0,06	100,0
<i>Serratia marcescens</i> (n=10)	Formula (II)	>32	>32	>32	-
	Ciprofloxacina	0,03-1	0,06	1	100,0

¹ Criterios aplicados CLSI para la interpretación del % susceptible
² *E. cloacae* (n=5), *E. aerogenes* (n=5)
³ *E. mirabilis* (n=5), *P. vulgaris* (n=5)
 ESBL: beta-lactamasa de espectro extendido positivo

Tabla 6. Comparación de la actividad antibacteriana de un compuesto de Fórmula (II) contra CIM de Ciprofloxacina (µg/ml) contra Patógenos Gram-Negativos no entéricos evaluados

Organismo	Droga	Intervalo CIM	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%S ¹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=10) 30% MDR	Fórmula (II)	> 32	> 32	> 32	-
	Ciprofloxacina	0,06-> 32	1	32	50,0
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=10) 80% MDR	Fórmula (II)	32-> 32	32	> 32	-
	Ciprofloxacina	0,12-> 32	> 32	> 32	20,0
<i>Haemophilus influenzae</i> (n=20) 25% de ampicilina ^R	Fórmula (II)	4-32	8	16	-
	Ciprofloxacina	0,004-0,25	0,008	0,008	100,0
<i>Moraxella catarrhalis</i> (n=20)	Fórmula (II)	1-2	1	2	-
	Ciprofloxacina	0,015-0,06	0,03	0,06	100,0

¹Criterio CLSI aplicado para la interpretación del % susceptible
 MDR: resistente a múltiples fármacos, Ampicilina^R: resistente a ampicilina

[0133] El compuesto de fórmula (II) se ensayó frente a diez aislados *B. anthracis* en las instalaciones de BL-3 en el Instituto de Investigación del Sur. El cribado se realizó mediante el uso de un ensayo de microdilución (96 pocillos) basado en la concentración inhibidora mínima (CIM) e incluyó los siguientes aislados de *Bacillus anthracis*: NR-36, NR-38, NR-41, NR-46, NR-411, NR-412, NR-413, NR-414, NR-415 y NR-3838. En primer lugar, se añadió caldo Mueller-Hinton que contenía 0,05% de Tween-80 a cada pocillo. Los compuestos de prueba, diluidos en caldo Mueller-Hinton que contenía 0,05% de Tween-80 se añadieron posteriormente (0,1 ml/pocillo) a los pocillos apropiados al doble de la concentración inicial deseada y se diluyeron dos veces en la placa para un total de 12 concentraciones (128 - 0,06 µg/mL). Las placas se inocularon a continuación (0,1 ml/pocillo) con una concentración específica de 1,0x10⁶ CFU/mL de patógeno diluido en Mueller-Hinton Broth que contenía 0,05% de Tween-80 y se incubaron durante la noche (16-20 horas). Después de la incubación, las placas se leyeron visualmente y los pocillos individuales se puntuaron para determinar la turbidez, el aclarado parcial o el aclarado completo. La prueba se realizó por duplicado y los siguientes controles se incluyeron en cada placa de prueba: i) solo medio (control de esterilidad); ii) organismo en medio (control negativo); y iii) doxiciclina (control positivo). La CIM se informa como la concentración más baja (µg/ml) de fármaco que inhibió visualmente el crecimiento del organismo (Tabla 3). El compuesto fue muy activo, con caldo CIM₉₀s = 0,125-≤0,06 µg/ml, y funcionó mejor que el fármaco comparador doxiciclina (véase Tabla 7).

Tabla 7		CIM (µg/mL)	
Organismo	Formula (II)	Doxiciclina	
<i>B. anthracis</i> NR-36	<0,06	0,06	
<i>B. anthracis</i> NR-38	<0,06	0,125	
<i>B. anthracis</i> NR-41	<0,06	0,06	
<i>B. anthracis</i> NR-46	<0,06	0,125	
<i>B. anthracis</i> NR-411	<0,06	0,125	
<i>B. anthracis</i> NR-412	0,125-0,06 ^a	0,03	
<i>B. anthracis</i> NR-413	0,125	0,06	
<i>B. anthracis</i> NR-414	80,06	0,125	
<i>B. anthracis</i> NR-415	80,06	0,06	
<i>B. anthracis</i> NR-3838	80,06	0,06	

^aEl CIM se encuentra en algún lugar entre los dos valores dados debido al aclaramiento parcial en los pocillos a 0,125 µg/ml y el aclaramiento completo en los pocillos a 0,06 µg/ml

Ejemplo 3: Actividad de citotoxicidad, actividad hemolítica, doblado de ADN, inhibición de hERG, actividad inhibidora del citocromo P450, genotoxicidad, estabilidad del plasma, unión a proteínas

Actividad de citotoxicidad

[0134] Los cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón NIH3T3 (ATCC CRL-1658, en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 10% de suero de ternera) y Hep-G2 (ATCC HB-8065TM, en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero de ternera fetal al 10%) se cultivaron durante 3 días a 5% de CO₂ en aire, 37°C, humidificado. Los cultivos se tripsinizaron, se contaron y se sembraron en los pocillos de la placa de fondo plano estéril de 96 pocillos (1.500 células/pocillo/100 µL para NIH3T3 y 4.000 células/pocillo/100 µL para Hep-G2). Después de 24 horas, los medios en cada pocillo se reemplazaron con 100 µL de medio reciente (que contenía una dilución en serie de dos veces de un compuesto de Fórmula (II) preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 desde 0,8 µg/ml hasta 100 µg/mL, y un control sin compuesto) que se había incubado durante 2 horas a 5% de CO₂ en aire, 37°C, humidificado. Después de otras 48 horas de incubación a 5% de CO₂ en aire, 37°C, humidificado, 20 µL de indicador (Promega CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) se añadieron a las células. Después de 2 horas de incubación, las placas se leyeron a 490 nm usando el espectrofotómetro Spectramax Plus. Las células viables podrán reducir el reportero mientras que las células muertas no pueden. Los resultados mostraron que no hubo pérdida de viabilidad en los días NIH3T3 y Hep-G2 después de dos días de incubación con un compuesto de Fórmula (II) probado hasta una concentración de 100 µg/mL.

Actividad hemolítica

[0135] Glóbulos rojos humanos frescos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) hasta que la fase superior después de la centrifugación estaba clara (sin color rojo detectable por el ojo). El sedimento se resuspendió hasta una OD600 final de 24 en PBS y se añadió a los pocillos de la placa estéril de 96 pocillos en U (99 µL por pocillo). Un compuesto de Fórmula (II) se diluyó dos veces en serie en agua suplementada con Tween al 0,05% y 1 µL de cada concentración añadida a los pocillos, dando como resultado una concentración final ensayada que oscila entre 0,003 y 200 µg/ml de un compuesto de Fórmula (II). Después de 1 hora a 37°C, las células se centrifugan a 1.000xg durante 5 minutos a 4°C. Se eliminan 10 µL del sobrenadante y se añaden a 90 µL/pocillo de PBS (en una placa de 96 pocillos). El contenido en el pocillo se mezcla y la placa a 450 nm usando el espectrofotómetro Spectramax Plus. Los resultados mostraron que no hubo hemólisis detectable después de 1 hora de incubación con un compuesto de Fórmula (II) probado hasta una concentración de 200 µg/ml.

Unión de ADN

[0136] Un compuesto de Fórmula (II) se diluyó dos veces en serie en agua suplementada con 0,05% de Tween (de concentración de 2,5 mg/mL a 4,9 µg/ml). Se añadió un volumen de 3 µl de la concentración en serie de un compuesto de Fórmula (II) a (a) 6 µl de ADN de esperma de salmón cizallado (10 mg/mL, cizallado mediante jeringa 20 veces con una aguja de calibre 20) o (b) 6 µL de agua. Los compuestos de control se trataron de manera similar. La actinomicina D se usó como un compuesto de control positivo ya que se sabe que se une al ADN mientras que la vancomicina se usó como un compuesto negativo ya que se sabe que no se une al ADN. Después de mezclarse bien, se observó un volumen de 7,5 µl en un césped de células *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 en crecimiento. Las zonas de inhibición del crecimiento alrededor de las manchas se miden después de 16 horas de crecimiento a 37°C. Una disminución en el tamaño de la zona de inhibición indica pérdida de actividad antibacteriana debido a la unión al ADN. Por ejemplo, la actividad de 1 µg de Actinomicina D se eliminó por la presencia de 50 µg de ADN mientras que no hubo efecto del ADN sobre la actividad de la vancomicina. Los resultados mostraron que no hubo pérdida de la inhibición del crecimiento para el compuesto de Fórmula (II) debido a la presencia de ADN (6,6 µg/µL),

lo que indica que el compuesto de Fórmula (II) no se une al ADN.

Inhibición de hERG

5 **[0137]** El compuesto de fórmula (II) también mostró una inhibición insignificante contra hERG en un ensayo *in vitro* de patch-clamp [$CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (~ 1000 X CIM)].

10 **[0138]** Brevemente, los experimentos se realizaron en un instrumento IonWorks™ HT (Molecular Devices Corporation), que realiza automáticamente mediciones de electrofisiología en 48 células individuales simultáneamente en una placa especializada de 384 pocillos (PatchPlate™). Las células utilizadas fueron células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de forma estable con hERG. Se prepara una suspensión de células individuales en solución extracelular (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con calcio y magnesio pH 7-7,2) y se añaden alícuotas automáticamente a cada pocillo de un PatchPlate™. Las células se colocaron luego sobre un pequeño orificio en el fondo de cada pocillo aplicando un vacío debajo de la placa para formar un sello eléctrico. El vacío se aplicó a través de un único compartimento común a todos los pocillos que se llena con solución intracelular (tamponada a pH 7,2 con HEPES). La resistencia de cada sello se midió a través de un electrodo de tierra común en el compartimento intracelular y se colocaron electrodos individuales en cada uno de los pocillos superiores. El acceso eléctrico a la célula se logró mediante la circulación de un agente perforante, anfotericina, debajo del PatchPlate™ y luego midiendo la corriente de precompuesto hERG. Se colocó un electrodo en el compartimento extracelular y se aplicó un potencial de retención de -80 mV durante 15 segundos. Los canales de hERG se activaron aplicando un paso de despolarización a +40 mV durante 5 segundos y luego se fijaron a -50 mV durante 4 segundos para obtener la corriente de cola de hERG, antes de volver a -80 mV durante 0,3 s.

25 **[0139]** A continuación, se añadió el compuesto de ensayo a diversas concentraciones (0,008, 0,04, 0,2, 1, 5 y 25 μm) a los pocillos superiores de la PatchPlate™. El compuesto de prueba se dejó en contacto con las células durante 300 segundos antes de registrar las corrientes usando el mismo protocolo de paso de voltaje que en el escaneo de precompuesto. Quinidina, un inhibidor de hERG establecido, se incluyó como control positivo.

30 **[0140]** Las corrientes postcompuestas se expresaron como un porcentaje de corrientes precompuestas y se representaron gráficamente frente a la concentración para cada compuesto. Cuando se observó una inhibición dependiente de la concentración, los datos se ajustaron a la siguiente ecuación y el valor CI_{50} calculado:

$$y = y_{\max} - y_{\min} + y_{\min}$$

$$1 + (x/x_{50})^s$$

40 Cuando $y = (\text{corriente post-compuesto} / \text{corriente pre-compuesto}) \times 100$, x = concentración, x_{50} = concentración requerida para inhibir la corriente en un 50% (CI_{50}) y s = pendiente de la gráfica.

45 Tabla 8. Resultados de la inhibición de hERG

Compuesto	CI_{50} (μM)	n	Comentarios
Fórmula (II)	> 100	13	41,8% de inhibición a 100 μm
Quinidina	1,44	8	Control positivo

Actividad inhibidora del citocromo P450

55 **[0141]** Después se ensayaron los compuesto de Fórmula (II) para la actividad inhibidora del citocromo P450. Brevemente, microsomas de hígado se incubaron con el compuesto a 37°C en 10 y 30 μm por triplicado. Se realizaron incubaciones de control que contenían inhibidores de vehículo o de referencia junto con los agentes de ensayo. El ensayo final contenía agente de prueba, sustratos de sonda a la concentración indicada, NADPH 2 mM, MgCl_2 3 mM en tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4. La concentración microsomal final fue de 0,5 mg/mL. La concentración máxima de disolvente en el ensayo final fue $\leq 0,5\%$ para minimizar la inhibición de citocromos por disolvente. NADPH se agregó al final para comenzar el ensayo. Al final de diez minutos de incubación, el ensayo se detuvo mediante la adición de un estándar interno que contenía acetonitrilo, las muestras se centrifugaron y la cantidad de metabolito de la sonda en el sobrenadante se determinó por LC/MS/MS. El siguiente sustrato de la sonda, el metabolito de la sonda y los inhibidores de control se usaron para realizar y validar los ensayos. (Tabla 9).

65

Tabla 9. Sustratos de ensayo de Cyp e inhibidores de control

Cyp	Sustrato sonda	de	Concentración de sustrato de la sonda (µM)	de	Metabolito de la sonda	Inhibidor de control
Cyp1A2	fenacetina		10		acetaminofeno	α-naftoflavona
Cyp2C9	tolbutamida		100		hidroxitolbutamida	sulfafenazol
Cyp2C19	S-mefenitoína		50		hidroxi-mefenitoína	ticlopidina
Cyp2D6	dextrometorfano		1		dextroorfano	quinidina
Cyp3A4/5	testosterona		100		6β-hidroxi-testosterona	ketoconazol
Cyp3A4/5	midazolam		2		hidroximidazolam	ketoconazol

15 **[0142]** Los resultados para ensayar el compuesto de Fórmula (II) se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10. Compuesto de fórmula (II): % de inhibición en comparación con el vehículo

Cliente ID	Conc. ensayo	CYP3A4-Midazolam	CYP3A-Testosterona	CYP2C9	CYP2D 6	CYP2D19	CYP1A2
Fórmula	30 µM	17,3%	28,4%	7,4%	33,5%	3,2%	0,0%
	10 µM	13,7%	16,1%	14,8%	32,9%	3,9%	3,6%

25 **[0143]** Los compuestos de control se realizaron como se esperaba (Tabla 11).

Tabla 11. Compuestos de control: % de inhibición en comparación con el vehículo

	CYP3A4-Modazolam	CYP3A4-Testotrone	CYP2C9	CYP2D6	CYP2C19	CYP1A2
Controles	Ketoconazol ^a	ketoconazol ^a	sulfafenazol ^a	quinindina ^a	ticlopidina ^b	α-naftoflavona ^a
Conc. 1	95,8%	96,8%	87,5%	91,7%	93,5%	72,4%
Conc. 2	69,0%	75,2%	55,6%	60,6%	51,9%	45,3%
^a : probado a conc.1 (1 µm) y conc.2 (0,1 µm) ^b : probado a conc.1 (10 µm) y conc.2 (1 µm)						

40 **[0144]** En resumen, 10 µm (~40XCIM), el compuesto de Fórmula (II) mostró una inhibición de menos de 16% contra cinco de los seis isoenzimas de CYP probado y la inhibición 32,9% contra CYP2D6

Genotoxicidad

45 **[0145]** El compuesto de fórmula (II) se ensayó entonces para el potencial de genotoxicidad en un ensayo de micronúcleos *in vitro*. Brevemente, la prueba de micronúcleos *in vitro* emplea imágenes de células fluorescentes para evaluar la citotoxicidad y la cuantificación de micronúcleos, un modelo bien aceptado para detectar carcinógenos genotóxicos. El ensayo se realizó con células CHO-K1 en presencia o ausencia de fracción S9 de hígado de rata tratada con Aroclor, con el compuesto probado en un rango de concentración de diez puntos (0,004, 0,01, 0,04, 0,1, 0,4, 1,0, 4,0, 10, 40, 100 µm) por duplicado. No se observó genotoxicidad para el compuesto de Fórmula (II) hasta 100 µm (~ 400XCIM) en una prueba de micronúcleo *in vitro* (+/-S9).

55 **[0146]** No se observó potencial genotóxico para el compuesto de Fórmula (II) cuando se evaluó *in silico* frente a una batería de modelos predictivos compuesta por los siguientes puntos finales: mutagenicidad de *Salmonella*, mutagenicidad de *E. coli*, linfoma de ratón, aberraciones cromosómicas *in vitro* y micronúcleo *in vivo*. Esta evaluación computacional se basó en las predicciones de la relación de actividad estructural cuantitativa realizadas con las aplicaciones Leadscope® Model Applier y Leadscope® Toxicity Databases (Leadscope Inc., Columbus, OH). En resumen, los modelos QSAR de toxicidad genética se construyeron en el Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) del Personal de Análisis de Seguridad Informática y Computacional (ICSAS). Los modelos se construyeron utilizando el software Leadscope Prediction Data Miner (PDM) utilizando todas las configuraciones predeterminadas. La mayoría de los modelos QSAR se construyeron a partir de información pública e incluyen las estructuras y conclusiones del conjunto de capacitación como parte de la descripción del modelo. Los modelos QSAR están entrenados con descriptores moleculares que incluyen características estructurales y 8 propiedades calculadas. Las características estructurales incluyen las características de jerarquía predeterminadas de Leadscope (características del

Leadscope) más los andamios predictivos generados con la configuración predeterminada [4,5]. Las ocho propiedades calculadas son; peso molecular de los padres, aLogP, área de superficie polar, aceptores de enlaces de hidrógeno, donantes de enlaces de hidrógeno, número de enlaces rotacionales y puntaje Lipinski (conteo de violaciones de reglas).

5

Estabilidad plasmática

[0147] El compuesto de Fórmula (II) se ensayó a continuación para la estabilidad del plasma. Se desarrolló primero un método bioanalítico sensible para detectar el compuesto de Fórmula (II) en plasma usando HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Las muestras de plasma se enriquecieron con el compuesto de Fórmula (II) a diversas concentraciones, se extrajeron con acetonitrilo y se analizaron mediante LC/MS/MS. El límite bajo de cuantificación en plasma fue de 8,5 ng/ml. El compuesto de Fórmula (II) se incubó después a 5 µm por duplicado con las diferentes muestras de plasma (ratón, rata, ser humano y perro) a 37°C. En varios puntos de tiempo, (0, 20, 40, 80, 120 minutos) se extrajo una alícuota de cada reacción experimental y se mezcló con tres volúmenes de solución de parada enfriada con hielo (metanol que contiene propranolol, diclofenaco u otro estándar interno). Las reacciones detenidas se incubaron al menos diez minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a continuación para eliminar la proteína precipitada, y los sobrenadantes se analizaron mediante LC/MS/MS para cuantificar el resto del progenitor. En resumen, el compuesto de Fórmula (II) exhibió una semivida en plasma larga (≥ 150 minutos) en el plasma de todas las especies analizadas.

20

Enlace proteico

[0148] El compuesto de fórmula (II) se ensayó entonces para la unión por diálisis de equilibrio de proteínas. Brevemente, el compuesto se incubó primero a 5 µm con plasma de rata. Esta mezcla se dializó entonces en un dispositivo RED (Pierce) (membrana de diálisis de corte de 8.000 MW) según las instrucciones del fabricante frente a dextrosa al 5% (D5W), y se incubó en un agitador. Al final de la incubación, se recogieron alícuotas de los lados tanto de plasma como de D5W, se añadió una cantidad igual de D5W a la muestra de plasma, y se añadió un volumen igual de plasma a la muestra D5W. Se añadió metanol (tres volúmenes) que contenía un patrón interno para precipitar las proteínas y liberar los agentes. Después de la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a una nueva placa y se analizó para el compuesto por LC/MS/MS. En resumen, el compuesto exhibió 82-85% de unión a proteína plasmática.

30

Ejemplo 4: Estabilidad microsomal

[0149] La estabilidad metabólica de un compuesto de Fórmula (II) a continuación, se midió en microsomas de hígado de rata (Invitrogen/Life Technologies, CA) mediante el control de la desaparición del compuesto durante un período de dos horas. El compuesto se incubó con microsomas y se tomaron muestras a 0, 0,5 h, 1 h y 2 h. Las muestras se analizaron mediante la inhibición del crecimiento de *S. aureus* y mediante LC/MS. Después de dos horas, hubo una disminución insignificante del compuesto, mientras que el verapamilo, utilizado como control positivo, se degradó a sus metabolitos esperados. No se observó una disminución significativa en la actividad antibacteriana o la producción de metabolitos extensivos con el compuesto durante el período de dos horas.

40

Ejemplo 5: Especificidad de acción

[0150] Para proporcionar una idea del mecanismo y la especificidad de acción del compuesto de Fórmula (II), preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, se realizó un estudio de síntesis macromolecular con *S. aureus*. Se midió la incorporación de timidina, uridina, leucina o N-acetilglucosamina tritiada en ADN, ARN, proteína o peptidoglicano, respectivamente, y se examinó el efecto del compuesto sobre la tasa de biosíntesis. Los resultados indicaron que el compuesto de Fórmula (II) inhibía fuertemente la síntesis de peptidoglucano, comparable a la vancomicina (véase la Figura 7).

50

Ejemplo 6: Estudio de septicemia en ratón

[0151] El compuesto de fórmula (II) se ensayó contra el aislado clínico de *S. aureus* MRSA ATCC 33591 en un ensayo de protección de septicemia de ratón (véase Fridodt-Moller, N., Knudsen, J.D. y Espersen, F. (1999) La peritonitis de modelo de ratón/sepsis. En: Zak, O., Sande, M.A. eds. Handbook of animal model infection San Diego: Academic Press, 127-136, cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia) para evaluar su biodisponibilidad *in vivo* y la dosis protectora que da como resultado 50% de supervivencia (PD₅₀) de ratones infectados después de 48 horas. Ratones hembras CD-1 se infectaron con 0,5 ml de suspensión bacteriana (3,28 x10⁷ CFU/ratón) mediante inyección intraperitoneal, una concentración que alcanza el % de mortalidad de al menos 90 dentro de las 48 horas después de la infección. Una hora después de la infección, los ratones se trataron con el compuesto por vía intravenosa con dosis únicas y los resultados se muestran en la Tabla 12. El compuesto de Fórmula (II) mostró una PD₅₀ excelente de 0,19 mg/kg, comparando muy favorablemente a la de vancomicina.

60

65

Tabla 12. Resultados de PD₅₀

Droga	Ruta	Frecuencia de dosificación	de PD ₅₀ (mg/kg)	Intervalo de confianza
Comp. de Fórmula (II)	IV	QD	0,19	0,07-0,31
Vancomicina	IV	QD	~ 2,75	-

En resumen, el compuesto mostró una excelente dosis protectora del 50% de 0,19 mg/kg en comparación con la vancomicina (~2,75 mg/kg) en el modelo de protección contra la septicemia en ratones. El compuesto proporcionó protección completa a una dosis de 0,5 mg/kg.

Ejemplo 7: Eficacia in vivo: modelo de infección de muslo de ratón.

[0152] Un compuesto de Fórmula (II), como se preparó en el Ejemplo 1, se ensayó a continuación contra MRSA en el modelo de infección neutropénica de muslo de ratón. Este modelo es un excelente sistema para medir el efecto del fármaco en el patógeno con la mayor parte del sistema inmunitario del huésped eliminado. El modelo se usa ampliamente para determinar los parámetros PK/PD para estimar la dosificación. También es un buen modelo para infecciones bacterianas agudas de la piel y de la estructura de la piel (ABSSSI), una indicación clínica potencial para el compuesto en función de su espectro antibacteriano.

[0153] Se trataron previamente ratones CD-1 hembras con ciclofosfamida para convertirlos en neutropénicos con dos dosis consecutivas de 150 y 100 mg/kg administradas 4 y 1 días antes de la infección. Las bacterias se resuspendieron en solución salina estéril y se ajustaron a una DO de 0,1 a 625 nm (inóculo de infección: $2,8 \times 10^5$ CFU/ratón). Se inyectó a los ratones el inóculo en los muslos derechos en un volumen de 0,1 mL. A las 2 horas después de la infección, los ratones recibieron tratamiento con el compuesto de Fórmula (II) a 1, 2,5, 5, 10 o 20 mg/kg administrados en una dosis única, inyección intravenosa. Cuatro ratones fueron tratados por concentración de dosis. Un grupo de ratones infectados se sacrificó y los muslos se procesaron para CFU para que sirvieran como controles de tiempo de tratamiento (T = Rx). A las 26 horas después de la infección, los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. Los muslos derechos se retiraron asépticamente, se pesaron, se homogeneizaron, se diluyeron en serie y se sembraron en agar de soja de tripticasa. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO₂, y CFU se determinó por gramo de muslo (véase la Tabla 13).

Tabla 13. Acción antimicrobiana de un compuesto de Fórmula (II) en la infección de *S. aureus* en el muslo.

Compuesto	Dosis (mg/kg/día)	n	Log UFC/g de muslo	DE	Cambio de registro de control	Cambio de registro de T = Rx
T = Rx	-	4	6,02	0,13	-	-
Ninguna	-	5	8,30	0,31	-	-
Fórmula (II)	20	4	4,44	0,16	-3,86	-1,58
Fórmula (II)	10	4	4,45	0,52	-3,85	-1,57
Fórmula (II)	5	4	4,49	0,12	-3,81	-1,53
Fórmula (II)	2,5	4	4,51	0,37	-3,79	-1,51
Fórmula (II)	1	4	6,20	1,78	-2,1	0,18

[0154] El compuesto de Fórmula (II) redujo significativamente la carga de patógenos cuando se dosifica con una única inyección IV a 2,5 mg/kg o superior.

[0155] El compuesto de fórmula (II) también se ensayó en un modelo de eficacia de infección de muslo (ratones neutropénicos) con MRSA como el agente de infección. Se observó una reducción de CFU superior a la log de la carga infecciosa inicial cuando se dosificó a 20, 10, 5 o 2,5 mg/kg (dosis única iv en agua). La infección fue estática a 1 mg/kg.

[0156] Los datos anteriores demuestran la seguridad y el modo atractivo de acción con características de desarrollo de baja resistencia que hacen del compuesto de Fórmula (II) una ventaja atractiva para el desarrollo de un agente terapéutico.

Ejemplo 8: Eficacia in vivo: modelo de neumonía de ratón.

[0157] Se evaluó entonces el compuesto de Fórmula (II) contra *Streptococcus pneumoniae* en un modelo de neumonía de ratón inmunocompetente para determinar el potencial del compuesto para tratar las infecciones respiratorias agudas. Brevemente, los ratones CD-1 se infectaron por vía intranasal con *Streptococcus pneumoniae*

ATCC 6301 (UNT012-2) ($1,5 \times 10^6$ CFU/ratón). El compuesto se administró por vía intravenosa a las 24 y 36 horas después de la infección, y a dosis que varían de 0,5 a 10 mg/kg/dosis. A las 48 horas después de la infección, los ratones tratados se sacrificaron, se retiraron asépticamente los pulmones y se procesaron para los títulos de CFU.

5 **[0158]** Como se observa en la Tabla 14, el compuesto de Fórmula (II) fue altamente eficaz en este modelo, con una reducción de CFU de casi 6-log a las 48 horas con 10 mg/kg/dosis. Se observó una relación de respuesta a la dosis para el compuesto de Fórmula (II) en el intervalo de concentraciones evaluadas. La cantidad del compuesto de Fórmula (II) requerida para lograr reducciones de CFU de 1, 2 y 3 \log_{10} se calculó en 0,27, 0,48 y 0,75 mg/kg/dosis, respectivamente [usando Graph Pad Prism (véase 5.0f)]. Se estimó una dosis estática de <0,5 mg/kg/dosis para el compuesto de Fórmula (II).
10

Tabla 14. Acción antimicrobiana de Fórmula (II) en modelo de infección pulmonar

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Nº de ratones	CFU medio de Log_{10}	DE	Cambio de Log_{10} de 24 h	Cambio de Log_{10} de 48 h
Fórmula (II)	10	5	2,78	0,74	-3,97	-5,83
Fórmula (II)	5	5	3,11	1,08	-3,64	-5,5
Fórmula (II)	2,5	5	4,5	0,17	-2,25	-4,1
Fórmula (II)	1	5	4,69	1,45	-2,07	-3,92
Fórmula (II)	0,5	5	6,37	0,56	-0,38	-2,24
Amoxicilina	10	5	2,78	0,77	-3,98	-5,83
Control de infección: 24 horas después de la infección	NA	5	6,75	0,31	NA	-1,86
Control de infecciones: 48 horas después de la infección	NA	5	8,61	0,46	1,86	NA

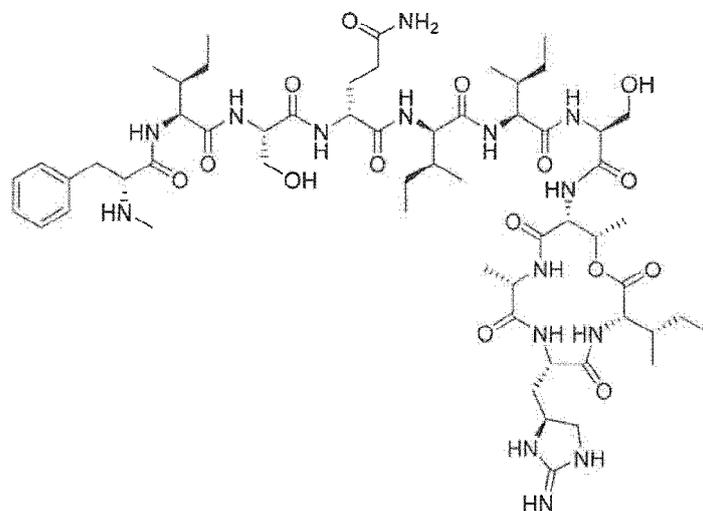
15
20
25
30
35 **[0159]** En un estudio de seguimiento, se observó una relación dosis-respuesta para el compuesto de Fórmula (II) en el rango de concentraciones evaluadas (10, 5,0, 2,5, 1,0 y 0,5 mg/kg BID). Se determinó que las dosis del compuesto de Fórmula (II) requeridas para alcanzar 1, 2 y 3 Log_{10} de reducciones de CFU eran 0,27, 0,48 y 0,75 mg/kg/dosis, respectivamente. Se estimó una dosis estática de <0,5 mg/kg/dosis para el compuesto de Fórmula (II).

EQUIVALENTES

40 **[0160]** Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, usando no más que experimentación de rutina, numerosos equivalentes a las realizaciones específicas descritas específicamente en este documento. Tales equivalentes están destinados a estar abarcados en el alcance de las siguientes reivindicaciones.
45
50
55
60
65

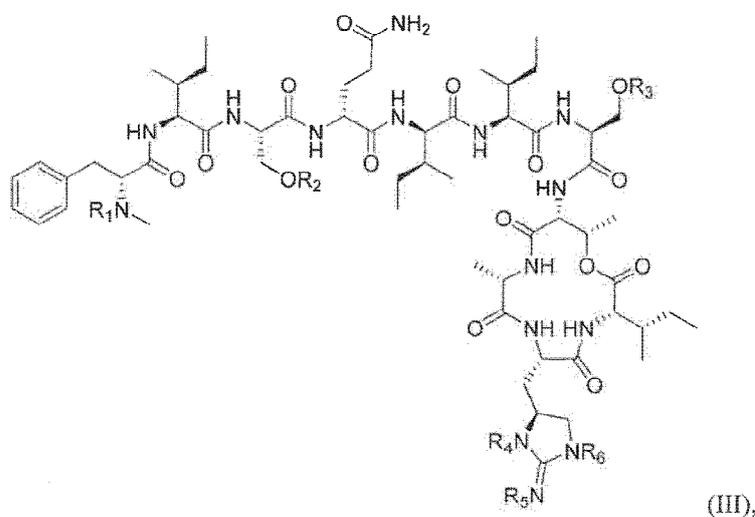
Reivindicaciones

1. Un compuesto aislado de Fórmula (II):



o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto aislado de Fórmula (III):

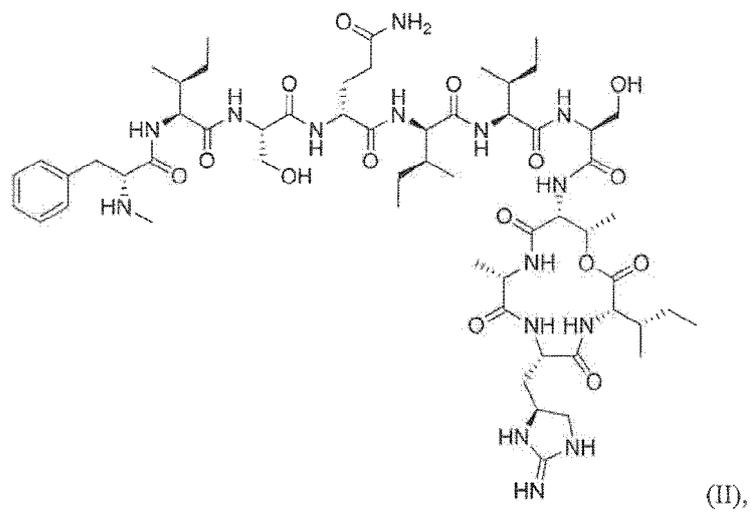


o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde cada R₁ - R₆ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, C(=O)R_a y S(=O)₂ R_b; cada R_a es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, o arilo; y cada R_b es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o arilo.

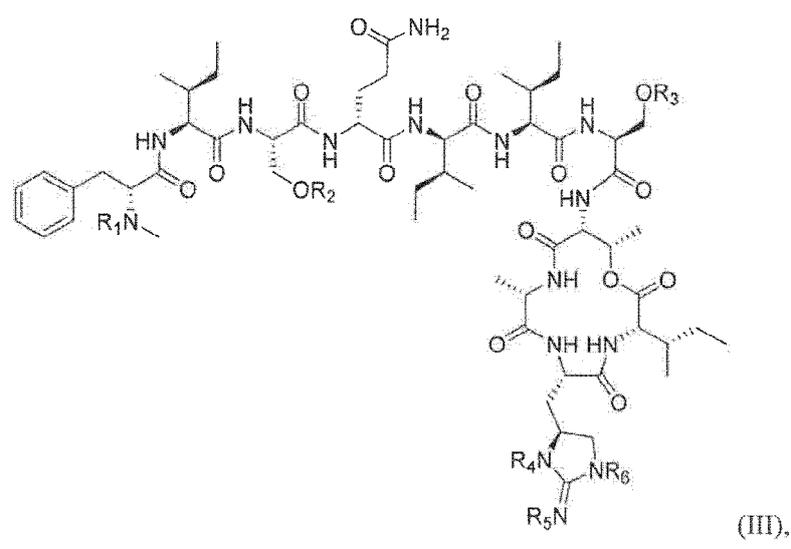
3. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 1 o 2 y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; que comprende opcionalmente además un agente seleccionado del grupo que consiste en un antibiótico, un agente antifúngico, un agente antiviral, un agente antiprotozoario, un agente antihelmíntico, un agente antineoplásico, un agente inmunorregulador, un agente anti-hipercolesterolemia y combinaciones de los mismos.

4. Un método para producir (a) un compuesto de Fórmula (II):

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o (b) un compuesto de Fórmula (III):



o una sal del tautómero o farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada R₁-R₆ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, C(=O)R_a y S(=O)₂R_b; cada R_a es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, o arilo; y cada R_b es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o arilo; comprendiendo el método: cultivar un aislado bacteriano ISO18629 en un medio de cultivo, comprendiendo el medio de cultivo fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas en condiciones aerobias.

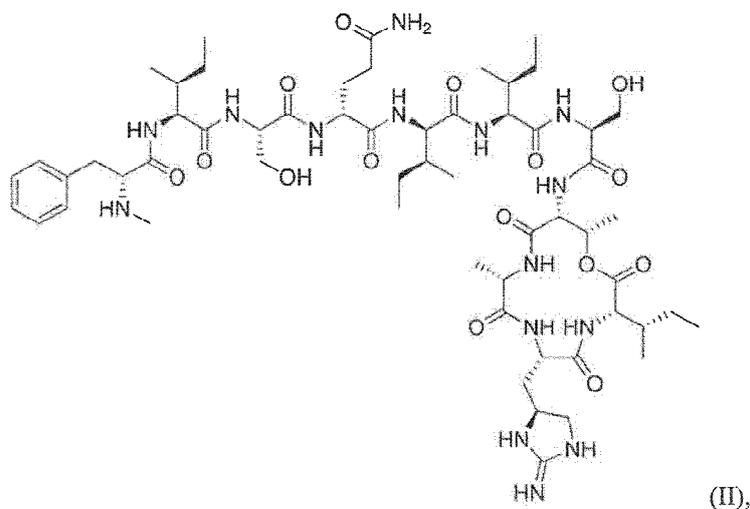
- 5. El método de la reivindicación 4, que comprende además aislar el compuesto de Fórmula (II) o (III).
- 6. Un compuesto de Fórmula (II) o (III) preparado de acuerdo con el método de la reivindicación 4.
- 7. Un compuesto de Fórmula (II),

5

10

15

20



o un tautómero o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o Fórmula (III):

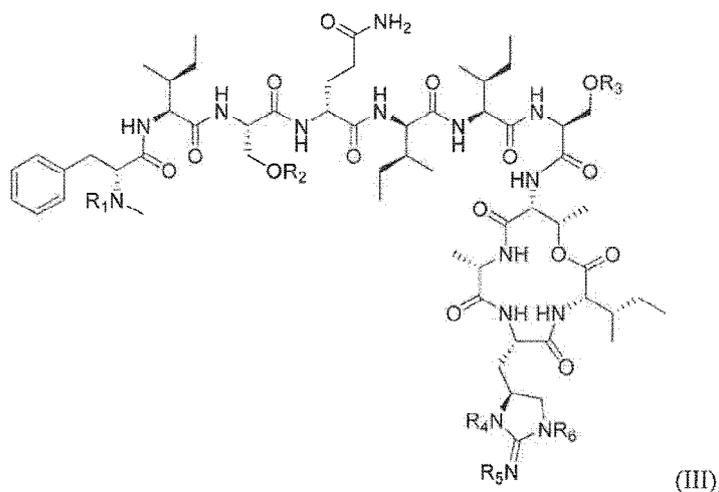
25

30

35

40

45



50

o una sal del tautómero o farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada R₁-R₆ se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenido, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenido, arilo, C(=O)R_a y S(=O)₂ R_b; cada R_a es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenido, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenido, o arilo; y cada R_b es independientemente uso de alquilo, alquenido, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenido o arilo para tratar un trastorno en un sujeto.

55

60

65

8. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que (a) el sujeto se selecciona del grupo que consiste en un mamífero, un ser humano, un animal y una planta; o (b) el trastorno es causado por un patógeno seleccionado del grupo que consiste en una bacteria, un hongo, un virus, un protozooario, un helminto, un parásito y combinaciones de los mismos; opcionalmente en donde el patógeno es (1) una bacteria; opcionalmente en donde la bacteria es (i) una bacteria Gram-positiva; opcionalmente, en donde la bacteria Gram-positiva se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacteria*, *Listeria*, *Bacillus*, *Erysipelothrix*, *Mycobacterium*, *Clostridium* y *Actinomycetales*; o (b) estafilococos susceptibles a la meticilina y resistentes a la meticilina (incluidos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus* y estafilococos coagulaneos negativos), glucopéptidos de *Staphylococcus aureus* de sensibilidad intermedia (GISA), estreptococos susceptibles a penicilina y resistentes a la penicilina (incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* y Streptococci Grupo C, Streptococci del grupo G y *Streptococci Viridans*), enterococos (incluidas las cepas

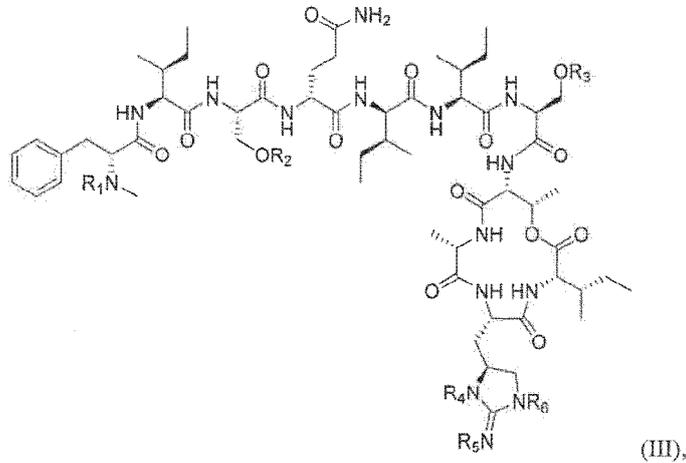
o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
 (b) poner en contacto el agente con un compuesto de Fórmula (III):

5

10

15

20



25

o una sal del tautómero o farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde
 cada R_1 - R_6 se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo,
 cicloalquenilo, arilo, $C(=O)R_a$ y $S(=O)_2R_b$; cada R_a es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo,
 cicloalquilo, cicloalquenilo, o arilo; y cada R_b es independientemente alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo,
 cicloalquenilo o arilo;

30

inhibiendo así el crecimiento *in vitro* del agente infeccioso.

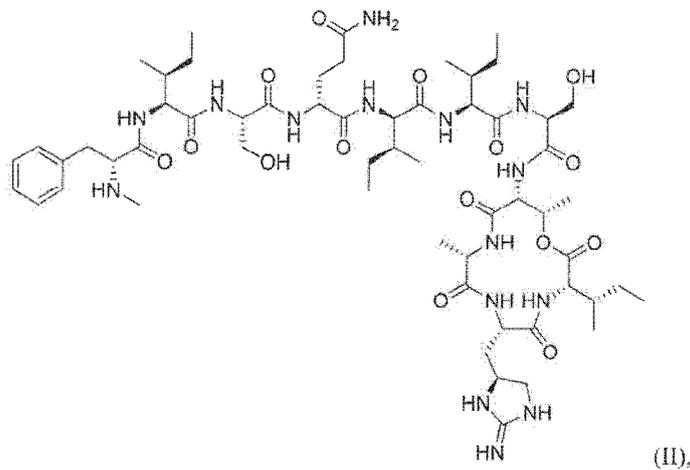
11. Un compuesto de Fórmula (II):

35

40

45

50



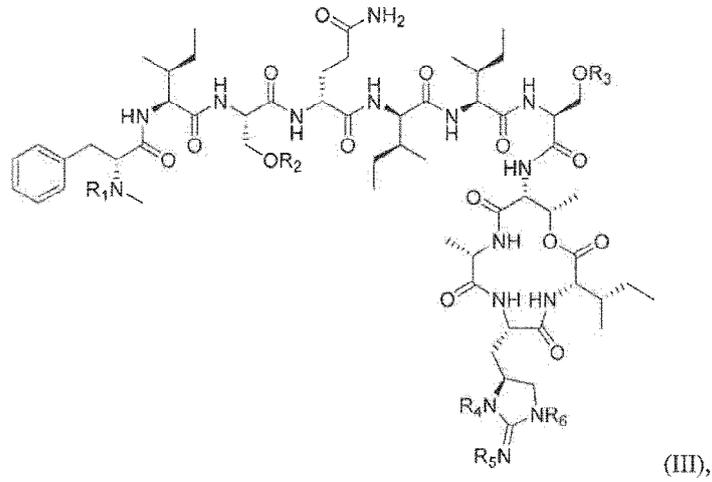
o tautómero o sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o

55

(b) un compuesto de Fórmula (III):

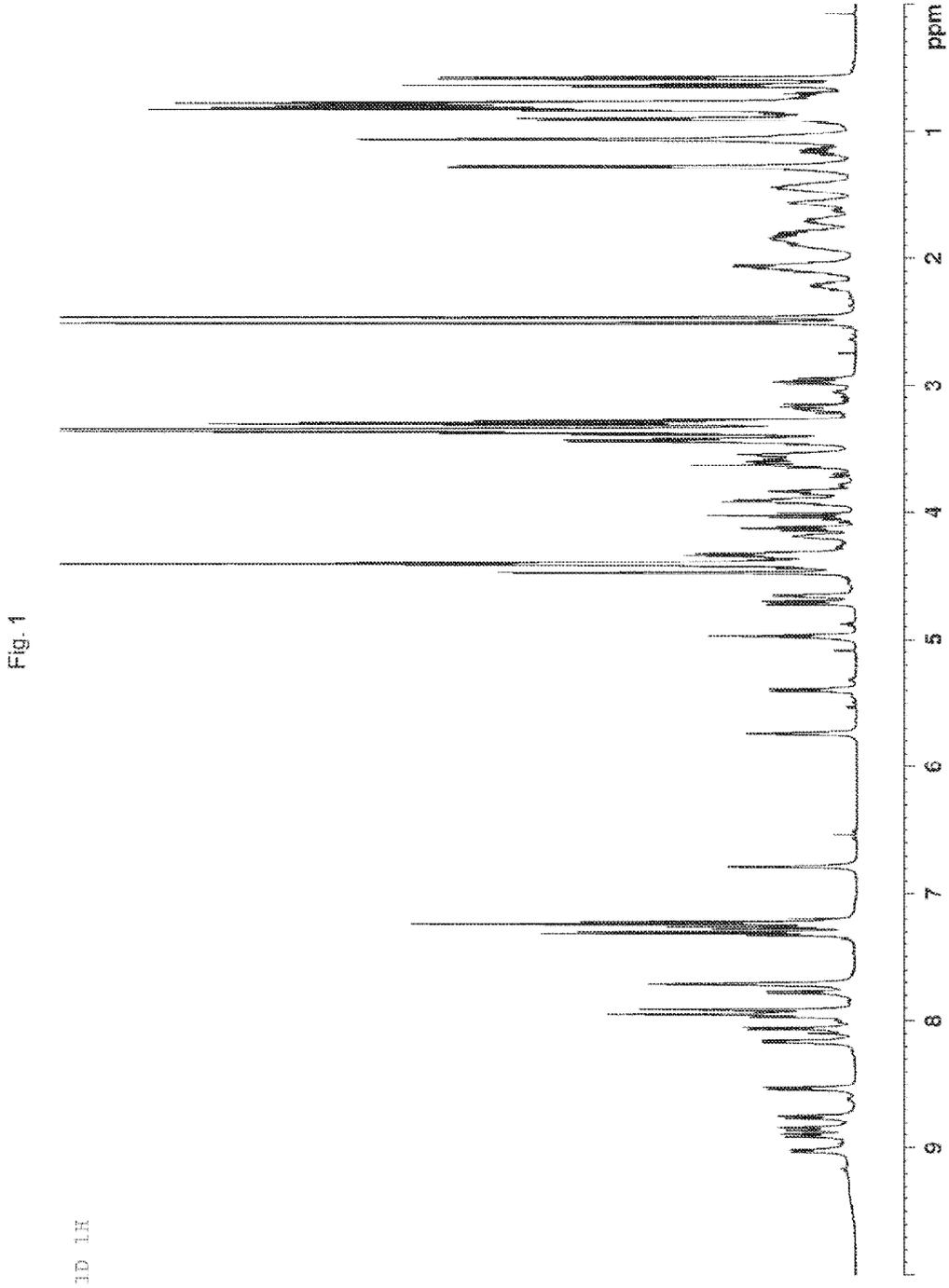
60

65



o una sal del tautómero o farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada R_1 - R_6 se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, arilo, $C(=O)R_a$ y $S(=O)_2 R_b$; cada R_a es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, o arilo; y cada R_b es independientemente alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno o arilo;

para uso en un método para inhibir el crecimiento de un agente infeccioso, comprendiendo el método poner en contacto el agente con un compuesto.



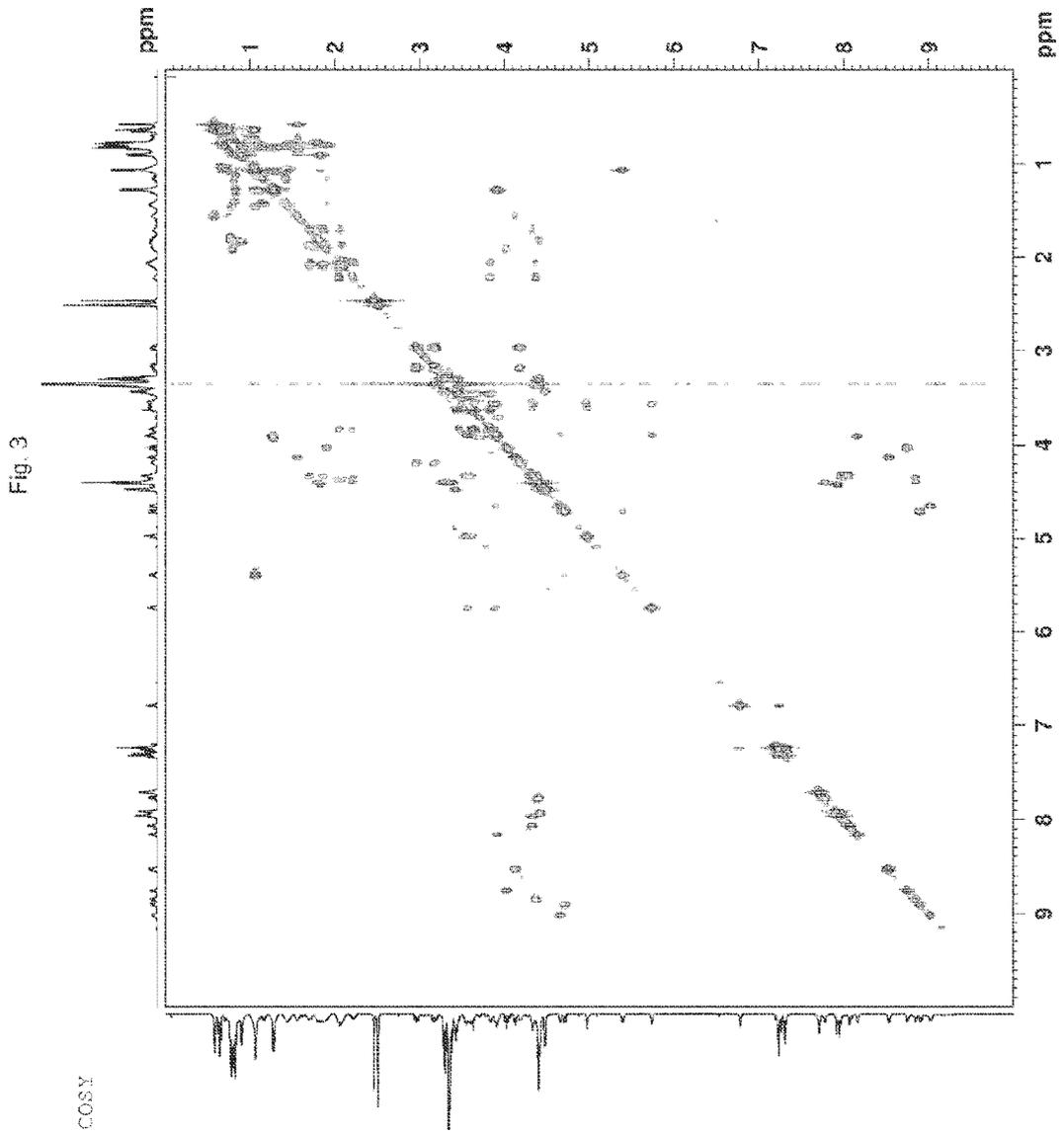


Fig. 4

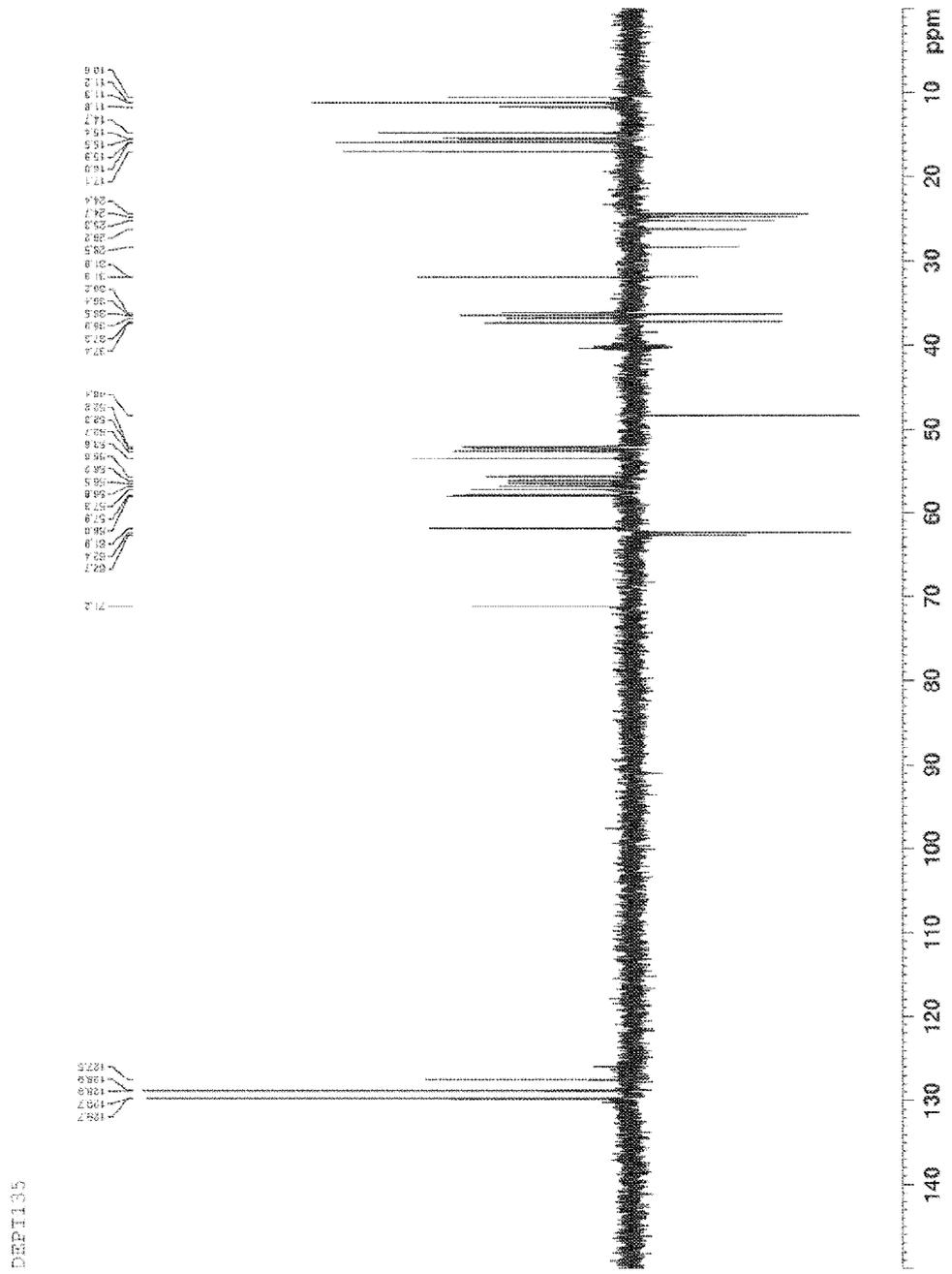
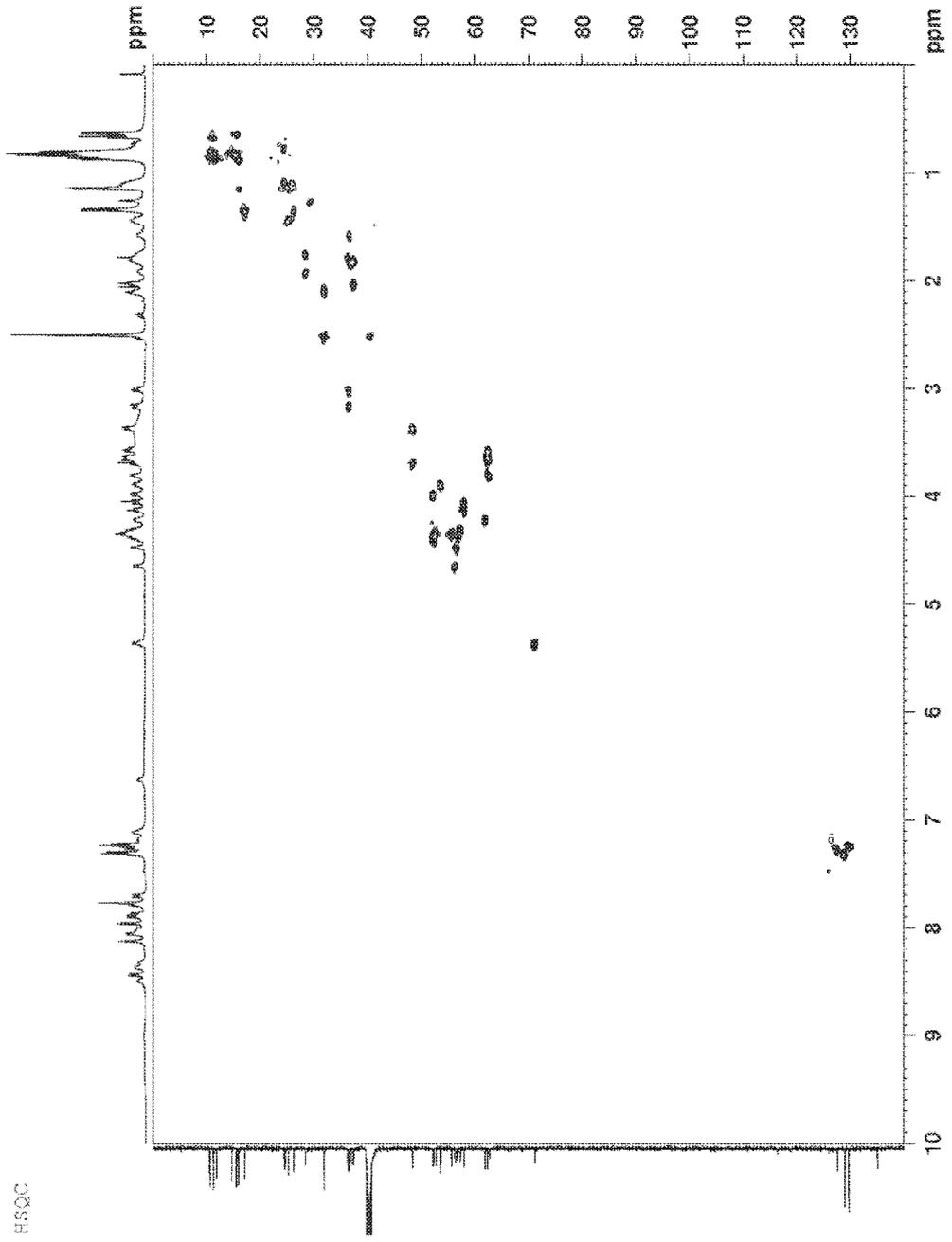


Fig. 5



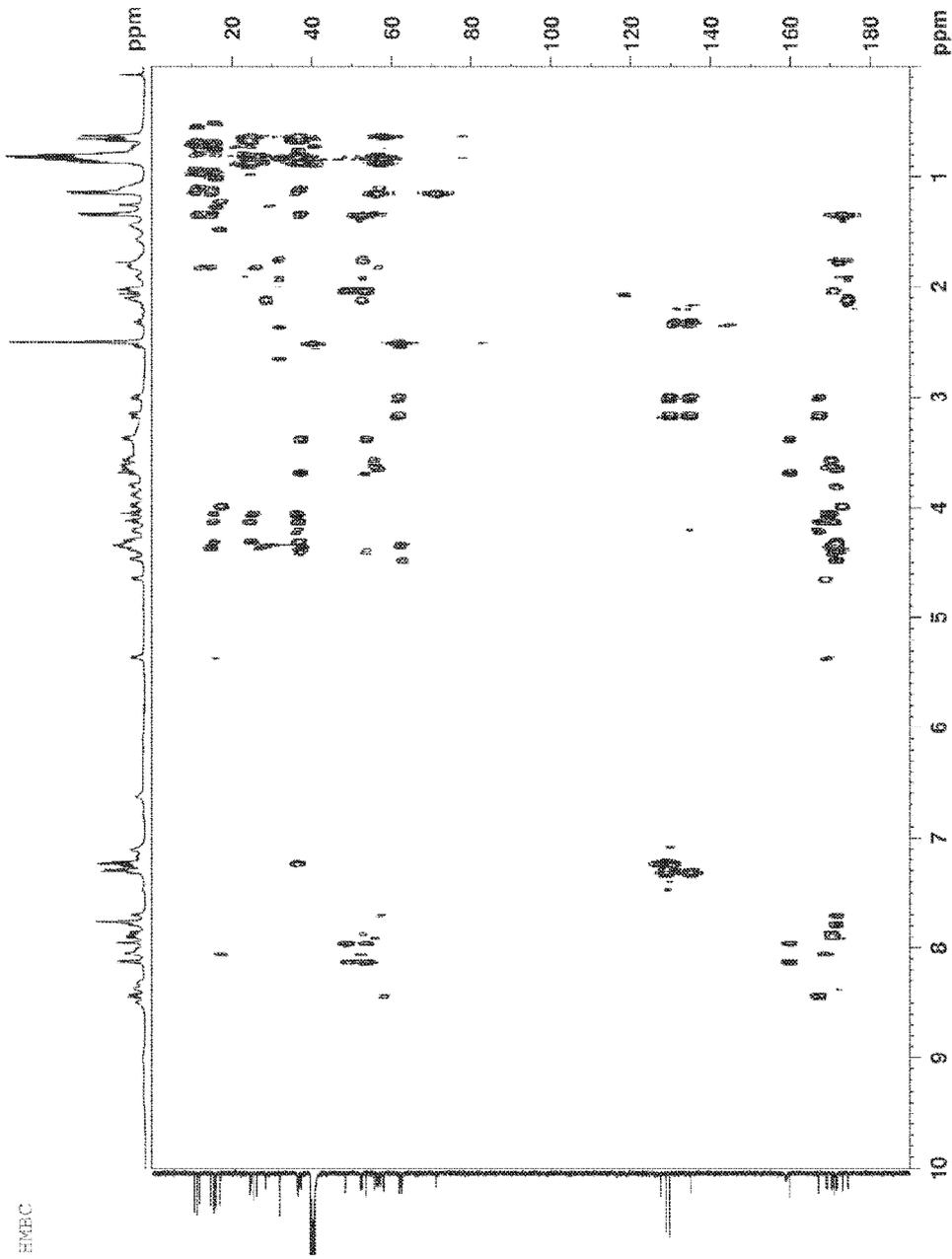


Fig. 6

HMBC

Fig. 7

