

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 168**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 31/7052 (2006.01)
C07H 17/08 (2006.01)
A61K 31/424 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
C07D 498/04 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2009 PCT/US2009/061976**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010 WO10048599**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2009 E 09822826 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2365747**

54 Título: **Procedimientos para tratar enfermedades gastrointestinales**

30 Prioridad:

24.10.2008 US 108134 P
20.03.2009 US 162109 P
24.10.2008 US 108168 P
24.10.2008 US 108110 P
24.10.2008 US 108137 P
24.10.2008 US 108112 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2018

73 Titular/es:

CEMPRA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
6340 Quadrangle Drive, Suite 100
Chapel Hill, NC 27517, US

72 Inventor/es:

FERNANDES, PRABHAVATHI, B.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 676 168 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para tratar enfermedades gastrointestinales

5 CAMPO TÉCNICO

La invención descrita en esta solicitud se refiere al tratamiento de enfermedades gastrointestinales. En particular, la invención descrita en esta solicitud se refiere al tratamiento de enfermedades gastrointestinales con antibióticos macrólidos y cetólidos.

10

ANTECEDENTES Y RESUMEN DE LA INVENCION

La mayoría de las bacterias en el intestino delgado son Gram-positivas, mientras que las del colon son en su mayoría Gram-negativas. La primera parte del colon es principalmente responsable de fermentar los carbohidratos, mientras que la última parte descompone principalmente las proteínas y los aminoácidos. El crecimiento bacteriano es rápido en el intestino ciego y el colon ascendente, que tiene un pH bajo y, en consecuencia, es lento en el colon descendente, que tiene un pH casi neutro. El cuerpo mantiene el equilibrio y las ubicaciones adecuadas de las especies al alterar el pH, la actividad del sistema inmune y la peristalsis.

La gastritis es una inflamación del revestimiento del estómago. Hay muchas causas posibles. La gastritis puede ser causada por el consumo excesivo de alcohol o por el uso prolongado de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, también conocidos como AINE, tal como la aspirina o el ibuprofeno. A veces la gastritis se desarrolla después de una cirugía mayor, lesión traumática, quemaduras o infecciones graves. Determinadas enfermedades, tal como la anemia perniciosa y el reflujo biliar crónico, o trastornos autoinmunes, también pueden causar gastritis. Es importante destacar que la gastritis puede ser causada por una infección con bacterias, tales como *Helicobacter pylori*. El síntoma más común es malestar o dolor abdominal. Otros síntomas son indigestión, distensión abdominal, náuseas y vómitos, o una sensación de plenitud o ardor en la parte superior del abdomen.

La gastroenteritis es la inflamación del tracto gastrointestinal, que afecta tanto al estómago como al intestino delgado, a menudo dando como resultado diarrea aguda. La inflamación es causada con mayor frecuencia por la infección con determinados virus, pero también puede ser causada por bacterias o parásitos. En todo el mundo, el tratamiento inadecuado de la gastroenteritis mata de 5 a 8 millones de personas por año y es la principal causa de muerte entre bebés y niños menores de 5 años. De forma similar, la enteritis se refiere a la inflamación del intestino delgado con causas similares.

35

Muchas bacterias diferentes pueden causar gastroenteritis, incluidas *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Yersinia* y otras. Algunas fuentes de la infección son alimentos inadecuadamente preparados, platos de carne recalentados, mariscos, lácteos y productos de panadería. Cada organismo causa síntomas ligeramente diferentes, pero todos dan como resultado diarrea. Colitis e inflamación del intestino grueso, también puede estar presentes.

40

Varias especies de *Salmonella* son capaces de causar gastroenteritis, incluida *S. enterica*, que se subdivide en varios serotipos. Ejemplos ilustrativos incluyen *Serovar Typhi* (anteriormente conocida como *S. Typhi*), que es el agente de la enfermedad responsable de la fiebre tifoidea, y *Serovar Typhimurium* (también conocida como *S. Typhimurium*), que conduce a una forma de gastroenteritis humana a veces denominada salmonelosis. Varias especies de *Shigella* también son responsables de la gastroenteritis. Ejemplos ilustrativos incluyen *S. boydii*, *S. dysenteriae*, que es una causa importante de disentería; *S. flexneri*; y *S. sonnei*. Una especie ilustrativa de *Campylobacter* que causa gastroenteritis en seres humanos es *C. jejuni*. Es una de las causas más comunes de gastroenteritis humana en el mundo. Las especies de *Yersinia* también son una causa de gastroenteritis, un ejemplo ilustrativo es la zoonótica *Y. enterocolitica*. La enfermedad causada por *Y. enterocolitica* se llama yersiniosis. Algunas cepas de *Helicobacter* son patógenas para los seres humanos y están fuertemente asociadas con úlceras pépticas, gastritis crónica, duodenitis y cáncer de estómago. Una especie ilustrativa responsable de la enfermedad en seres humanos es *H. pylori*.

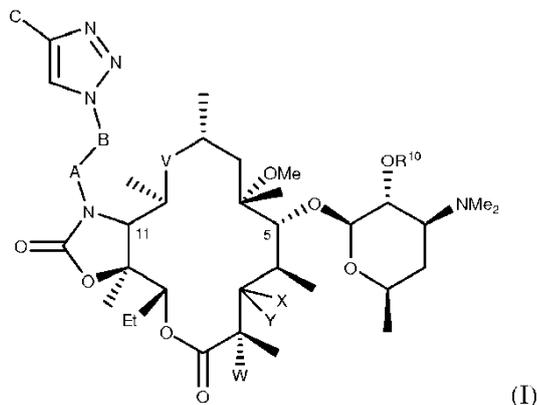
50

Según se informa, la claritromicina (CLR) es el único antibiótico macrólido conocido que funciona *in vivo* en *Helicobacter pylori*. Aunque otros antibióticos macrólidos muestran actividad *in vitro* contra *H. pylori*, a menudo no son suficientemente activos a pH bajo para trabajar *in vivo*. Además, puede que los antibióticos, tales como la azitromicina (AZI) y la telitromicina (TEL), no alcancen niveles suficientemente elevados de tejidos y de circulación sanguínea para mostrar la eficacia en *H. pylori*. Sin estar ligado a teoría alguna, en esta solicitud se sugiere que una unión a proteínas elevada puede impedir que otros antibióticos macrólidos tengan dicha actividad *in vivo*. Por lo general, se requiere un pH mínimo para que los antibióticos macrólidos muestren actividad.

60

Se ha descubierto sorprendentemente en esta solicitud que los macrólidos que contienen triazol, incluyendo los

5 cetólidos, muestran alta actividad antibacteriana a pH bajo, o a niveles de pH mucho más bajos que el pH mínimo requerido por otros antibióticos macrólidos para la eficacia. También se ha descubierto en esta solicitud inesperadamente que los compuestos descritos en esta solicitud tienen una alta actividad antibacteriana contra patógenos de la enfermedad de la gastroenteritis (GDP), tales como *H. pylori* (HP), y patógenos de la enfermedad de la gastritis y la diarrea, tales como *Campylobacter jejuni* (CJ), *Salmonella spp.*(SAL) y *Shigella spp.* (SHI). Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula (I) se describe en esta solicitud



10 que incluye sales farmacéuticamente aceptables del mismo; donde

R₁₀ es hidrógeno o acilo;

X e Y se toman juntos con el carbono unido para formar carbonilo;

V es C(O);

15 W es H o F;

A y B tomados juntos forman butileno o pentileno;

C es arilo opcionalmente sustituido;

para su uso en el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal que es causada al menos en parte por una infección por *H. pylori* (HP), *C. jejuni* (CJ), *Salmonella spp.*(SAL), *Shigella spp.* (SHI) o una combinación de las mismas.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. Los procedimientos se describen en esta solicitud para tratar enfermedades que surgen de poblaciones de organismos patógenos que causan enteritis, gastroenteritis y/o una enfermedad relacionada. Los procedimientos incluyen la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula (I), o los diversos subgéneros de los mismos se describen en esta solicitud, a un paciente que necesita alivio o que padece una enfermedad causada por un organismo patógeno. Los usos se describen en esta solicitud para la fabricación de medicamentos. Los medicamentos incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de fórmula (I), o los diversos subgéneros de los mismos se describen en esta solicitud, o una o más de sus composiciones descritas en esta solicitud. Los medicamentos son adecuados para tratar enfermedades, tales como enteritis, gastroenteritis y/o una enfermedad relacionada que surge de poblaciones de organismos patógenos. Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos se describen en esta solicitud para tratar enfermedades causadas por *H. pylori*.

35 Cada realización de las composiciones, procedimientos y medicamentos incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más macrólidos o cetólidos que contienen triazol, tales como uno o más compuestos o fórmula (I). La cantidad terapéuticamente efectiva se administra a un paciente que necesita alivio o que padece la enfermedad.

En otra realización, los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos se describen en esta solicitud para tratar enfermedades causadas por *H. pylori*. que incluyen la administración conjunta de uno o más inhibidores de la bomba de protones, tales como, pero sin limitación, omeprazol, esopremazol y similares.

En otra realización, las formulaciones orales de los compuestos y composiciones descritos en esta solicitud incluyen recubrimiento entérico. Sin estar ligado a teoría alguna, se cree en esta solicitud que el recubrimiento entérico puede impedir la degradación del ácido estomacal de los inhibidores de la bomba de protones a compuestos intermedios aquirales. Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos se describen en esta solicitud para tratar enteritis, gastroenteritis y enfermedades relacionadas, que incluyen la administración conjunta de otros antibióticos, que incluyen, pero sin limitación, antibióticos fluoroquinolónicos, metronidazoles, vancomicina y similares, y combinaciones de los mismos. Los compuestos, composiciones, procedimientos y medicamentos se

describen en esta solicitud para tratar enteritis, gastroenteritis y enfermedades relacionadas, acompañadas de síntomas de diarrea, que incluyen la administración conjunta de otros compuestos para disminuir la motilidad intestinal. Se aprecia que los compuestos macrólidos descritos en esta solicitud también pueden disminuir la motilidad intestinal. Los agentes que disminuyen la motilidad intestinal ilustrativos incluyen, pero sin limitación, 5 loperamida, un análogo opioide de uso común para el tratamiento sintomático de la diarrea, y subsalicilato de bismuto (BSS), un complejo insoluble de bismuto y salicilato trivalente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 Fig. 1. Susceptibilidades comparativas de *S.aureus* ATCC 25923 y *L.monocytogenes* EGD a CEM-101, TEL, AZI y CLR, basadas en las determinaciones de MIC en caldo ajustado al pH.

Fig. 2. Efecto de eliminación de tiempo a corto plazo de CEM-101 y AZI en *S.aureus* (ATCC 25923) en caldo (paneles izquierdos, pH 7,4) o después de la fagocitosis por macrófagos THP-1 (paneles derechos). Ambos fármacos se usaron a una concentración extracelular de 0,7 (paneles superiores) o 4 (paneles inferiores) mg/litro.

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

FIG. 3. Relaciones de concentración-efecto para CEM-101, TEL, CLR y AZI hacia *S. aureus* (ATCC 25923) en caldo (paneles izquierdos) y después de la fagocitosis por macrófagos THP-1 (paneles derechos). La ordenada muestra el cambio en CFU (Δ log CFU) por ml (caldo) o por mg de proteína celular (macrófagos THP-1) a las 24 h en comparación con el inóculo inicial. La abscisa muestra las concentraciones de los antibióticos de la siguiente manera: (i) paneles superiores, concentraciones de peso (en mg/litro) en caldo (izquierda) o en el medio de cultivo (derecha) y (ii) paneles inferiores, múltiplos de la MIC tal como se determina en el caldo a pH 7,4. Todos los valores son medias \pm desviaciones estándar (SD) de tres experimentos independientes (cuando no son visibles, las barras SD son más pequeñas que los símbolos). Análisis estadístico basado en el análisis global de parámetros de ajuste de curva (análisis de varianza de una vía); la única diferencia significativa es entre CEM-101 y AZI en caldo ($P = 0,04$). Los valores numéricos de los descriptores farmacológicos pertinentes y los análisis estadísticos de sus diferencias se muestran en la Tabla 1.

Fig. 4. Relaciones de concentración-efecto para CEM-101 y AZI hacia *L. monocytogenes* intrafagocítica (cepa EGD, 30 paneles izquierdos) y *L. pneumophila* (cepa ATCC 33153, paneles derechos). La ordenada muestra el cambio en CFU (Δ log CFU) por mg de proteína celular a las 24 h (*L. monocytogenes*) o 48 h (*L. pneumophila*) en comparación con el inóculo de posfagocitosis inicial. La abscisa muestra las concentraciones de los antibióticos de la siguiente manera: (i) paneles superiores, concentraciones de peso (en mg/litro); (ii) paneles inferiores, múltiplos de la MIC tal como se determina en el caldo a pH 7,4. Todos los valores son medias \pm desviaciones estándar (SD) de tres 35 experimentos independientes (cuando no son visibles, las barras SD son más pequeñas que los símbolos).

Fig. 5. Acumulación de CEM-101 frente a comparadores en células THP-1 a 37 °C (todos los fármacos a una concentración extracelular de 10 mg/litro). (A) Cinética de acumulación (AZI); Cc, concentración intracelular; Ce, concentración extracelular); (B) influencia del pH del medio de cultivo en la acumulación (30 min) de CEM-101 (símbolos sólidos y línea continua) y AZI (símbolos abiertos y línea de puntos); (C) influencia de la monensina (50 40 μ M, incubación de 2 h), verapamilo (150 μ M, incubación de 24 h), o gemfibrozil (250 μ M, incubación de 24 h) sobre la acumulación celular de AZI y CEM-101. Todos los valores son medias \pm desviaciones estándar (SD) de tres determinaciones independientes (cuando no son visibles, las barras SD son más pequeñas que los símbolos).

Fig. 6. Actividad intracelular: estudios comparativos con otros agentes antiestafilocócicos. Respuesta comparativa de dosis estática de antibióticos contra *Staphylococcus aureus* intracelular (cepa ATCC 25923) en macrófagos THP-1.

45 Las barras representan las MIC (en mg/l) o la dosis estática extracelular.

Fig. 7. Actividad intracelular de CEM-101 en comparación con AZI, CLR y TEL, expresada como una curva de respuesta a la dosis de Δ log CFU de 0 a 24 horas frente a la dosis logarítmica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 La presente invención está definida en las reivindicaciones adjuntas. Las composiciones, procedimientos y medicamentos se describen en esta solicitud para tratar enfermedades que son causadas al menos en parte por cepas de GDP, donde las composiciones, procedimientos y medicamentos incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de macrólido o cetólido que contiene triazol descrito en esta solicitud. Las composiciones, 55 procedimientos y medicamentos se describen en esta solicitud para tratar enfermedades gástricas resistentes a CLR (CLR-R), donde las composiciones, procedimientos y medicamentos incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de macrólido o cetólido que contiene triazol descrito en esta solicitud.

En otra realización, se describen en esta solicitud compuestos que son activos intracelularmente. También se ha 60 descubierto en esta solicitud que la acumulación intracelular y la actividad intracelular de los macrólidos que contienen triazol no se vieron afectadas por los inhibidores de la proteína resistente a múltiples fármacos (MRP) o Pgp. En consecuencia, se cree que los compuestos descritos en esta solicitud no son sustratos o son sustratos pobres de glicoproteína P (plasma o glicoproteína de permeabilidad, Pgp). Se aprecia que la Pgp es un mecanismo

de flujo de salida que puede conducir a la resistencia de algunos organismos frente a determinados antibióticos, tal como se ha informado para AZI y ERY en macrófagos en los que ambos antibióticos son sustratos de la glicoproteína P. En consecuencia, se ha encontrado sorprendentemente que los compuestos descritos en esta solicitud se acumulan intracelularmente. Además de la acumulación intracelular, se ha descubierto sorprendentemente que los compuestos de macrólidos y cetólidos que contienen triazol descritos en esta solicitud tienen una alta actividad intracelular. También se ha encontrado sorprendente en esta solicitud que los compuestos descritos en esta solicitud tienen una unión a proteínas más baja que la típica para macrólidos a pH más bajo, tal como el pH que se encuentra en infecciones bacterianas, que incluyen, pero sin limitación, abscesos. Se aprecia que la falta de actividad intracelular típicamente observada con agentes antibacterianos, que incluyen otros macrólidos y cetólidos, puede deberse a una alta unión a proteínas, y/o al pH relativamente más bajo de los compartimentos intracelulares, tal como está presente en abscesos.

Sin embargo, incluso cuando no se elimina por flujo de salida activo, la concentración de otros agentes antibacterianos, incluidos otros macrólidos y cetólidos, en los macrófagos puede no ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad debido al bajo pH del compartimento lisosomal. Por ejemplo, el ambiente ácido que prevalece en los fagolisosomas (donde *S. aureus* permanece durante su etapa intracelular) puede perjudicar la actividad de los antibióticos, como el AZI, el CLR y el TEL. Se ha encontrado inesperadamente que los compuestos descritos en esta solicitud conservan su actividad antibacteriana a pH bajo. Se aprecia que la actividad intracelular de los compuestos descritos en esta solicitud puede ser un determinante importante para la erradicación rápida y completa y, probablemente también, para la prevención de la resistencia en el organismo diana.

La falta de una terapia antimicrobiana efectiva da como resultado la supervivencia intracelular de las bacterias, que sigue siendo una causa importante de propagación bacteriana, fallas terapéuticas potencialmente mortales y el establecimiento de infecciones recidivantes crónicas. Estas situaciones se observan durante el curso de las infecciones causadas por muchos organismos que causan enfermedades gastrointestinales, incluyendo *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y *Shigella*.

Aunque se ha informado que la acumulación intracelular de un antibiótico es indicativa de actividad eficiente contra bacterias, la evaluación farmacodinámica de una gran serie de antibióticos de uso común ha revelado que otros parámetros tales como la biodisponibilidad intracelular y la modulación de la actividad en el compartimento infectado también son importantes. Las observaciones descritas en esta solicitud confirman y amplían las observaciones previas realizadas con macrólidos en este contexto debido al sorprendente comportamiento diferencial mostrado por los macrólidos que contienen triazol descritos en esta solicitud, en comparación con macrólidos y cetólidos conocidos, tales como TEL, AZI y CLR.

Sorprendentemente, se descubrió que los macrólidos que contienen triazol se acumulan en un grado considerablemente mayor que los comparadores, incluyendo AZI, y expresa consistentemente mayor potencia (valores reducidos de E_{50} y C_s) mientras que muestra la máxima eficacia y (E_{max}) similar a los comparadores. Sin estar ligado a teoría alguna, se cree que esto indica que las mejoras resultantes de las modificaciones estructurales introducidas en CEM-101 se relacionan con la modulación de las propiedades farmacocinéticas y la actividad intrínseca (incluida su reducida susceptibilidad a las condiciones fisicoquímicas que prevalecen en el compartimento infectado) en lugar de a un cambio en su modo de acción. Por tanto, los macrólidos que contienen triazol muestran el carácter esencialmente bacteriostático de los macrólidos, pero lo expresan mejor en el medio intracelular y en concentraciones extracelulares considerablemente más bajas que los comparadores.

Sin estar ligado a teoría alguna, se cree que la acumulación celular de macrólidos que contienen triazol, tales como CEM-101, resulta del mecanismo general de atrapamiento de protones de bases orgánicas débiles previstas para todos los macrólidos ya que la acumulación está casi completamente suprimida, en paralelo con AZI, por exposición a pH ácido o al protón ionóforo monensina. Basándose en el modelo general de difusión/segregación de bases débiles en compartimentos ácidos unidos a la membrana, la acumulación está determinada por el número de grupos ionizables y las relaciones entre los coeficientes de permeabilidad de la membrana de las formas ionizadas y unificadas del fármaco. Mientras que CEM-101 tiene dos funciones ionizables, se calcula que el pKa del aminofeniltriazol es menor que 4, lo que sugiere que la molécula es en gran parte monocatenaria (similar a CLR y TEL) a pH neutro e incluso a pH lisosomal (~ 5). En cambio, AZI tiene dos funciones ionizables con pK_{as} > 6 y por lo tanto es dicatiónica intracelularmente. Sin embargo, CEM-101 posee un sustituyente fluoro en la posición 2 que debería hacerlo más lipófilo que CLR o TEL. Sin estar ligado a teoría alguna, se cree que la relación de las constantes de permeabilidad de las formas ionizadas y unificadas de CEM-101 en comparación con LR o TEL puede ser tan importante como el número de funciones ionizables para determinar el nivel de acumulación celular de bases orgánicas débiles. Sin estar ligado a teoría alguna, se cree que la mayor acumulación celular de CEM-101 puede deberse parcialmente a su falta de susceptibilidad al flujo de salida mediado por Pgp (que se expresa mediante macrófagos THP-1 en las condiciones de cultivo de los investigadores) a diferencia de AZI.

Se ha observado que muchos macrólidos conocidos tienen un gran volumen de distribución, que se cree está

relacionado con su capacidad para acumularse dentro de células eucariotas por difusión/segregación en compartimentos ácidos, concretamente lisosomas y vacuolas relacionadas. Como consecuencia, los macrólidos conocidos se habían considerado candidatos para el tratamiento de infecciones localizadas en estos compartimentos. Por tanto, se puede suponer que los macrólidos son adecuados para tratar infecciones causadas por patógenos intracelulares típicos. Sin embargo, las comparaciones cuantitativas directas entre las actividades intracelulares y extracelulares usando patógenos intracelulares facultativos, como *S. aureus* o *L. monocytogenes*, sugieren que los macrólidos conocidos expresan solo una mínima fracción de su potencial antibacteriano intracelularmente, especialmente teniendo en cuenta su gran acumulación intracelular. Se cree que este potencial antibacteriano minimizado contra los organismos que se replican en los fagolisosomas y las vacuolas relacionadas está relacionado con el pH ácido que se sabe que reduce la actividad de los macrólidos conocidos. Otro factor es que algunos organismos, como *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y *Shigella*, pueden replicarse en realidad en otros compartimentos subcelulares. Además, determinados macrólidos, como AZI, están sujetos al flujo de salida de los macrófagos, lo que contribuye además a una actividad intracelular subóptima.

A diferencia, la acumulación celular y la actividad intracelular de los compuestos que contienen triazol descritos en esta solicitud, usando modelos que se han desarrollado para el estudio de la farmacodinámica intracelular de antibióticos, se mejora sustancialmente frente a los macrólidos conocidos, que incluyen los cetólidos. Por tanto, los compuestos descritos en esta solicitud mantienen la eficacia máxima de sus MIC, y muestran una mayor potencia contra formas intracelulares de, por ejemplo, contra organismos causantes de enfermedades gastrointestinales, que incluyen *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y *Shigella* en comparación con TEL, AZI y CLR. Sin estar ligado a teoría alguna, se cree que esta potencia intracelular mejorada de los compuestos que contienen triazol descritos en esta solicitud resulta de la combinación de la actividad intrínseca más alta contra los organismos causantes de enfermedades gastrointestinales, incluyendo *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y *Shigella* junto con la actividad conservada a pH bajo, y la capacidad de distribuir a una amplia diversidad de compartimentos intracelulares.

En otra realización, los compuestos de macrólido y cetólido que contienen triazol tienen actividad intracelular, tal como actividad intracelular contra organismos causantes de enfermedades gastrointestinales, que incluyen *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y *Shigella*. Se aprecia que las pruebas de susceptibilidad habituales generalmente se determinan solo contra bacterias extracelulares y, por lo tanto, pueden inducir a error en su predicción de eficacia contra organismos intracelulares. Los compuestos, composiciones, procedimientos y usos se describen en esta solicitud para tratar una enfermedad gastrointestinal causada al menos en parte por una *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y/o *Shigella* intracelular. Se aprecia además que *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y/o *Shigella* pueden incluir cepas virulentas y, por tanto, el tratamiento con agentes bacteriostáticos puede ser inefectivo. Por ejemplo, la reaparición puede ser un problema cuando se tratan dichas cepas. Se ha descubierto inesperadamente que los compuestos descritos en esta solicitud son también bactericidas y, por lo tanto, útiles en el tratamiento de enfermedades causadas por dichas cepas de *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y/o *Shigella*.

En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para mostrar actividad antibacteriana intracelular.

En otra realización, se describen en esta solicitud los compuestos que son bactericidas. En otra realización, los compuestos, procedimientos y medicamentos descritos en esta solicitud incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en esta solicitud, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para mostrar actividad bactericida, que incluye actividad bactericida *in vivo*. Se ha informado que los macrólidos son generalmente bacteriostáticos. Los compuestos bacteriostáticos no matan a las bacterias, sino que por el contrario inhiben, por ejemplo, el crecimiento y la reproducción de las bacterias sin matarlas; la muerte se logra mediante agentes bactericidas. Se entiende que los agentes bacteriostáticos deben trabajar con el sistema inmune para eliminar los microorganismos del cuerpo. Los antibióticos bacteriostáticos pueden limitar el crecimiento de bacterias a través de una serie de mecanismos, tal como al interferir con la producción de proteína bacteriana, la replicación del ADN u otros aspectos del metabolismo celular bacteriano. A diferencia, los antibióticos bactericidas matan las bacterias; los antibióticos bacteriostáticos solo ralentizan su crecimiento o reproducción. La penicilina es un bactericida, al igual que las cefalosporinas, todas ellas pertenecientes al grupo de antibióticos β -lactámicos. Actúan de forma bactericida al alterar el precursor de la pared celular que conduce a la lisis. Además, los antibióticos aminoglicosídicos generalmente se consideran bactericidas, aunque pueden ser bacteriostáticos con algunos organismos. Actúan uniéndose de forma irreversible a la subunidad ribosómica 30s, lo que reduce la fidelidad de la traducción que conduce a una síntesis proteica inexacta. Además, inhiben la síntesis de proteínas debido a la separación prematura del complejo entre el ARNm y las proteínas ribosómicas. El resultado final es la muerte celular bacteriana. Otros antibióticos bactericidas incluyen fluoroquinolonas, nitrofuranos, vancomicina, monobactams, cotrimoxazol y metronidazol.

Los compuestos, composiciones, y medicamentos de la invención descritos en esta solicitud incluyen una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos descritos en esta solicitud, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para mostrar actividad bactericida contra uno o más organismos causantes de

enfermedades gastrointestinales, incluyendo *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y *Shigella*. Sin estar ligado a teoría alguna, se cree que en esta solicitud el tratamiento de dichas enfermedades usando agentes bacteriostáticos puede ser infructuoso en dos aspectos. Primero, simplemente detener la progresión de la enfermedad con un agente bacteriostático puede ser insuficiente porque el sistema inmune puede no intervenir para ayudar a curar la enfermedad a un nivel necesario. Por ejemplo, algunos organismos bacterianos no son eliminados por el sistema inmune porque residen en compartimentos intracelulares. Por tanto, una vez que el tratamiento ha terminado, puede producirse una reaparición rápida de la enfermedad. En segundo lugar, debido a que es probable que se elimine una parte de la población bacteriana, la población restante puede seleccionarse para el desarrollo de resistencia. Se cree en esta solicitud que un agente activo intracelularmente, y/o un agente bactericida y activo intracelularmente, será efectivo en el tratamiento de dichas enfermedades. En una realización ilustrativa, los compuestos descritos en esta solicitud alcanzan una concentración intracelular de 20x la MIC de las bacterias diana. Se ha informado que la mayoría, si no todos, los antibióticos macrólidos, aunque son bactericidas *in vitro*, son solo bacteriostáticos *in vivo*. Por ejemplo, como se describe en esta solicitud a continuación, cuando se extendió el tiempo entre la última dosis del compuesto, los niveles de reducción de la carga biológica permanecieron iguales para los compuestos que contienen triazol descritos en esta solicitud, lo que indica una respuesta bactericida. A diferencia, los grupos de dosis TEL y CLR demostraron aumentos de carga biológica cuando se extendió el intervalo de tiempo. Por tanto, estos dos últimos agentes macrólidos/cetólidos demostraron una respuesta bacteriostática más clásica.

En otra realización, los compuestos de Fórmula (I) se describen en esta solicitud donde W es flúor. En otra realización, los compuestos de Fórmula (I) se describen en esta solicitud donde A y B se toman juntos para formar butileno. En otra realización, los compuestos de Fórmula (I) se describen en esta solicitud donde A y B se toman juntos para formar pentileno. En otra realización, los compuestos de Fórmula (I) se describen en esta solicitud donde A y B se toman juntos para formar butilenos y C es 2-piridinilo o aminofenilo, tal como 3-aminofenilo. En otra realización, los compuestos de Fórmula (I) se describen en esta solicitud donde A y B se toman juntos para formar propilenos, butilenos o pentilenos; y C es aminofenilo, tal como 3-aminofenilo. En otra realización, los compuestos de Fórmula (I) se describen en esta solicitud donde A y B se toman juntos para formar pentileno y C es 3-piridinilo o benzotriazol. En otra realización, los compuestos de Fórmula (I) se describen en esta solicitud donde R¹⁰ es hidrógeno. En otra realización, C es fenilo opcionalmente sustituido, tal como fenilo, halofenilo, haloalquilfenilo, aminofenilo y similares, piridinilo opcionalmente sustituido, tal como 2-piridinilo y 3-piridinilo, benzotriazol opcionalmente sustituido, y similares.

En otra realización, se describen los compuestos descritos en las realizaciones anteriores donde C es 3-aminofenilo o 3-piridinilo. En otra realización, los compuestos descritos en las realizaciones anteriores donde R¹⁰ es hidrógeno. En otra realización, los compuestos descritos en las realizaciones anteriores donde A y B se toman juntas para formar butileno o pentileno, y X e Y se toman junto con el carbono unido para formar un grupo C (O) y W es F.

En otra realización, se describe en esta solicitud una composición antibacteriana, donde la composición incluye una cantidad efectiva de uno o más compuestos descritos en esta solicitud, y un vehículo, excipiente, o diluyente farmacéuticamente aceptable para los mismos, o una combinación de los mismos.

Tal como se usa en esta solicitud, el término "composición" se refiere generalmente a cualquier producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas. De forma ilustrativa, las composiciones pueden incluir uno o más vehículos, diluyentes, y/o excipientes. Los compuestos descritos en esta solicitud se pueden formular en una cantidad terapéuticamente efectiva en formas de dosificación convencionales para los procedimientos descritos en esta solicitud, que incluyen uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes para los mismos. Dichas composiciones de formulación se pueden administrar mediante una amplia diversidad de vías convencionales para los procedimientos descritos en esta solicitud en una amplia diversidad de formatos de dosificación, utilizando productos reconocidos en la técnica. Véase en general, Remington's Pharmaceutical Sciences, (16^a ed. 1980). Debe entenderse que las composiciones descritas en esta solicitud pueden prepararse a partir de compuestos aislados descritos en esta solicitud o a partir de sales, soluciones, hidratos, solvatos y otras formas de los compuestos descritos en esta solicitud. También debe entenderse que las composiciones se pueden preparar a partir de diversas formas amorfas, no amorfas, parcialmente cristalinas, cristalinas y/u otras formas morfológicas de los compuestos descritos en esta solicitud.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" tal como se usa en esta solicitud, se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano que está siendo buscado por un investigador, veterinario, médico u otro clínico, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o el trastorno que se está tratando. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva es aquella que puede tratar o aliviar la enfermedad o los síntomas de la enfermedad con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, debe entenderse que el uso diario total de los compuestos y composiciones descritos en esta solicitud puede ser decidido por el médico responsable dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente efectiva específica para

cualquier paciente en particular dependerá de una diversidad de factores, que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente: el tiempo de administración, la vía de administración, y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del 5 tratamiento; los fármacos usados en combinación o de forma coincidente con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

En una realización, los compuestos descritos en esta solicitud se administran a un ser humano por vía oral a una dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg/kg o 10 aproximadamente 4 a aproximadamente 6 mg/kg de peso corporal del paciente. En otra realización, la dosis humana adulta diaria es de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 mg, que puede administrarse qd, bid, tid y similares. En otra realización, la dosis humana adulta diaria es de aproximadamente 400 a aproximadamente 600 mg, que puede administrarse qd, bid, tid y similares. Dichas dosis pueden administrarse una, dos o tres veces al día. Las dosificaciones unitarias orales ilustrativas son 50, 100, 200 y 400 mg (unitarias o divididas). Sin estar ligado a 15 teoría alguna, se cree que dichas dosificaciones ilustrativas son suficientes para alcanzar niveles en plasma de aproximadamente 1 µg/ml, que pueden ser suficientes para observar la actividad bactericida de los compuestos descritos en esta solicitud, tales como *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y *Shigella*. Se aprecia que tal como se describe en esta solicitud, los compuestos descritos en esta solicitud, que incluyen CEM-101, alcanzan una alta concentración en tejidos, tales como tejidos de pulmón. Sin estar ligado a teoría alguna, se cree en esta solicitud que 20 los compuestos descritos en esta solicitud, que incluyen CEM-101, pueden alcanzar niveles tisulares que son al menos aproximadamente 10 veces la MIC para cepas, incluyendo cepas resistentes a macrólidos, tales como, pero sin limitación, *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella* y *Shigella*.

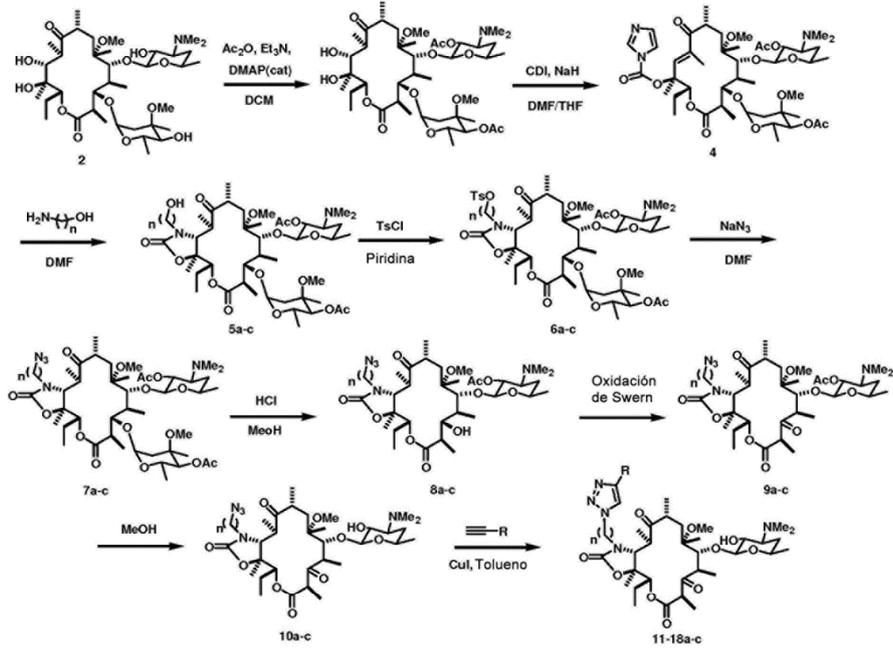
Los compuestos descritos en esta solicitud se pueden preparar tal como se describe en esta solicitud, o de acuerdo 25 con la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2006/0100164 y en la Publicación Internacional PCT N.º WO 2009/055557. Brevemente, la síntesis de cetólidos que contienen triazol comienza con la preparación en dos etapas conocida del compuesto intermedio 4 de 12-acilimidazol (Esquema I) a partir de claritromicina (2). El compuesto intermedio 4 se convierte en los carbamatos 11,12-cíclicos 5a-c mediante la reacción con los correspondientes aminoalcoholes unidos a 3, 4 o 5 carbonos. El tratamiento de 5a-c con cloruro de tosilo 30 proporciona tosيلات 6a-c. El desplazamiento del grupo tosilo con NaN₃ da los correspondientes compuestos de azido 7a-c. La escisión del azúcar cladinosa de 7a-c a 8a-8c se logra por tratamiento con HCl en MeOH. La oxidación de Swern del grupo 3-hidroxi de 8a-c da los correspondientes cetólidos protegidos 9a-c que posteriormente se desprotegen con metanol para proporcionar los azidocetólidos 10a-c requeridos, respectivamente. Estos compuestos azido se hicieron reaccionar con alquinos terminalmente sustituidos en presencia de yoduro de 35 cobre en tolueno a 60 °C para proporcionar regio-selectivamente los correspondientes 4-sustituidos-[1,2,3]-triazoles 11a-18a, 11b-18b y 11c-18c.

La azida de los compuestos intermedios 10a-c se convierte en los 4-sustituidos-[1,2,3]-triazoles mediante una 40 reacción de cicloadición con acetilenos sustituidos. Los anillos de triazol pueden formarse mediante una reacción de cicloadición de Huisgen 1+3 entre una azida y un alquino, dando como resultado una mezcla de regioisómeros 1,4 y 1,5 como se representa en la Vía A del Esquema II. Como alternativa, el procedimiento de Rostovtsev y col.,⁸ puede seguirse usando la adición de un catalizador de CuI a la reacción para producir de forma selectiva o exclusiva el regioisómero 1,4 como se representa en la Vía B del Esquema II.

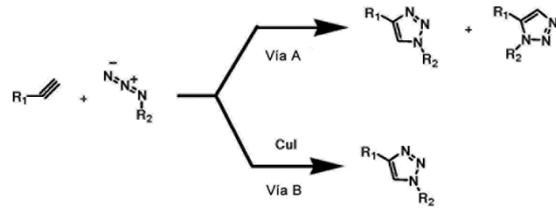
45 La cadena lateral del anillo de triazol también se incorpora en el sistema de anillo de claritromicina. En una realización, se elige una cadena lateral de alquilo de butilo. Se aprecia que muchos análogos de cadena lateral de butilo en la serie de cetólidos tienen una actividad antibacteriana mejorada basada en los resultados de MIC *in vitro*. El compuesto Intermedio 7b se convierte directamente en el 4-sustituido-[1,2,3]-triazol mediante ciclación catalizada por cobre con acetilenos sustituidos terminalmente, como se muestra en el Esquema III. Los grupos protectores de 50 acetato de 19a-e se eliminan con LiOH en metanol para proporcionar los correspondientes 4-sustituidos-[1,2,3]-triazoles 20a-e.

La sustitución del hidrógeno de 2 posiciones por un flúor se logra mediante fluoración electrofílica de 9b (Esquema IV) usando Selectfluor®. El grupo azido del compuesto intermedio 22 se convierte en una serie de 4-sustituidos- 55 [1,2,3]-triazoles 23a-b mediante las condiciones convencionales.

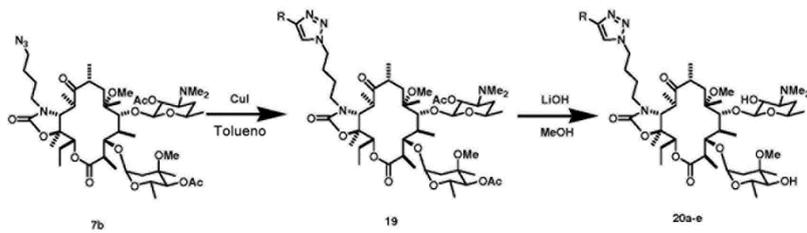
Esquema I



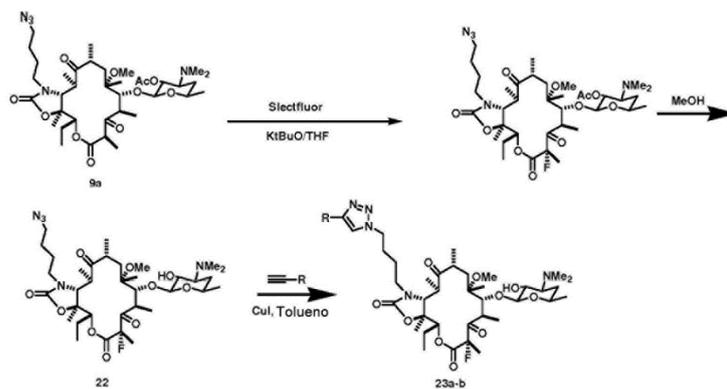
Esquema II



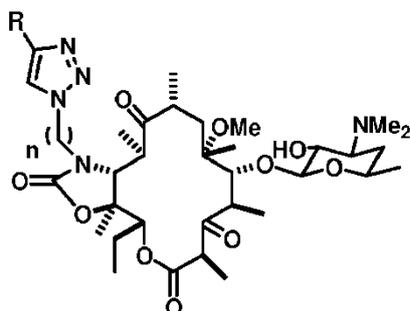
Esquema III



Esquema IV



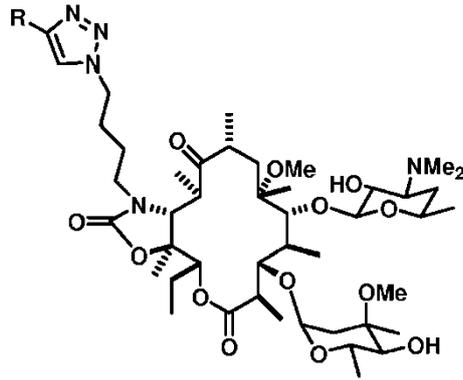
Se describen los siguientes compuestos:



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

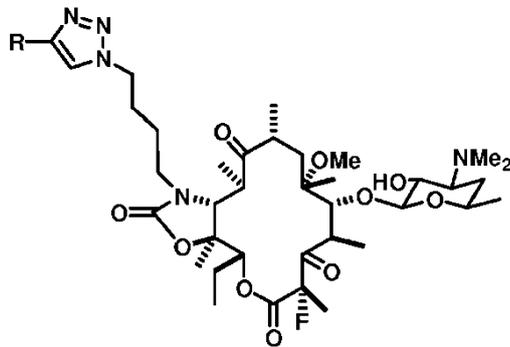
^aComité Nacional de normas de laboratorio clínico. Procedimientos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución para bacterias que crecen aeróbicamente, 6^a ed.; Norma aprobada: Documento NCCLS M7-A6, 2003.

También se describen los siguientes compuestos:

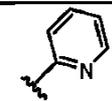
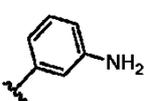


Entrada	R	S. aureus		S. pneumoniae			H. influenzae
		25923 Ery-S	RN220	49619 Ery-S	163 Ery-R (MefA)	303 Ery-R (ermB)	
TEL		≤0,25	2	≤0,125	≤0,125	≤0,125	4
20a		0,25	8	≤0,0625	0,125	2	NT
20b		0,25	8	≤0,0625	≤0,06	1	NT
20c		1	8	≤0,0625	0,5	2	NT
20d		1	8	≤0,0625	0,5	2	NT
20e		≤0,25	8	≤0,0625	0,5	2	NT

También se describen los siguientes compuestos:



Entrada	R	S. aureus		S. pneumoniae			H. influenzae
		29213 Ery-S	96:11480 Ery-R (MLSb)	49619 Ery-S	163 Ery-R (MefA)	303 Ery-R (ermB)	
TEL		≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	4

AZI		ND	≤0,125	>64	≤0,125	>64	>64
23a		≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	2
23b (CEM-101)		≤0,06	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	2

En cada una de las realizaciones anteriores, el panel de selección primario consistió en *Staph. aureus* relevante *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* (incluidas las cepas resistentes a azitromicina y telitromicina). Las MIC contra todos los patógenos se determinaron usando el procedimiento de microdilución en caldo según las directrices de NCCLS. Se encontró que los compuestos descritos en esta solicitud, tales como CEM-101 eran altamente potentes con MIC contra *S. pneumoniae* (3773) de $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$ y *S. pyogenes* (1850) de $0,5 \mu\text{g/ml}$, en comparación con 1 y $8 \mu\text{g/ml}$, respectivamente para telitromicina. Se encontró que CEM-103 (20c), un análogo de CEM-101 que contiene la 3-O-cladinoso, es menos activo. Triazol sustituido no heteroaromático que contiene cetólidos eran menos activo.

10 Los cetólidos se probaron contra cepas sensibles a la eritromicina (Ery-S) y resistentes a la eritromicina (Ery-R) de *S. aureus* (29213 (Ery-S) y 96: 11480 (Ery-R)), *S. pneumoniae* (49619 (Ery-S) y 163 y 303 (Ery-R)) y *H. influenzae* (49247 (Ery-S)) (Tablas 1-3). El procedimiento de microdilución en caldo se usó para determinar las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (MIC) contra todos los patógenos según el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI).

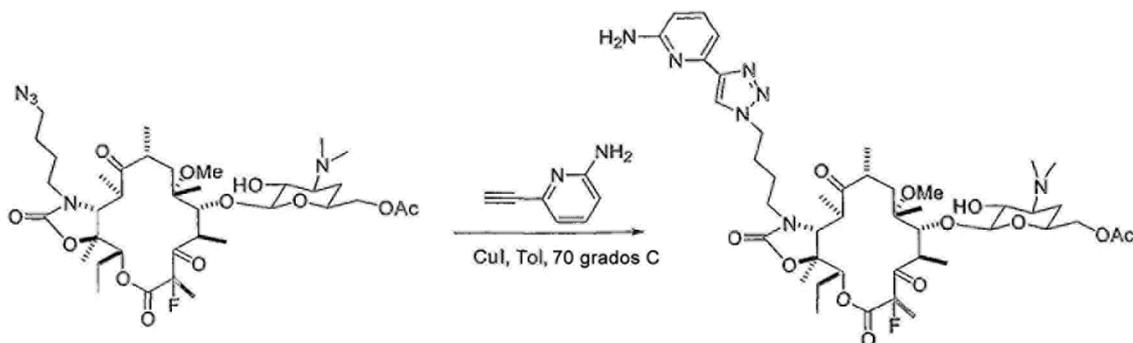
15 La longitud de cadena de la cadena lateral de alquilo tenía una actividad afectada (Tabla 1). Por ejemplo, el triazol sustituido con fenilo unido a 3 carbonos 11a era menos activo contra Ery-S y Ery-R *S. aureus* y era inactivo contra Ery-R *S. pneumoniae* 303 (ermB) a las concentraciones probadas,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

El triazol 14b sustituido con 2-piridilo unido a 4 carbonos y el triazol 16b sustituido con 3-amino-fenilo poseían la mayor potencia contra *S. pneumoniae* 303, ambos con valores MIC ($\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$) comparables a telitromicina. El
25 cetólido que contiene el triazol sustituido con 3-piridilo unido a 4 carbonos 15b era menos activo contra esta cepa (MIC de $64 \mu\text{g/ml}$). Dentro de esta serie, se mejoró la actividad antibacteriana prolongando el enlazador de carbono a 5 átomos, por ejemplo, la MIC contra *S. pneumoniae* 303 para el compuesto 15c mejoró de 64 a $4 \mu\text{g/ml}$. También se observó un efecto similar para el benzo-triazol que contiene el cetólido 18c contra *S. aureus*, pero el 18c todavía estaba inactivo contra *S. pneumoniae* 303. Se aprecia que un equilibrio entre la longitud del enlazador y la
30 naturaleza de la sustitución aromática del triazol puede afectar la actividad global contra *S. pneumoniae* resistente a macrólidos y *S. aureus*.

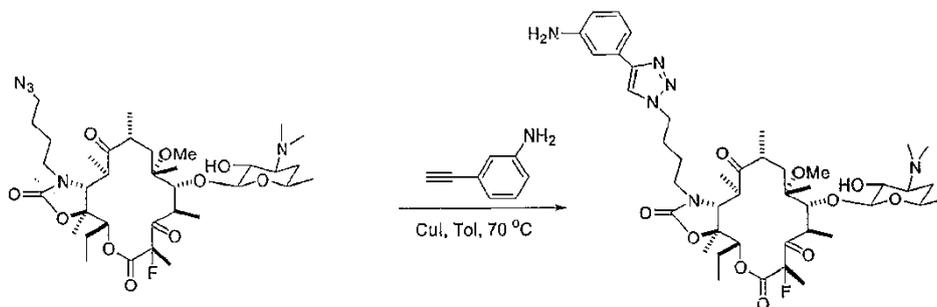
También se observó una correlación entre la longitud y la actividad del enlazador para *H. influenzae* (49247) donde la serie de cetólidos más potente tenía el triazol sustituido unido a través de una cadena de 4 carbonos (11b-14b,
35 16b, 17b) o 5 carbonos (15c, 18c). Es importante destacar que, la serie aromática más potente contra *H. influenzae* fue el 3-amino-fenilo con un enlazador de 3, 4 o 5 carbonos (16a, 16b, 16c) que tiene MIC de 16, 2 y $8 \mu\text{g/ml}$, respectivamente,

Los macrólidos que contienen una cladinoso en la posición 3 eran todos altamente activos contra Ery-S *S. pneumoniae* (49619) (Tabla 2). Sin embargo, estos análogos fueron menos potentes que la telitromicina contra las cepas Ery-R. Las MIC fueron significativamente más altas para los análogos que contienen cladinoso con
40 sustituyentes 2-piridilo, 2-aminofenilo o 2,6-diclorofeniltriazol que para los correspondientes cetólidos (20a, 20c y 20d frente a 14b, 16b y 17b). A la inversa, se restableció la actividad antibacteriana para los análogos de cetólido 15b (3-piridilo) y 18b (benzo-triazol) reemplazando el ceto con el grupo cladinoso en los análogos 20b (3-piridilo) y 20e (benzo-triazol). Las MIC mejoraron de $64 \mu\text{g/ml}$ para 15b y 18b a 1 y $2 \mu\text{g/ml}$ para 20b y 20e, respectivamente.
45 También se observó una tendencia de actividad similar para Ery-R *S. pneumoniae* 163 (MefA).

EJEMPLOS COMPUESTOS

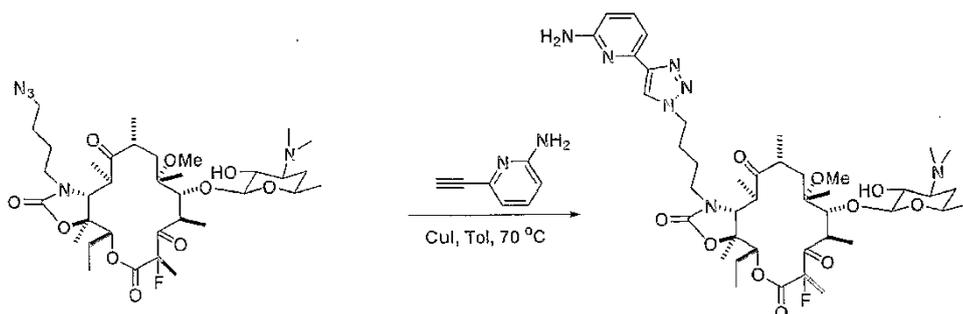


Una mezcla de 11-N-(4-azido-butyl)-6-O-metil-5-(3-dimetilamina-4-deoxi-6-O-acetil-glu-copiranosil)-2-fluoro-3-oxo-eritronolida A, 11,12-carbamato (15 mg, 0,019 mmol), 6-etinil-piridin-2-ilamina (4,7 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 70 °C. Después de 16 h, la mezcla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

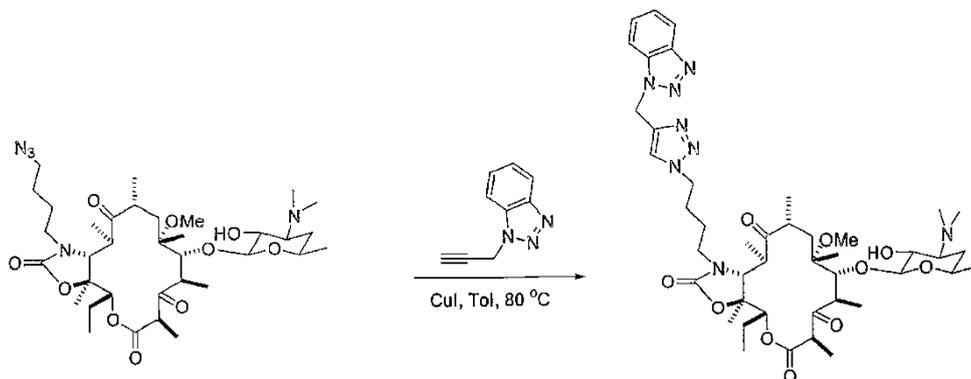


10

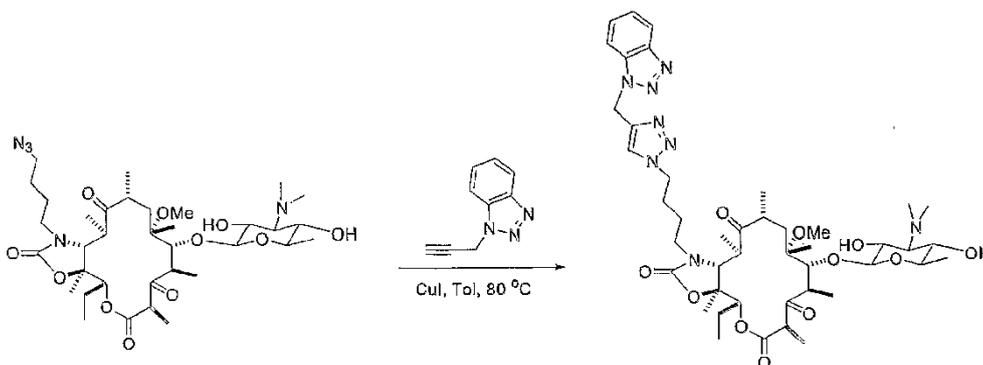
11-N-4-(3-aminofenil)-[1,2,3]triazol-1-il-butyl]-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronolida A, -11,12-carbamato cíclico (CEM-101). Una mezcla de 11-N-(4-azido-butyl)-6-O-metil-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronolida A, 11,12-carbamato (17 mg, 0,023 mmol), 3-etinil-fenilamina (5,4 mg, 0,046 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 70 °C. Después de 16 h, la mezcla se concentró y se sometió directamente a cromatografía en gel de sílice (9:1, cloroformo: metanol más 1 % de hidróxido de amonio) para dar 17 mg del compuesto deseado, MS C₄₃H₆₅FN₆O₁₀ calculado M⁺=844,47, encontrado: M+H⁺=845,5



20 11-N-{4-[4-(6-amino-piridin-2-il)-[1,2,3]triazol-1-il]-butil}-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronolida A, -11,12-carbamato cíclico. Una mezcla de 11-N-(4-azido-butyl)-6-O-metil-5-desosaminil-3-oxo-2-fluoro-eritronolida A, 11,12-carbamato (15 mg, 0,02 mmol), 6-etinil-piridin-2-ilamina (4,7 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 70 °C. Después de 16 h, la mezcla se concentró y se sometió directamente a cromatografía en gel de sílice (9:1, cloroformo: metanol más 1 % de hidróxido de amonio) para dar 14 mg del compuesto deseado OP1357. MS: 25 C₄₂H₆₄FN₇O₁₀ calculado M⁺=845,5, descubierto: M+H⁺=846,5.



11-N-[4-(4-benzotriazol-1-ylmetil-[1,2,3]triazol-1-yl)-butil]-6-O-metil-5-O-dasosaminil-3-oxo-eritronolida A, 11,12-carbamato. Una mezcla de 11-N-(4-azido-butil)-6-O-metil-5-O-dasosaminil-3-oxo-eritronolida A, 11,12-carbamato (3 mg, 0,0039 mmol), 1-prop-2-ynil-1H-benzotriazol (3 mg, 0,4 mmol), CuI (1 mg, 0,005 mmol) y tolueno (0,2 ml) se calentó a 80 °C. Después de 16 h, la mezcla se concentró y se sometió directamente a cromatografía en gel de sílice (9:1, cloroformo: metanol más 1 % de hidróxido de amonio) para dar 3 mg del compuesto deseado. MS: C₄₄H₆₆N₈O₁₀ calculado M⁺ =866,5, descubierto: M+H⁺867,5.



10

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

EJEMPLOS DE PROCEDIMIENTOS

20

SAL (20 cepas, que representan 11 serotipos) y *Shigella* (40, cuatro especies) se probaron mediante procedimientos de microdilución en caldo CLSI con puntos de corte M100-S18 aplicados. *C. jejuni* (20) y *H. pylori* (23) se probaron mediante el procedimiento de dilución en agar Mueller-Hinton, complementado con sangre de oveja, y los resultados de *C. jejuni* se confirmaron mediante Etest (AB BIODISK, Solna, Suecia). Se probaron los agentes de comparación clave: AZI, CLR, TEL, levofloxacina (LEV), amoxicilina/clavulanato (A/C) y trimetoprima/sulfametoxazol (TMP/SMX).

CEM-101 demostró actividad contra GDP *Salmonella* de origen alimentario (MIC₅₀, 4 µg/ml), *Shigella* (MIC₅₀, 8 µg/ml) y *C. jejuni* (MIC₅₀, 1 µg/ml). Esto fue comparable o superior (intervalos de MIC₅₀) a: TEL (8-16 µg/ml), ERY (2->4 µg/ml), AZI (4 µg/ml) y A/C (2-8 µg/ml). Los resultados de CLR fueron diversos (intervalo de MIC₅₀ 0,015 >16 µg/ml) así como TMP/SMX; LEV fue el más activo (MIC₅₀, < 0,12 µg/ml). Los resultados MIC HP CEM-101 se agruparon de 0,03-0,25 µg/ml y a 2 o 4 µg/ml; el último corresponde a cepas CLA-R (>16 µg/ml).

30 Comparador de CEM-101 (fármaco)a

	CEM-101			Comparador (fármaco) ^(a)		
Organismo (n.º)	50 %	90%	Intervalo	50 %	90%	Intervalo
<i>C. jejuni</i> (20)	1	4	1-8	2	4	1-8 (CLA)

<i>H. pylori</i> (23)	0,06	0,25	0,03-4	0,03	0,12	<0,015->16 (CLA)
<i>Salmonella spp.</i> (20)	4	>16	1->16	4	8	2-8 (AZ)
<i>Shigella spp.</i> (40)	8	16	1->16	4	8	1->16 (AZ)
(a) Fármaco comparador entre paréntesis (AZI [AZ] o CLR [CLA]).						

Algunos subconjuntos de organismos especiales se aprobaron específicamente incluyendo *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* y *Enterobacteriaceae* (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*). Se aplicaron procedimientos de calidad de referencia, incluidos los del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) y el procedimiento alternativo Etest 5 (AB Biodisk, Solna, Suecia). En los últimos años, los compuestos de la clase MLSB-cetólida se han usado para una serie de infecciones gastrointestinales (IG) y las resistencias a varios agentes de tratamiento potenciales requieren una búsqueda de opciones terapéuticas novedosas. Los compuestos descritos en esta solicitud se exploraron *in vitro* para la posible aplicación de estas indicaciones IG.

10 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS. Procedimientos de pruebas de susceptibilidad: Para *C.jejuni*, *N.gonorrhoeae* y *H. pylori*, los procedimientos de dilución en agar CLSI M7-A7(2006) y M100-S18 (2008) se usaron de la siguiente manera: Agar Mueller-Hinton (MH) con 5 % sangre de ovejas para *H. pylori* y *Campylobacter spp.* 10⁵ CFU/inóculo local. Los puntos finales se leen a las 24 (*C. jejuni*) o a las 72 horas (*H. pylori*). Entornos de incubación aplicados adecuados para especies (CO2 añadido o microaerófilo).

15 También se usaron paneles de ensayo de 96 pocillos congelados, producidos por JMI Laboratories y consistieron en caldo MH ajustado a cationes para probar las Enterobacteriaceae. Se probaron los agentes de comparación

20 La Tabla 1 resume la actividad de CEM-101 contra *H. pylori*. Se compararon ocho cepas al probar cinco fármacos, incluido el CEM-101. Los resultados mostraron que CEM-101 fue ligeramente menos activo que CLR o aminopenicilinas (MIC50, < 0,015 µg/ml); sin embargo, las mediciones de actividad del comparador fueron resultados de Etest, no el procedimiento de dilución en agar de referencia. Los datos entre procedimientos para CLR (datos no mostrados) mostraron una tendencia hacia resultados de Etest más bajos (cuatro veces). Las MIC CEM-101 para las cepas resistentes a CLR (> 16 µg/ml) fueron solo 2 o 4 µg/ml.

25 Tabla 1. Actividad comparativa de CEM-101 probada contra 103 aislados de patógenos productores de enteritis que muestran % MIC (µg/ml) por categoría^(a).

Organismo (prueba n. ^o),	50 %	90%	Intervalo	susceptible/resistente
<i>Salmonella spp.</i> (20) ^(b)				
CEM-101	4	>16	1->16	-/-
TEL	8	>16	0,015->16	-/-
Eritromicina	>4	>4	0,25->4	-/-
CLR	0,015	>16	0,015->16	-/-
AZI	4	8	2-8	-/-
Clindamicina	>4	>4	0,25->4	-/-
Quinupristina-dalfopristina	>4	>4	0,25->4	-/-
Amoxicilina-clavulanato	2	8	0,5->8	95,0/0,0
Cefdinir	0,25	0,5	≤0,12-0,5	100,00/0,0
Levofloxacin	≤0,12	1	≤0,12-4	95,0/0,0
Trim-sulfa ^(g)	≤0,25	≤0,25	≤0,25	100,00/0,0
<i>Shigella spp.</i> (40) ^(c)				
CEM-101	8	16	1->16	-/-
TEL	16	16	2->16	-/-
Eritromicina	>4	>4	0,25->4	-/-
CLR	>16	>16	0,015->16	-/-
AZI	4	8	1->16	-/-
Clindamicina	>4	>4	0,25->4	-/-
Quinupristina-dalfopristina	>4	>4	>4	-/-
Amoxicilina-clavulanato	8	>8	2->8	72,5/0,0
Cefdinir	0,25	0,25	≤0,12-0,5	100,0/0,0
Levofloxacin	≤0,12	≤0,12	≤0,12-0,25	100,0/0,0
Trim-sulfa ^(g)	>4	>4	0,25->4	37,5/62,5

<i>C. jejuni</i> (20)				
CEM-101 ^(d)	1	4	1-8	-/-
CLR ^(e)	2	4	1-8	-/-
Ciprofloxacina ^(e)	0,25	>32	0,03->32	-/-
Eritromicina ^(e)	2	4	0,5-4	-/-
Tetraciclina ^(e)	64	>256	0,06-256	-/-
<i>H. pylori</i> (23/8) ^(f)				
CEM-101	0,06	0,25	0,03-4	-/-
CLR	0,03	0,12	0,015->16	91,3/8,7
Ampicilina	≤0,015	-	≤0,015-0,03	-/-
Metronidazol	0,5	-	0,06-64	-/-
Tetraciclina	0,06	-	≤0,015-0,25	-/-
a. Criterios publicados por el CLSI [2008]. -= no se han establecido criterios de interpretación. b. Incluye: <i>Salmonella dublin</i> (1 cepa), <i>S. enteritidis</i> (4 cepas), <i>S. hadar</i> (1 cepa), <i>S. heidelberg</i> (1 cepa), <i>S. infantis</i> (1 cepa), <i>S. paratyphi</i> (3 cepas), <i>S. typhi</i> (3 cepas), <i>S. typhimurium</i> (1 cepa), <i>Salmonella</i> Grupo B (2 cepas), <i>Salmonella</i> Grupo C (1 cepa) y <i>Salmonella</i> Grupo D (2 cepas). c. Incluye: <i>Shigella boydii</i> (6 cepas), <i>dysenteriae</i> (3 cepas), <i>S. flexneri</i> (14 cepas) y <i>S. sonnei</i> (17 cepas). d. Probado usando el procedimiento de dilución en agar recomendado por el CLSI (M7-A7). e. Probado por Etest usando las recomendaciones del fabricante (AB BIODISK, Solna, Suecia). f. Veintitrés fueron probados por el procedimiento CLSI (2006) y ocho por Etest; los resultados de ampicilina, metronidazol y tetraciclina fueron producidos por Etest. g. Trimetoprim-sulfametoxazol				

5 Todos los organismos que se probaron se recogieron de pacientes en EE. UU. y centros médicos europeos desde 2005 hasta el presente. Las fuentes de aislados recuperados incluyeron sangre, piel y tejidos blandos, infecciones del tracto respiratorio y tracto gastrointestinal. Las especies y fenotipos de organismos inusuales/raros requieren el uso de cepas aisladas antes de 2005 o de otras áreas geográficas. Se probaron organismos: *H. pylori* (23; dos resistentes a CLR), *C. jejuni* (20; muestras de fluoroquinolona y resistentes a tetraciclina), *Salmonella spp.* (20; 11 grupos), *Shigella spp.* (40; cuatro especies).

10 La Tabla 2 muestra las distribuciones MIC CEM-101 para todas las cepas probadas (cuatro especies, 103 cepas). Los resultados MIC CEM-101 para *H. pylori* fueron los más bajos (≤0,03-0,4 µg/ml), mientras que las MIC para las Enterobacteriaceae podrían alcanzar hasta ≥16 µg/ml.

Tabla 2. Distribuciones MIC CEM-101 para todas las poblaciones probadas de patógenos en este protocolo (103 cepas).

Organismo (probado n.º)	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	>16
<i>H. pylori</i> (23)	1	15	2	3	0	0	1	1	0	0
<i>C. jejuni</i> (20)	0	0	0	0	0	10	0	8	2	0
<i>Salmonella spp.</i> (20)	0	0	0	0	0	3	4	4	4	5
<i>Shigella spp.</i> (40)	0	0	0	0	0	2	0	14	18	6

15 CEM-101 muestra una potente actividad contra estafilococos (MIC50, 0,06 µg/ml), estreptococos (MIC50, 0,015 µg/ml), enterococos (MIC50/90, 0,25 µg/ml) y otros cocos grampositivos, incluidas cepas resistentes a ERY y CLN. por Etest usando las instrucciones de inserción del paquete del fabricante (AB BIODISK). Se probaron CEM-101 y 14 agentes antimicrobianos de comparación seleccionados.

20 Los intervalos de control de calidad (QC) y los criterios interpretativos para los compuestos comparadores fueron los publicados en CLSI M100-S18 (2008); las cepas de QC probadas incluyen *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. pylori* ATCC 43504 y *C. jejuni* ATCC 33560.

25 CEM-101 inhibió *H. pylori* (MIC50, 0,06 µg/ml) y otros diversos patógenos gastrointestinales. La actividad de CEM-101 contra *H. pylori* (MIC90, 0,25 µg/ml) fue la más similar a la de CLR (MIC90, 0,12 µg/ml). CEM-101 también fue la más similar a otros macrólidos frente a *C. jejuni* (resultados de MIC50 y MIC90, 1-4 µg/ml). CEM-101 también mostró ser prometedor para la aplicación contra infecciones intestinales causadas por *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, una actividad similar a la de AZI.

30 EJEMPLO. Modelo animal de gastroenteritis por *H. pylori*. 6 ratones hembra/C57BL (edad,>7 semanas) se inoculan con la cepa SS1 de *H. pylori* (Lee, y col., 1997, Gastroenterology 112:1386-1397) a través de sondas de

suspensiones de 100 µl (109 CFU/ml). La infección se controla (después de Crone, y col., Clin Diagn Lab Immunol. julio de 2004, 11 (4): 799-800) mediante el análisis de gránulos fecales usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas basado en anticuerpos monoclonales (FemtoLab *H. pylori* Cnx; Connex, Martinsried, Alemania) para detectar infección por *H. pylori* (SS1). De acuerdo con las directrices del fabricante, una densidad óptica (DO) de <0,150 se definió como negativa para *H. pylori*, y una DO de > 0,150 se consideró un resultado de prueba positivo.

El nivel de infección y el nivel de gastritis presente también se miden usando procedimientos histológicos y cultivo de tejidos homogeneizados. Los ratones se sacrifican por asfixia con CO₂ y dislocación cervical, después de lo cual se extirpan los estómagos para su exámen histológico y cultivo bacteriano. Las secciones embebidas en parafina se tiñen con hematoxilina y eosina para la histología y con una tinción de May-Grünwald-Giemsa modificada para evaluar la colonización bacteriana (Laine, y col., 1997, Gastrointest. Endosc. 45:463-467). La gastritis se evalúa en el cuerpo y el antro mediante el uso de un sistema modificado de clasificación de Sydney para la gastritis (Lee, y col., 1997). La gravedad de la gastritis y la densidad de colonización bacteriana son evaluadas a ciegas por un observador imparcial.

CEM-101 se administra con y sin un compuesto inhibidor de la bomba de protones de acuerdo con el régimen de dosificación en el protocolo y el grado de infección controlado como se describió anteriormente.

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

Las acumulaciones y actividades después de 24 h de incubación, con y sin inhibidores de transportadores de flujo de salida, se muestran en la siguiente Tabla, donde Cc/Ce es la relación de concentración celular aparente a extracelular, y E_{max} es la disminución máxima de cfu intracelular en comparación con el inóculo posterior a la fagocitosis (calculado a partir de la regresión no lineal [sigmoideal] de los experimentos de respuesta dosis-efecto).

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

^(a) Estadísticamente significativo tanto de control como de Gemfibrozil; ^(b) no es estadísticamente significativo.

EJEMPLO. Actividad intracelular de antibióticos. Se determinó la determinación de la actividad antibiótica contra la cepa ATCC 25923 de *S. aureus* intrafagocítica. Se realizaron estudios completos de dosis-respuesta para evaluar el impacto del flujo de salida activo en la modulación de la actividad intracelular de CEM-101 y AZI contra *S. aureus* intrafagocítica (cepa ATCC 25923 [MIC: CEM-101, 0,125 mg/l; AZI, 0,5 mg/l]). Los antibióticos se compararon a las 24 h para: (i) su concentración estática relativa (Cs), y (ii) su eficacia máxima relativa (E). Mientras que el verapamilo (pero no el gemfibrozil) aumenta la actividad intracelular de AZI, ninguno de los inhibidores tiene un efecto significativo sobre la actividad de CEM-101, lo que sugiere que este último, a diferencia de AZI, no es un sustrato de los transportadores eucariotas correspondientes.

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

La acumulación celular de CEM-101 en comparación con la de AZI en células THP-1 se midió por primera vez Fig. 5 (panel A). A las 24 h, ambos antibióticos se concentran en grandes extensiones en las células, pero con un mayor valor (Cc/Ce) para CEM-101. En una segunda etapa, se investigó si CEM-101 es un sustrato de transportadores de

flujo de salida de Pgp o MRP Fig. 5 (panel B). Usando un inhibidor de Pgp (verapamilo) o MRP (gemfibrozil), no se observan variaciones significativas de la acumulación celular de CEM-101, mientras que el verapamilo aumenta significativamente la acumulación celular de AZI.

- 5 La captación de CEM-101 fue lineal en el tiempo, alcanzando niveles de acumulación de aproximadamente 375 veces en 24 h (AZI, 160X, CLR, 30X, TEL, 21X). La acumulación se suprimió por el pH ácido o por la adición del protón ionóforo monensina, pero no se modificó con verapamilo o gemfibrozil (inhibidores preferenciales de Pgp y MRP, respectivamente). El panel B muestra que la acumulación de CEM-101 y AZI se redujo cuando los experimentos se realizaron a pH ácido, y el cambio se produjo casi por completo cuando el pH se elevó de 7 a 6. El
- 10 panel C muestra que la monensina, que es conocida por disminuir la acumulación celular de muchas bases orgánicas débiles, también suprime casi por completo la acumulación de CEM-101 y AZI. Por el contrario, verapamilo, un inhibidor del transportador de flujo de salida de la glicoproteína P (Pgp, también conocido como MDR1), aumentó la acumulación de AZI sin afectar la de CEM-101, mientras que gemfibrozil, un inhibidor de proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP) y otros transportadores de aniones orgánicos no afectó ninguno
- 15 de los compuestos. Ni el verapamilo ni el gemfibrozil afectaron a la acumulación de TEL o CLR (datos no mostrados). Se examinó el flujo de salida de CEM-101 de las células incubadas con 10 mg/l de CEM-101 durante 1 hora y luego se transfirió a un medio libre de fármaco. El flujo de salida transcurrió de forma bimodal, con la mitad del fármaco asociado a la célula que se libera en aproximadamente 10 minutos, seguido de unos tiempos de liberación más lentos de varias horas (datos no mostrados).

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

25 la siguiente tabla.

	MIC ^a	Cs ^b	E _{max} ^c
		CEM-101	
<i>S. a.</i>	0,06	0,022	-0,86
<i>L. m.</i>	0,004	0,11	-0,66
<i>L. p.</i>	0,004	0,018	-1,03
		AZI	
<i>S. a.</i>	0,5	> 50	0,04
<i>L. m.</i>	1	11,6	-0,81
<i>L. p.</i>	0,016	2,90	-0,83
		CLR	
<i>S. a.</i>	0,5	0,84	-0,18
<i>L. m.</i>			
<i>L. p.</i>	0,007	0,12	-0,71
		TEL	
<i>S. a.</i>	0,25	0,63	-0,29
<i>L. m.</i>			
<i>L. p.</i>	0,007	0,06	-0,63

^amg/l; ^b concentración estática (mg/l) a las 24 h; ^c Δ log₁₀CFU a las 24 h en comparación con el inóculo posterior a la fagocitosis

EJEMPLO. Las MIC y las actividades extracelulares de los antibióticos se determinaron en MHB a pH neutro y ácido. Se determinó la actividad intracelular contra *S. aureus* (ATCC 25923) fagocitada por macrófagos THP-1 tal como se describió anteriormente (AAC, 2006, 50: 841-851). Los resultados se expresaron como un cambio de eficacia en

30 comparación con el tiempo 0 h.

Condiciones	CEM-101	AZI	CLR	TEL
MIC (mg/l)				
(i) pH 7,4	0,125	0,5	0,5	0,5
(ii) pH 5,5	1-2	256	16	8
Actividad extracelular (24 h): Δ log cfu desde el tiempo 0 h				
(i) Caldo pH 7,4				
E _{máx} ¹	-1,4 ± 0,1	-1,2 ± 0,6	-1,4 ± 0,2	-1,0 ± 0,4
Dosis estática ²	~ 0,06	~ 3,63	~ 1,41	~ 0,28
R ²	0,964	0,860	0,965	0,868
(ii) Caldo pH 5,5				

Em _{máx} ¹	-1,6 ± 0,4	+2,1 ± 0,1	-1,5 ± 0,8	-1,4 ± 0,9
Dosis estática ²	~ 1,48	/	~ 10,47	~ 9,33
R ²	0,915	/	0,911	0,879
Actividad intracelular (24 h) : Δ log cfu desde el tiempo 0 h				
Em _{máx} ¹	- 0,8 ± 0,2	0,10 ± 0,0	-0,1 ± 0,1	-0,4 ± 0,2
Dosis estática ²	~ 0,02	~ 7,8	~ 0,98	~ 0,23
R ²	0,906	0,980	0,974	0,935
THP-1				
Em _{máx} ¹	-0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,1	-0,1 ± 0,1	-0,4 ± 0,1
Dosis estática ²	~0,02	~10	~0,98	~0,28
1- Disminución máxima de cfu intracelular en comparación con el inóculo inicial posterior a la fagocitosis (calculado a partir de la regresión no lineal [sigmoideal] de respuesta dosis-efecto) administrado en el caldo (extracel.) o con macrófagos infectados (intracel.) 2- Concentración extracelular (Cs en mg/l) que produce un efecto estático aparente. Descriptores farmacológicos comparativos (E _{máx} y concentraciones estáticas [Cs]) obtenidos de los estudios de dosis-respuestas. Estudios de dosis-respuesta en caldo Mueller-Hinton. Contra <i>S. aureus</i> ATCC 25923 y en caldo, a pH 7,4, CEM-101 es sistemáticamente más activo que AZI, CLR y TEL; a pH 5,5, AZI, CLR y TEL muestran una disminución significativa de sus potencias, mientras que CEM-101 muestra menos cambio. En comparación con AZI, CLR y TEL, la actividad de CEM-101 se vió menos afectada por el pH ácido del caldo y mostró una mayor potencia (dosis estática más baja) y una mayor eficacia máxima (E _{máx}) contra <i>S. aureus</i> intracelular.				

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

Cepas bacterianas, pruebas de susceptibilidad y estudios de curvas de dosis-respuesta de 24 h con caldo. *S. aureus* ATCC 25923 (metilicina [metilicina] sensible), *L. monocytogenes* cepa EGD y *L. pneumophila* cepa ATCC 33153 se usaron en el presente estudio. Las determinaciones de MIC se realizaron en caldo de Mueller-Hinton (para *S. aureus*) y caldo de soja triptico (para *L. monocytogenes*) después de una incubación de 24 h, o en caldo de extracto de levadura tamponado por α-cetoglutarato (para *L. pneumophila*) después de una incubación de 48 h. Para los estudios de *S. aureus*, se realizaron experimentos de concentración-respuesta de 24 h en medio acelular en caldo Mueller-Hinton.

Infección celular y evaluación de actividades intracelulares antibióticas. La infección de las células THP-1 y la evaluación de la actividad intracelular de los antibióticos se realizaron usando procedimientos convencionales para *S. aureus* y *L. monocytogenes* o con adaptaciones menores para *L. pneumophila* usando (i) una multiplicidad de infección de 10 bacterias por macrófago y (ii) gentamicina (50 mg/litro) durante 30 a 45 min para la eliminación de bacterias no fagocitadas.

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

EJEMPLO. Susceptibilidad hacia *S. aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* EGD y *Legionella pneumophila* ATCC 33153. CEM-101 mostró valores de MIC inferiores a AZI frente a los tres organismos seleccionados (*S. aureus*, 0,06 y 0,5 mg/l; *L. monocytogenes*, 0,004 y 1 mg/litro y *L. pneumophila*, 0,004 y 0,016 mg/litro) en la prueba de susceptibilidad convencional. Las MIC de CEM-101, TEL, AZI y CLR contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* se midieron en caldos ajustados a valores de pH que oscilaban entre 5,5 y 7,4. El intervalo se seleccionó para incluir los valores a los que los antibióticos podrían estar expuestos en el medio extracelular o intracelularmente para los dos organismos considerados. Como se ilustra en la Fig. 1, los cuatro fármacos mostraron una notable disminución en la potencia contra ambos organismos cuando el pH disminuyó de 7,4 a 5,5, con AZI lo que demuestra la pérdida de actividad más significativa. CEM-101 conservó la mayor actividad, lo que muestra consistentemente las MIC más bajas en todo el intervalo de pH investigado, con valores (mg/litro) que oscilan entre 0,06 (pH 7,4) y 0,5 (pH 5,5) para *S. aureus* (ATCC 25923) y 0,0039 (pH 7,4) a 0,25 (pH 5,5) para *L. monocytogenes* (EDG). Para *L. pneumophila*

(datos no mostrados), la MIC de CEM-101 aumentó de 0,005 a 0,01 y la de AZI de aproximadamente 0,01 a 0,25 mg/litro cuando el pH del caldo disminuyó de 7,4 a 6,5 (no se pudo determinar que se hiciera a valores de pH más bajos debido a la ausencia de crecimiento).

5 EJEMPLO. Tiempo y efectos de concentración contra *S. aureus* extracelular e intrafagocítica. Se obtuvieron curvas de eliminación-tiempo a corto plazo (6 h) para CEM-101 en comparación con las de AZI contra *S. aureus* (ATCC 25923) en caldo y después de la fagocitosis por macrófagos THP-1 usando dos concentraciones fijas únicas de 0,7 y 4 mg/litro. La concentración más baja se eligió para ser relevante para la concentración sérica de AZI y CEM-101, y la concentración más alta se seleccionó para estar por encima de la MIC de AZI para los organismos de interés. Los resultados presentados en la Fig. 3 muestran que en estas condiciones, solo CEM-101 fue capaz de disminuir significativamente CFU en caldo así como en macrófagos THP-1 en la concentración de 0,7 mg/litro. A la concentración de 4 mg/litro en caldo, AZI con el tiempo logró el mismo efecto antibacteriano que CEM-101, pero a una tasa menor (5 h en comparación con 1 h). En los macrófagos THP-1, no se detectó actividad consistente para AZI, incluso a la concentración de 4 mg/litro, mientras que CEM-101 nuevamente logró una reducción de aproximadamente 1,5 log₁₀ CFU, similar a la magnitud vista en la concentración de 0,7 mg/litro. En todas las situaciones con CEM-101, la disminución máxima de CFU se obtuvo en 1 h y se mantuvo a partir de entonces.

A continuación, los investigadores realizaron experimentos de concentración-respuesta en un punto de tiempo fijo (24 h) para obtener los descriptores farmacológicos pertinentes de la actividad de CEM-101 (potencia relativa [50 % de concentración efectiva {EC₅₀}], concentración estática aparente [C_s] y eficacia máxima relativa [E_{máx}] en comparación con la actividad CLR, AZI y TEL (los detalles adicionales se describen en Barcia-Macay y col., Evaluación farmacodinámica de las actividades intracelulares de antibióticos contra *Staphylococcus aureus* en un modelo de macrófagos THP-1 Antimicrob. Agents Chemother. 50:841-851(2006)). Los datos se presentan en la Fig. 2 como una función de (i) concentraciones en peso (mg/litro) y (ii) múltiplos de las MIC (según se determina en caldo a pH 7,4). Los valores numéricos de los correspondientes descriptores farmacológicos se muestran en la Tabla. Parámetros de regresión pertinentes^a (con intervalos de confianza [IC]) y análisis estadístico de las curvas dosis-respuesta ilustradas en la Fig. 2.

		caldo ⁺			
antibiótico	E _{máx} [♦] (IC)	EC ₅₀ [◊] (C1)	C _s [∞]	R ²	
CEM-101	-1,37	mg/l	0,03	0,06	0,973
	(-1,67 a -1,08)		(0,02 a 0,06)		
	a;A		a;A		
		x MIC	0,48		
			(0,26 a 0,91)		
			a;A		
TEL	-1,00	mg/l	0,12	0,29	0,892
	(-1,78 a -0,22)		(0,03 a 0,52)		
	a;A		b;A		
		x MIC	0,46		
			(0,11 a 2,06)		
			a;A		
AZI	-1,23	mg/l	1,78	3,4	0,872
	(-2,55 a 0,083)		(0,45 a 7,02)		
	a;A		c;A		
		x MIC	3,55		
			(0,90 a 14,0)		
			b;A		
CLR	-1,41	mg/l	0,80	1,32	0,956
	(-1,95 a -0,87)		(0,41 a 1,56)		
	a;A		c;A		
		x MIC	1,59		
			(0,81 a 3,1)		
			a,b;A		
Macrófagos THP-1 ⁺⁺					
antibiótico	E _{máx} [♦] (IC)		EC ₅₀ [◊] (IC)	C ₅ [∞]	R ² (IC)
CEM-101	-0,86	mg/l	0,0068	0,022	0,927
	(-1,36 a -0,37)		(0,0023 a 0,020)		
	a; B		a; B		
		x MIC	0,11	0,35	
			(0,037 a 0,32)		

			a; B		
TEL	-0,29	mg/l	0,024	0,63	0,954
	(-0,70 a 0,12)		(0,007 a 0,088)		
	b; B		b; B		
		x MIC	0,097	1,04	
			0,027 a 0,35		
			a; B		
AZI	0,04	mg/l	0,11	> 50	0,983
	(-0,23 a 0,32)		(0,05 a 0,22)		
	b; B		c; B		
		x MIC	0,22	> 100	
			0,11 a 0,45		
			a; B		
CLR	-0,18	mg/l	0,046	0,84	0,974
	(-0,52 a 0,16)		(0,018 a 0,12)		
	b; B		b,c; B		
		x MIC	0,093	1,68	
			0,035 a 0,25		
			a; B		

^ausando todos los puntos de datos mostrados en la Fig.4 (datos de muestras sin antibiótico cuando la concentración extracelular de un antibiotico es inferior a 0,01 x MIC (5) ^{*}inóculo original [tiempo = 0 h]: 0,97 ± 0,24 x10⁶CFU/ml (n=3) ^{**}inóculo original (posterior a la fagocitosis) [tiempo = 0 h]: 2,74 ± 0,55 x10⁶CFU/mg de proteína (n=3) [♦]Disminución de CFU (en unidades log₁₀) en un tiempo = 24 h desde el inóculo original correspondiente, según se extrapola para la concentración de antibiótico = ∞; las muestras que producen menos de 5 cuentas se consideraron por debajo del nivel de detección. [◊]concentración (en mg/l o en x MIC) lo que causa una reducción del inóculo a mitad de camino entre los valores inicial (E₀) y máximo (E_{max}), como se obtiene de la ecuación de Hill (usando un factor de pendiente de 1); ^{◊◊}concentración (en mg/l o en x MIC) que da como resultado un crecimiento bacteriano no aparente (número de CFU idéntico al inóculo original), según lo determinado por la interpolación gráfica; Análisis estadístico. Análisis de las diferencias entre antibióticos (por columna para las filas correspondientes, ANOVA de una vía con prueba de Tuckey para comparaciones múltiples entre cada parámetro para todos los fármacos): las cifras con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes entre sí (p <0,05). Análisis de las diferencias entre caldo y macrófagos THP-1 (por fila para las columnas correspondientes, prueba t de dos colas no emparejadas): las cifras con letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes entre sí (p <0,05).

- Las actividades tanto en caldo como en macrófagos THP-1 se desarrollaron de una manera dependiente de la concentración, como se indica por la forma sigmoideal de cada función de mejor ajuste (ecuación de Hill). En caldo, la eficacia relativa de CEM-101 (E_{máx} de -1,37 log₁₀) fue similar a la de los otros fármacos (valores de E_{máx} de -1,00 a -1,41 log₁₀). En los macrófagos THP-1, la eficacia relativa de CEM-101 disminuyó significativamente en comparación con la del caldo (E_{máx} de -0,86 log₁₀), pero no en la misma medida que la de los otros fármacos, que se volvieron esencialmente bacterioestáticos solo (valores de E_{máx} de 0,04 a -0,29 log₁₀). Sobre una base de peso, CEM-101 tenía potencias relativas más altas (bajos valores de E₅₀) y concentraciones estáticas más bajas (menores valores de C_s) que los tres fármacos comparadores tanto en caldo como en macrófagos THP-1. Cuando los datos se analizaron como una función de la concentración equipotente (múltiplos de la MIC), estas diferencias en los valores de EC₅₀ se reducen, lo que indica que la MIC era el parámetro de conducción principal en este contexto. En caldo, incluso cuando se analizó como múltiplos de la MIC, CEM-101 y CLR todavía mostraron EC₅₀ significativamente inferiores que TEL y AZI.
- 15 Ejemplo. Actividad contra *L. monocytogenes* y *L. pneumophila*. Se usó el mismo enfoque que para *S. aureus* para evaluar las actividades de CEM-101 y AZI contra *L. monocytogenes* y *L. pneumophila* fagocitados para obtener información sobre las relaciones de concentración-efecto y sobre los correspondientes descriptores farmacológicos pertinentes. Como se muestra en la Fig. 4, se observó una relación compatible con la ecuación de Hill en todos los casos, aunque el crecimiento limitado de *L. pneumophila* hizo que el ajuste de las funciones fuera algo más incierto.
- 20 Cuando los datos se representaron frente a la concentración de peso, pareció que CEM-101 tenía una potencia relativa más alta (EC₅₀ más baja) que AZI para *L. monocytogenes* y *L. pneumophila*. Esta diferencia se redujo pero, no obstante, se mantuvo significativa cuando los datos para *L. pneumophila* se trazaron frente a los múltiplos de la MIC, lo que indica que la MIC fue un factor importante, pero no el conductor exclusivo de la actividad intracelular contra este organismo. A la inversa, no se observaron diferencias en las respuestas para *L. monocytogenes* cuando
- 25 los datos se expresaron como múltiplos de la MIC. Los valores numéricos de los descriptores farmacológicos

pertinentes y los análisis estadísticos de sus diferencias se muestran en la Tabla. Parámetros de regresión pertinentes^a (con intervalos de confianza [IC]) y análisis estadístico de las curvas dosis-respuesta ilustradas en la Fig. 4.

<i>L. monocytogenes</i> EGD ⁺					
antibiótico	E _{máx} [♦] (IC)		EC ₅₀ [◊] (IC)	C _s ^{◊◊}	R ²
	-0,66	mg/l	0,020	0,11	0,934
CEM-101	(-1,28 a -0,037)		(0,005 a 0,073)		
	a		a		
		x MIC	5,00	0,88	
			(1,36 a 18,5)		
			a		
AZI	-0,81	mg/l	2,66	11,6	0,953
	(-2,11 a 0,48)		(0,91 a 7,73)		
	a		b		
		x MIC	2,66	11,6	
			(0,81 a 3,1)		
			a		
<i>L. pneumophila</i> ATCC 33153 ⁺⁺					
antibiótico	E _{máx} [♦] (IC)		EC ₅₀ [◊] (IC)	C _s ^{◊◊}	R ²
	-1,03	mg/l	0,052	0,018	0,920
CEM-101	(-1,34 a -0,72)		(0,012 a 0,23)		
	a		a		
		x MIC	13,1	4,56	
			(3,02 a 57,0)		
			a		
AZI	-0,83	mg/l	2,86	2,90	0,903
	(-2,00 a 0,34)		(0,17 a 48,6)		
	a		b		
		x MIC	179,0	181	
			(10,5 a 3038)		
			b		

^ausando todos los puntos de datos mostrados en la Fig.4 (los datos de muestras sin antibiótico no se usaron debido al indicio de crecimiento extracelular cuando la concentración extracelular de un antibiótico es inferior a 0,01 x MIC (5).⁺ inóculo original (posterior a la fagocitosis) [tiempo = 0 h; CFU/mg de proteína]: *L. monocytogenes*, 1,67 ± 0,22 x10⁶ (n=3); *L. pneumophila.*, 0,94 ± 0,60 x10⁶. [♦]Disminución de CFU (en unidades de log) en un tiempo = 24 h (*L. monocytogenes*) o 48 h (*L. pneumophila.*) del inóculo original correspondiente, según se extrapola para la concentración de antibiótico ∞; las muestras que producen menos de 5 cuentas se consideraron por debajo del nivel de detección. [◊]concentración (en mg/l o en x MIC) lo que causa una reducción del inóculo a mitad de camino entre los valores inicial (E₀) y máximo (E_{máx}), como se obtiene de la ecuación de Hill (usando un factor de pendiente de 1); ^{◊◊}concentración (en mg/l o en x MIC) que da como resultado un crecimiento bacteriano no aparente (número de CFU idéntico al inóculo original), según lo determinado por la interpolación gráfica. Análisis estadístico: análisis de las diferencias entre los dos antibióticos (por columna para las filas correspondientes; prueba t de dos colas no emparejadas): las cifras con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes entre sí (p < 0,05).

5

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

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

10

Células	THP-1 (macrófagos humanos)	J774 (macrófagos murinos)	MDCK (células epit. caninas)	MDCK que sobreexpresan los transportadores de flujo de salida de MDR1
Cc/Ce a las 5 h	~ 50 - 150	~ 60	~ 45	~ 30

EJEMPLO. Estudios de dosis-respuesta de ejemplo de CEM-101 frente a comparadores (AZI, CLR y TEL) contra *S. aureus* ATCC 25923 intracelular (macrófagos THP-1). Véase la Fig. 7 y la Tabla.

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

EJEMPLO. Actividad intracelular: estudios comparativos con otros agentes antiestafilocócicos. Se midió la respuesta comparativa de dosis estática de antibióticos contra *Staphylococcus aureus* intracelular (cepa ATCC 25923) en macrófagos THP-1. Véase la Fig. 6 las barras representan las MIC (en mg/l) o la dosis estática extracelular.

5

PROCEDIMIENTO. Los macrófagos peritoneales de ratón se infectaron con *M. leprae*, los fármacos se añadieron e incubaron a 33 °C durante 3 días. Después de 3 días, los macrófagos se lisaron para liberar *M. leprae* intracelular, que luego se ensayó para determinar su viabilidad por radiorespirometría y tinción de viabilidad. CEM-101 muestra eficacia contra la viabilidad intracelular de *M. leprae*.

10

El aislado Thai-53 de *M. leprae*, mantenido por pases en serie en almohadillas de ratones nu/nu atímicos, se usó para todos los experimentos. Para la prueba de axénicos, se incubaron en medio *M. leprae* viables recién cosechadas junto con diferentes concentraciones de los fármacos (CEM-101, CLR y rifampicina) durante 7 días a 33 °C. Al final de esta incubación, los *M. leprae* tratados con fármaco fueron sometidos a radiorespirometría para evaluar la viabilidad basada en la oxidación de palmitato y tinción con colorantes de viabilidad para evaluar el grado de daño de la membrana. Para pruebas intracelulares, los macrófagos peritoneales de ratones suizos se infectaron con *M. leprae* viables recién cosechadas a una MOI de 20: 1 durante 12 horas. Al final de la infección, las bacterias extracelulares se lavaron y los fármacos se añadieron a diferentes concentraciones y se incubaron durante 3 días a 33 °C. Al cabo de 3 días, las células se lisaron para obtener *M. leprae* intracelular para la radiorespirometría y la tinción de viabilidad.

20

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

25

EJEMPLO. La alta potencia de CEM-101 contra *Streptococcus pneumoniae*, *estreptococos* del grupo β-hemolítico y *viridans*, *Staphylococcus spp.* y los *enterococos* se han documentado en los primeros estudios de tamizado realizados usando los procedimientos del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) de referencia. Dado que los mecanismos y los acontecimientos de resistencia aumentan rápidamente lo cual puede comprometer la clase de cetólido de MLSB, se evaluó la actividad bactericida (MBC y curvas de eliminación) de CEM-101 con cinco clases de agentes antimicrobianos seleccionados cuando se prueba el tipo salvaje (WT) y subconjuntos de organismos resistentes definidos fenotípicamente/genotípicamente. Las determinaciones de MBC para CEM-101, TEL y CLR usaron procedimientos CLSI para 40 cepas (6 grupos de especies). KC usó 8 cepas (6 grupos de especies). PAE se probó (5 cepas) a una concentración de 4x durante una exposición de 1 o 2 horas; control TEL.

35

Estudios de curvas MBC y eliminación: Un total de 40 cepas (10 *S. pneumoniae*, 10 *S. aureus* y 5 cada una de *estreptococos* β-hemolíticos, *estreptococos* del grupo *viridans*, *estafilococos* coagulasa negativos [CoNS] y *enterococos*) se probaron con MIC seguido de determinaciones de MBC usando procedimientos CLSI (intervalo MIC y MBC, 0,008-16 µg/ml). La concentración más baja de un agente probado que mató ≥ 99,9 % del inóculo inicial se definió como el punto final MBC (Tablas 2 y 3). Se realizó una actividad bactericida de eliminación de tiempo para CEM-101, TEL, CLR y AZI en ocho cepas seleccionadas de acuerdo con los procedimientos descritos por Moody & Knapp, NCCLS M21-A3 y M26-A. Los compuestos se probaron a 2x, 4x, 8x MIC; y los recuentos de colonias se realizaron en T0, T2, T4, T8 y T24.

40

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

50

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

ES 2 676 168 T3

Organismo/agente antimicrobiano (probado n.º)	N.º de cepas con valor MBC/MIC de:					
	1	2	4	8	16	≥32
<i>S. pneumoniae</i> (10)						
CEM-101	3	5	0	0	0	2
Telitromicina	2	6 ^a	0	0	0	2
Claritromicina	2	3	1	0	0	^b
Azitromicina	2	4	0	0	0	^b
<i>Streptococcus</i> β-hemolíticos (5)						
CEM-101	0	1	2	0	0	2
Telitromicina	0	1	1	1	0	2
Claritromicina	0	0	1	1	0	2 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	2	2 ^b
<i>Streptococcus</i> del grupo <i>viridans</i> (5)						
CEM-101	3	0	1	0	0	1
Telitromicina	2	1	1	0	0	1
Claritromicina	0	0	1	0	0	3 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	1	3 ^b
<i>S. aureus</i> (10)						
CEM-101	1	0	0	0	1	8
Telitromicina	0	0	0	0	0	10
Claritromicina	0	0	0	0	0	6 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	6 ^b
<i>Stafilococcus coagulasa neg.</i> (5)						
CEM-101	1	1	0	3	0	0
Telitromicina	0	0	0	0	2	3
Claritromicina	0	0	0	0	0	4 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	4 ^b
<i>Enterococcus spp.</i> (5)						
CEM-101	0	0	0	0	0	5
Telitromicina	0	0	0	0	0	5
Claritromicina	0	0	0	0	0	2 ^b
Azitromicina	0	0	0	0	0	2 ^b
a. Incluye seis aislados con una MIC de ≤0,008 µg/ml y una MBC de 0,015 µg/ml (comparaciones fuera de escala).						
b. MBC no se evaluó en aislados con resultados de MIC de nivel resistente.						

CEM-101 mostró una actividad bactericida rápida (reducción de ≥ 3 log₁₀ CFU/ml) contra cepas susceptibles a macrólidos de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* (solo a 8 x MIC) y *estreptococos* del grupo *viridans*, así como una *S. pyogenes* resistente a los macrólidos. CEM-101 produjo una mayor reducción de CFU/ml y una muerte más rápida en comparación con TEL o los macrólidos CLR y AZI.

Resumen de los resultados de las curvas de eliminación-tiempo.

Organismo	Agente antimicrobiano	Actividad antimicrobiana
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	CEM-101	Cidal en 2X, 4X, 8X
	Telitromicina	Cidal solo a 8X
	Claritromicina	Cidal solo a 8X
	Azitromicina	Cidal solo a 8X
<i>S. epidermidis</i> (095-2777A)	CEM-101	Cidal en 2X, 4X, 8X
	Telitromicina	Estática
	Claritromicina	Estática
	Azitromicina	Estática
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	CEM-101	Estática
	Telitromicina	Estática
	Claritromicina	Estática
	Azitromicina	Estática
<i>S. pneumoniae</i> (ATCC 49619)	CEM-101	Cidal en 2X, 4X, 8X
	Telitromicina	Cidal en 2X, 4X, 8X
	Claritromicina	Cidal en 2X, 4X, 8X (muerte lenta)

	Azitromicina	Cidal en 2X, 4X, 8X (muerte lenta)
<i>S. pneumoniae</i> (075-241B)	CEM-101	Estática
	Telitromicina	Estática
<i>S. pyogenes</i> (117-1612A)	CEM-101	Cidal solo a 8X
	Telitromicina	Cidal solo a 8X (muerte lenta)
	Claritromicina	Cidal solo a 8X (muerte lenta)
	Azitromicina	Cidal solo a 8X (muerte lenta)
<i>S. pyogenes</i> (088-11708A)	CEM-101	Cidal en 2X, 4X, 8X
	Telitromicina	Cidal en 2X, 4X, 8X (muerte lenta)
<i>S. mitis</i> (112-1885A)	CEM-101	Cidal en 2X, 4X, 8X
	Telitromicina	Cidal en 2X, 4X, 8X
	Claritromicina	Cidal solo a 8X (muerte lenta)
	Azitromicina	Cidal a 4X y 8X (muerte lenta)

CEM-101 mostró actividad bactericida cuando se probó contra *streptococos* susceptibles a macrólidos, CoNS y *S. pneumoniae* susceptibles a CLN resistentes a macrólidos. Las relaciones CEM-101 MBC/MIC pueden ser altas para *S. aureus*, pero algunas cepas mostraron resultados de MBC que permanecían dentro del intervalo susceptible de 5 concentraciones.

EJEMPLO. Actividad sobre *Chlamydia*. CEM-101, TEL, AZI, CLR y doxiciclina se proporcionaron como polvos y se solubilizaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Las suspensiones de fármaco se renovaron cada vez que se realizó el ensayo.

10

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

15

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

20 Prueba de susceptibilidad *in vitro*: La prueba de susceptibilidad de *C.pneumoniae* y *C. trachomatis* se realizó en cultivo celular usando células HEp-2 cultivadas en placas de microtitulación de 96 pocillos. Cada pocillo se inoculó con 0,1 ml de la cepa de prueba diluida para producir 10^3 a 10^4 IFU/ por ml, se centrifugó a 1.700 x g durante 1 h y se incubó a 35 °C durante 1 h. Los pocillos se aspiraron y se superpusieron con 0,2 ml de medio que contenía 1 µg de cicloheximida por ml y diluciones en serie con factor de dilución dos del fármaco de prueba.

25

Se inocularon placas duplicadas. Después de la incubación a 35 °C durante 48-72 horas, los cultivos se fijaron y tiñeron para inclusiones con anticuerpo conjugado con fluoresceína al antígeno del género lipopolisacárido (Pathfinder, Kallestad Diagnostics, Chaska, MN). La concentración mínima inhibitoria (MIC) es la concentración de antibiótico más baja a la que no se observaron inclusiones. La concentración bactericida mínima (MBC) se determinó aspirando el medio que contenía antibiótico, lavando los pocillos dos veces con solución salina tamponada con fosfato y añadiendo medio libre de antibióticos. Los cultivos se congelaron a -70 °C, se descongelaron, se pasaron a nuevas células, se incubaron durante 72 horas y luego se fijaron y tiñeron como anteriormente. La MBC es la concentración más baja de antibióticos que no da como resultado inclusiones después del pase. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

35

Actividades de CEM-101 y otros antibióticos contra 10 aislados de *C. pneumoniae*

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

Actividades de CEM-101 y otros antibióticos contra 10 aislados de *C. trachomatis*

40

Fármaco	MIC (µg/ml)			MBC (µg/ml)	
	Intervalo	50 %	90%	Intervalo	90 %

ES 2 676 168 T3

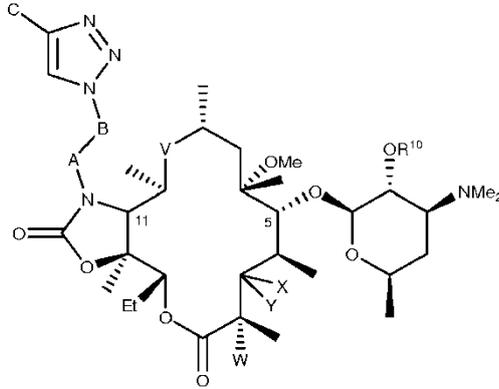
CEM 101	0,125-0,5	0,25	0,25	0,125-0,5	0,25
Telitromicina	0,015-0,25	0,06	0,06	0,015-0,25	0,06
Azitromicina	0,015-0,125	0,125	0,125	0,015-0,125	0,125
Claritromicina	0,015-0,125	0,06	0,06	0,015-0,125	0,06
Doxiciclina	0,015-0,06	0,06	0,06	0,015-0,06	0,06

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

- 5 EJEMPLO. Distribución de tejidos. CEM-101 fue bien absorbido y distribuido al tejido. En la rata a 250 mg/kg/d, las concentraciones medias de pulmón e hígado de CEM-101 fueron 17 y 15 veces mayores que en el plasma. Las concentraciones de pulmón e hígado fueron 503 y 711 veces mayores a las concentraciones plasmáticas a la dosis de 200 mg/kg/d en monos. Las concentraciones de CEM-101 en el corazón fueron significativamente menores que los niveles encontrados en pulmón o hígado con niveles 5 y 54 veces más altos que las concentraciones plasmáticas en ratas y monos, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

R¹⁰ es hidrógeno o acilo;

10 X e Y se toman junto con el carbono unido para formar carbonilo;

V es C(O);

W es H o F;

A y B se toman juntas para formar butileno o pentileno; y

C es arilo opcionalmente sustituido;

15

para su uso en el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal en un paciente que es causada al menos en parte por una infección por *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella*, *Shigella*, o una combinación de las mismas en el paciente.

2. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde R¹⁰ es hidrógeno.

20

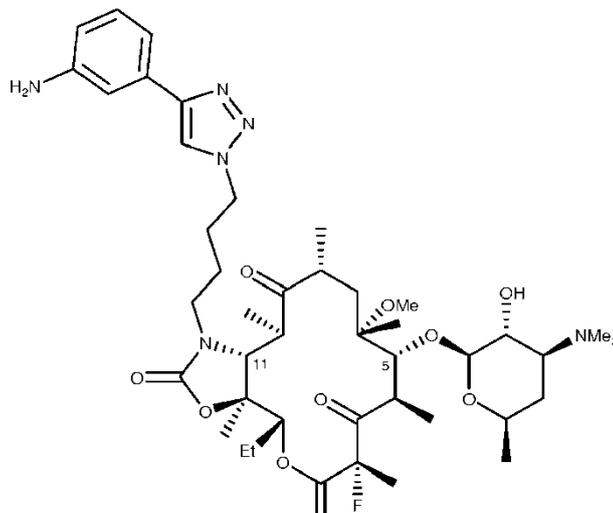
3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde A y B se toman juntas para formar butileno.

4. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, donde C es 3-aminofenilo.

25

5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación anterior, donde W es F.

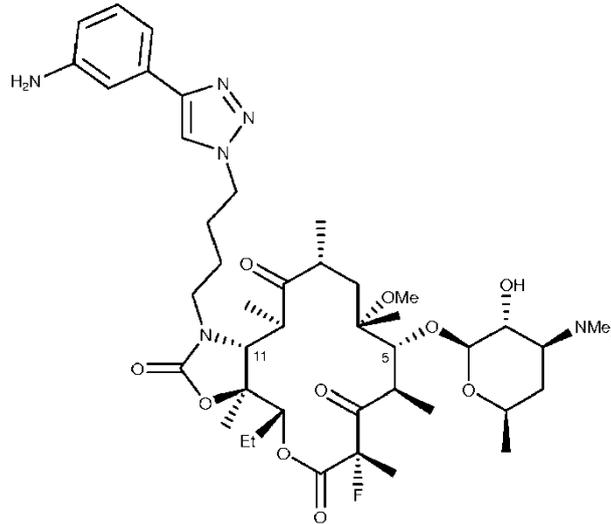
6. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto es de la fórmula.



30

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto es de la fórmula



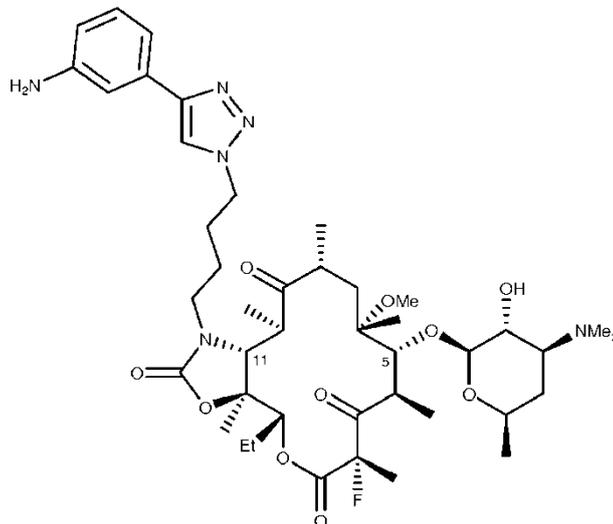
5

8. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación anterior, donde la enfermedad gastrointestinal es enteritis o gastroenteritis o una combinación de las mismas.

10 9. Una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal en un paciente que es causada al menos en parte por una infección por *H. pylori*, *C. jejuni*, *Salmonella*, *Shigella*, o una combinación de las mismas en el paciente, comprendiendo la composición una cantidad efectiva de uno o más compuestos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, y uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables para los mismos, o una combinación de los mismos.

15

10. Un compuesto de fórmula



20

para su uso en el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal en un paciente que es causada al menos en parte por una infección por *Listeria monocytogenes* en el paciente.

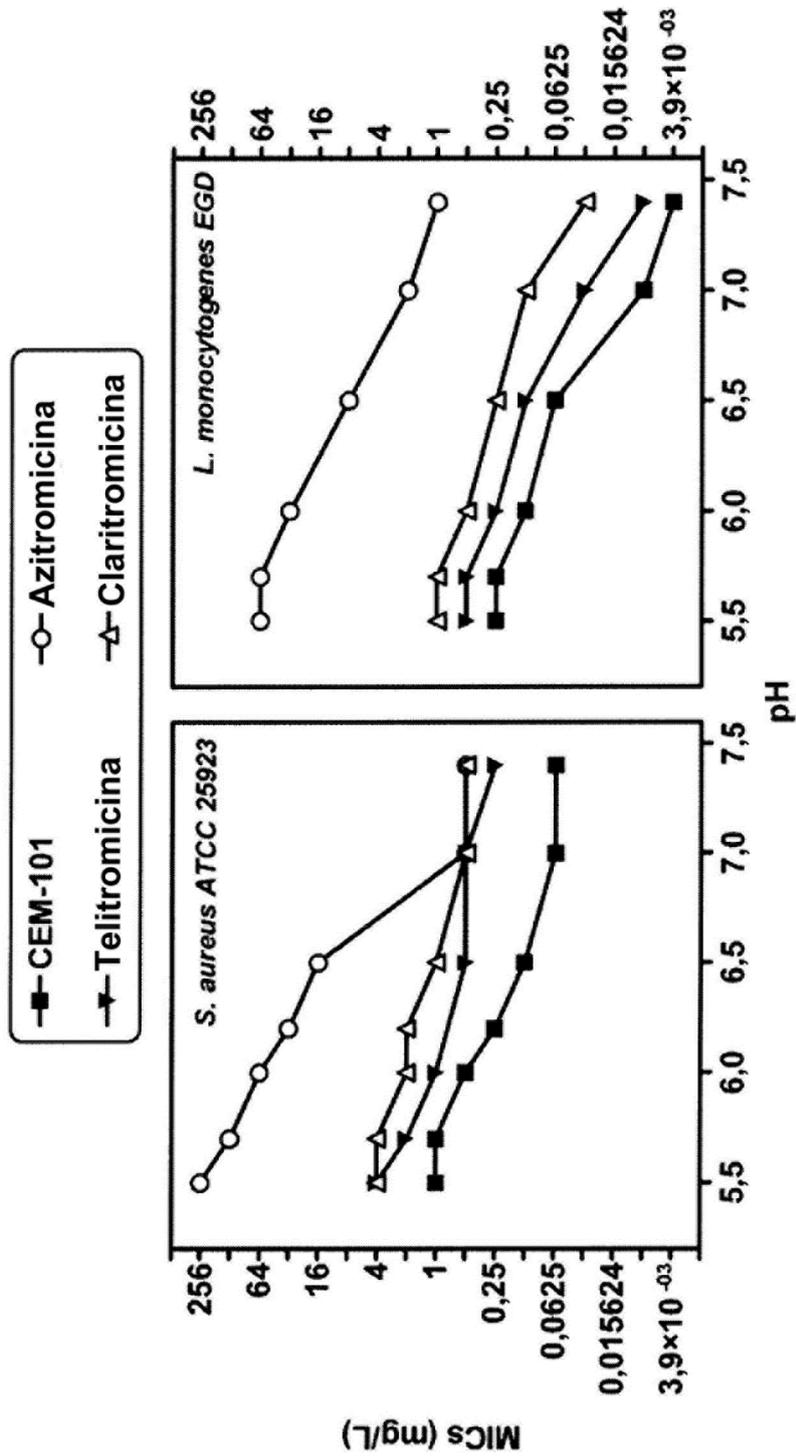


FIG. 1

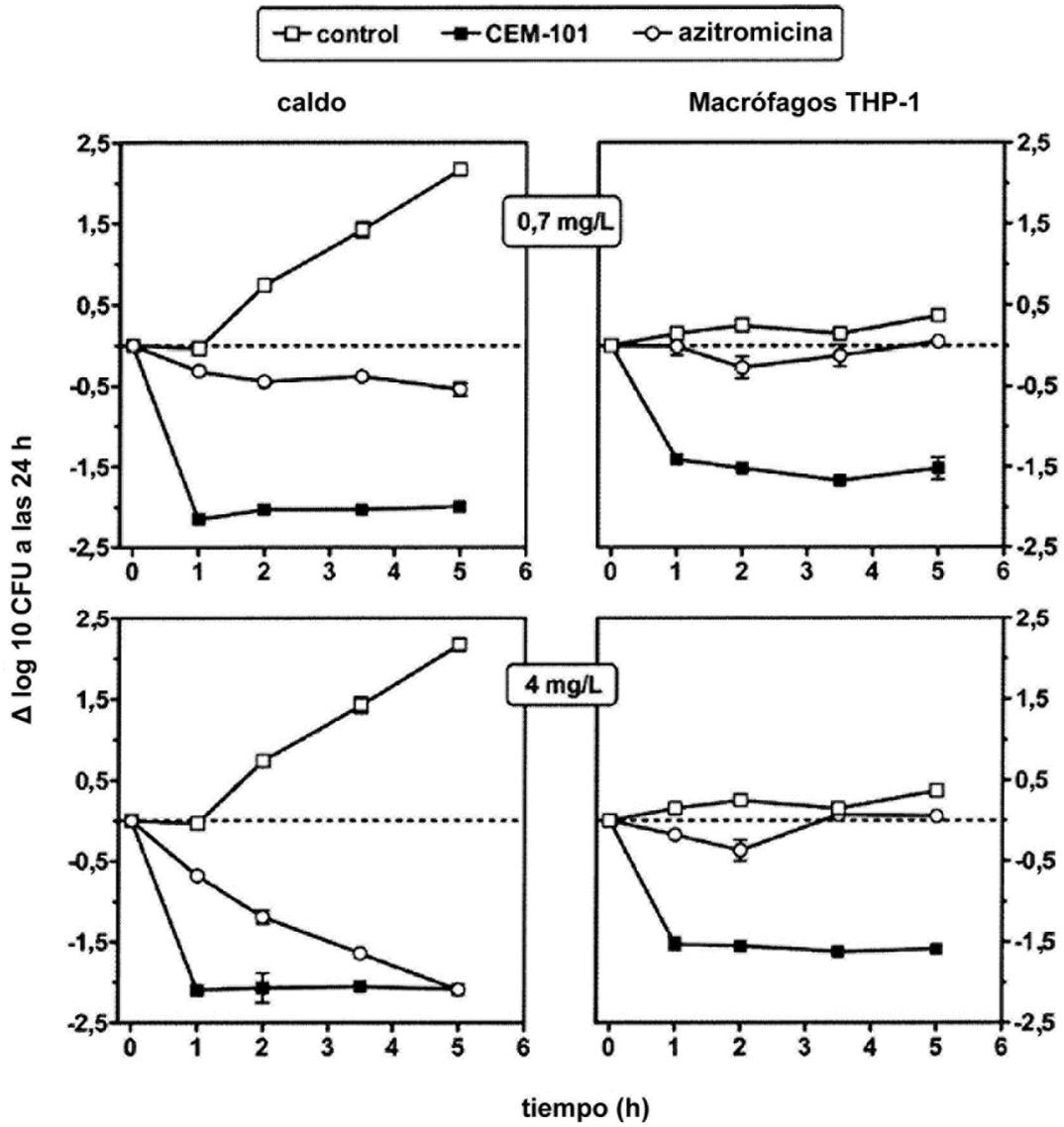


FIG. 3

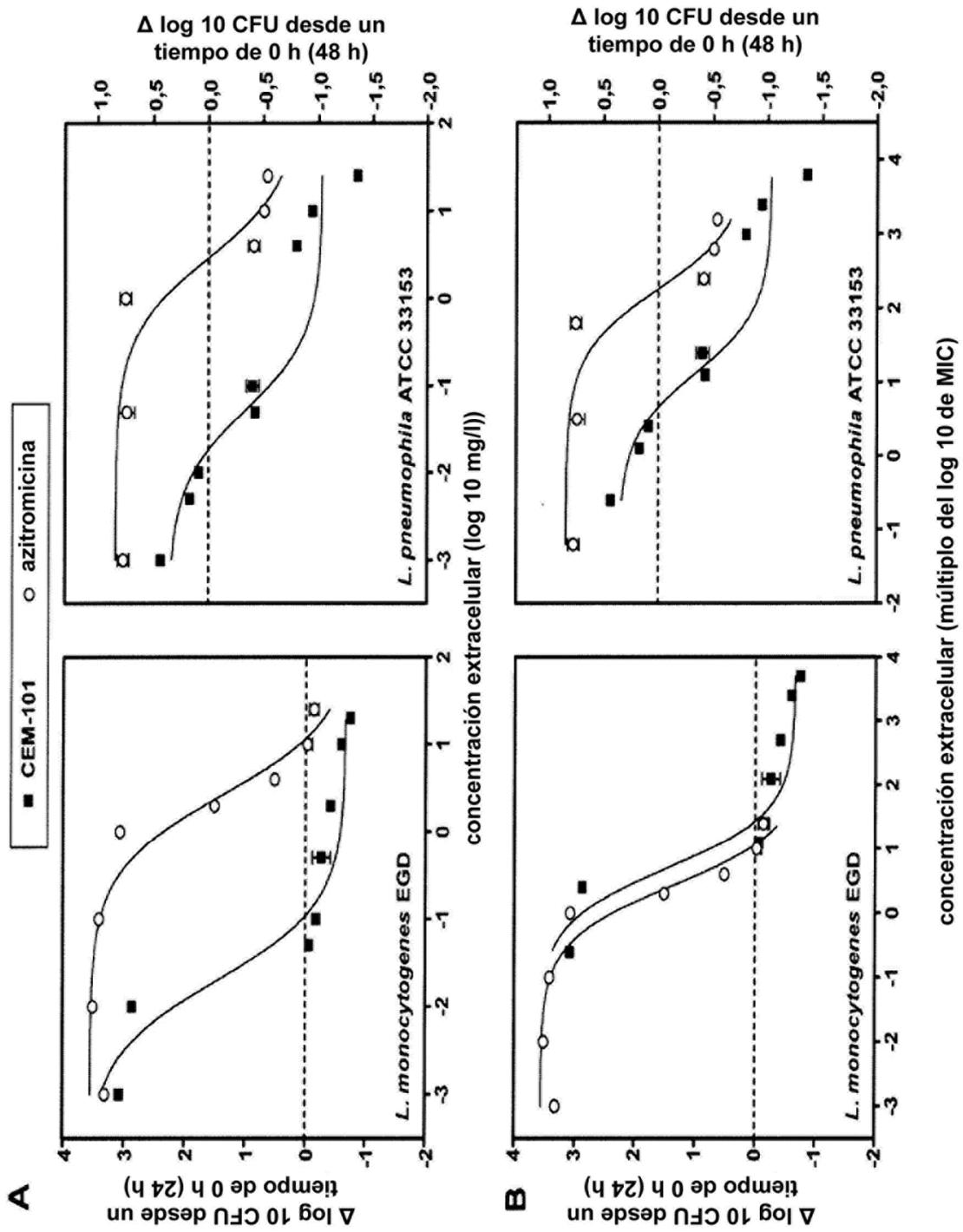


FIG. 4

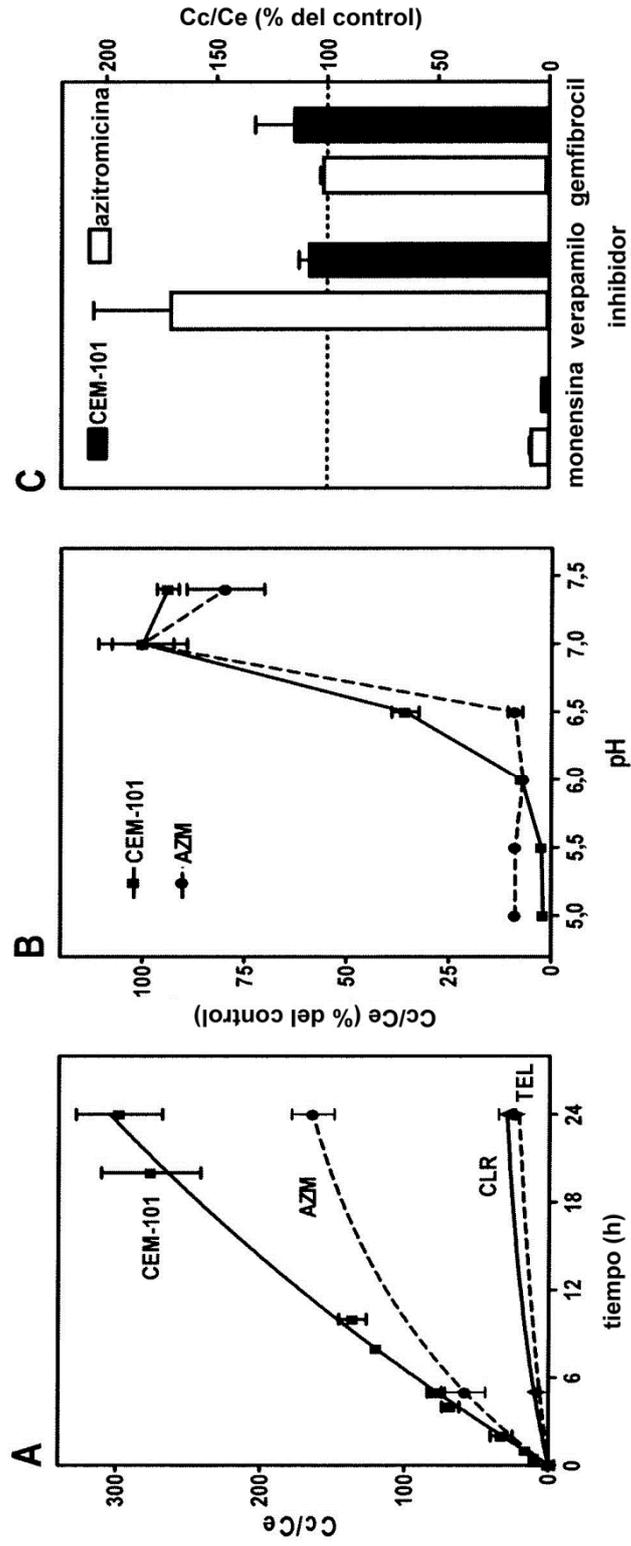


FIG. 5

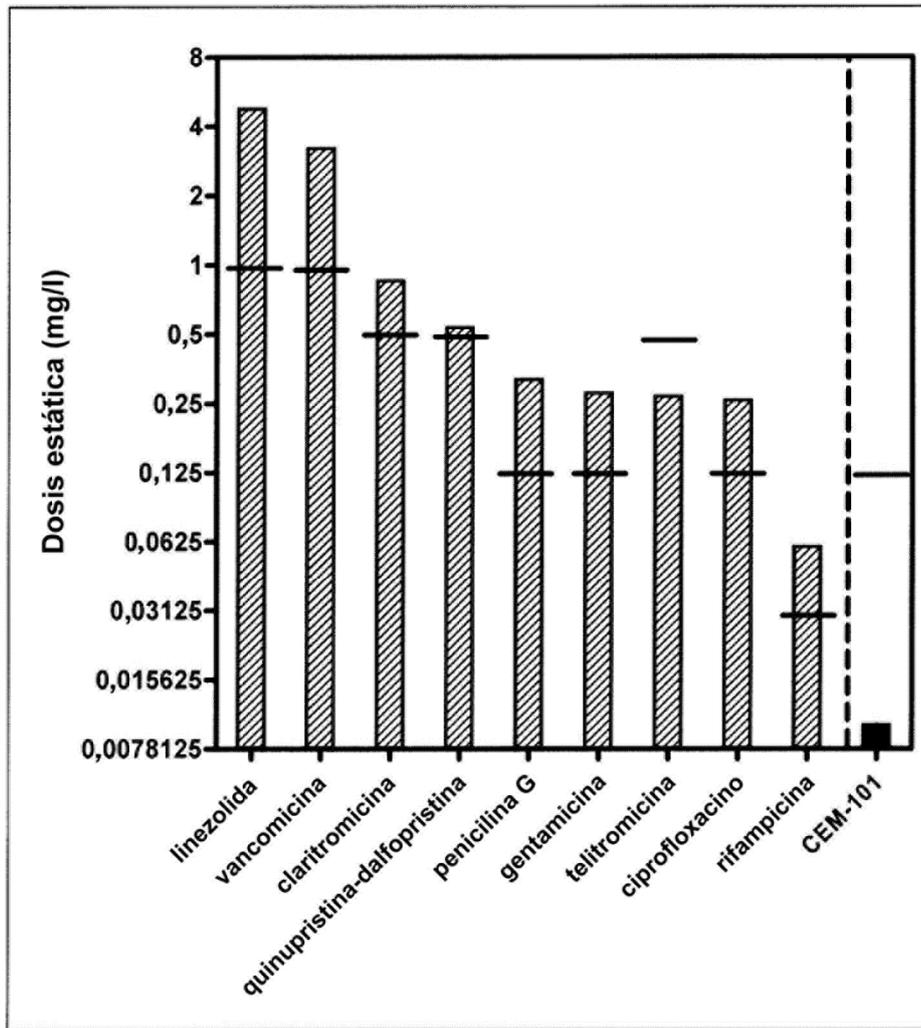


FIG. 6

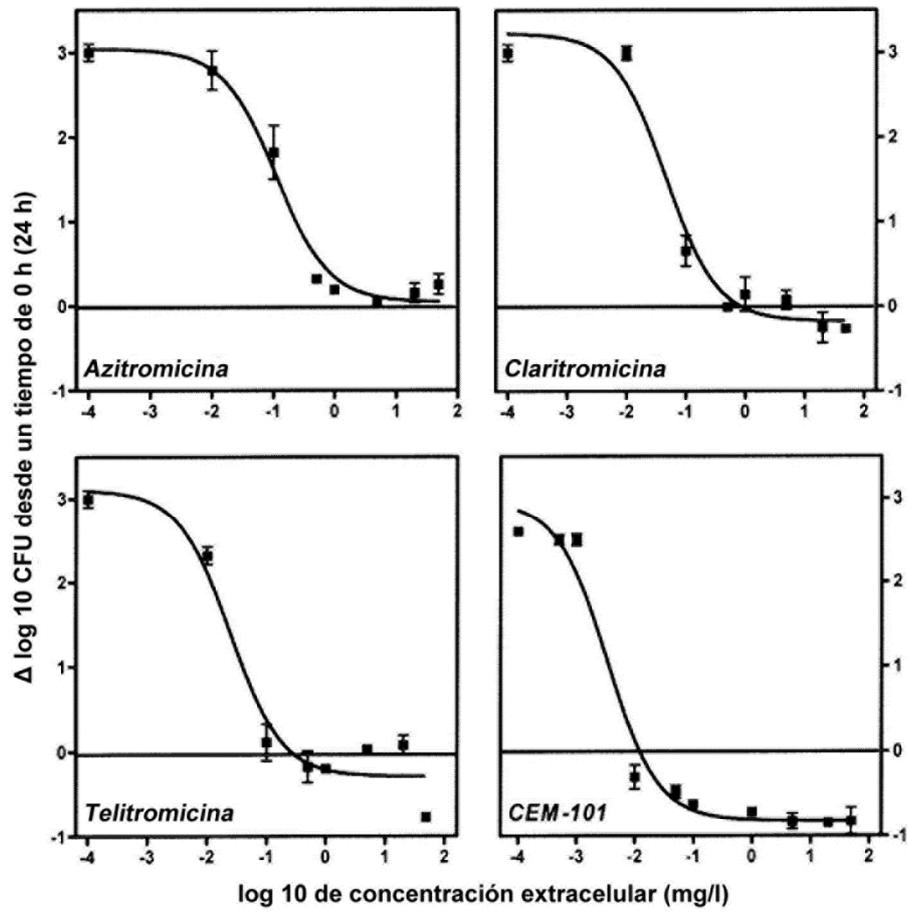


FIG.7