(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 676 308**

(51) Int. CI.:

C07D 407/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2008 PCT/US2008/000735**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2008 WO08091554**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2008 E 08713185 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2125850**

(54) Título: **Polimorfos macrocíclicos, composiciones que comprenden tales polimorfos, métodos de fabricación y uso de los mismos**

(30) Prioridad:

22.01.2007 US 881950 P
31.07.2007 US 831886

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2018

(73) Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065 , US

(72) Inventor/es:

CHIU, YU-HUNG;
CHE, TESSIE, MARY;
ROMERO, ALEX;
ICHIKAWA, YOSHI y
SHUE, YOUE-KONG

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Polimorfos macrocíclicos, composiciones que comprenden tales polimorfos, métodos de fabricación y uso de los mismos

2. Campo de la invención

La invención incluye una nueva forma polimórfica cristalina y composiciones que comprenden tal forma polimórfica cristalina. El polimorfo y las composiciones de la invención se usan en la industria médica y farmacéutica, por ejemplo, en el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos asociados al uso de antibióticos, quimioterapias, o terapias antivirales, que incluyen, pero no se limitan a, colitis, por ejemplo, colitis pseudomembranosa; diarrea asociada a antibióticos; e infecciones debidas a *Clostridium difficile* ("C. *difficile*"), *Clostridium perfringens* ("C. *perfringens*"), especies de estafilococos, por ejemplo, estafilococo resistente a meticilina, o enterococos, incluyendo enterococos resistentes a vancomicina.

3. Antecedentes de la invención

Las enfermedades de diarrea asociada a antibióticos ("AAD") están causadas por cepas productoras de toxinas de C. *difficile*, *Staphylococcus aureus* ("*S. aureus*") incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("MRSA") y *C. perfringens*. AAD es una seria preocupación económica para el sistema de atención sanitaria que se estima de forma conservadora que excede en 3.000-6.000 millones de dólares al año los costes hospitalarios solo en los Estados Unidos.

AAD es un problema considerable en los hospitales y en las instalaciones de asistencia a largo plazo. *C. difficile* es la causa principal de AAD en el ámbito hospitalario, representando aproximadamente un 20 % de los casos de AAD y la mayoría de los casos de colitis asociada a antibióticos ("AAC"). El creciente aumento de la diarrea asociada a *C. difficile* ("CDAD") se ha atribuido a la prescripción frecuente de antibióticos de amplio espectro a los pacientes hospitalizados.

Las tiacumicinas son un grupo de antibióticos macrólidos de 18 miembros aislados originalmente del cultivo de fermentación de *Dactylosporangium aurantiacum*. Las tiacumicinas son antibióticos grampositivos eficaces. En particular, las tiacumicinas, específicamente la tiacumicina B, muestran actividad frente a diversos patógenos bacterianos y en particular frente a C. *difficile*, una bacteria grampositiva (*Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, 1108-1111). Se llevó a cabo la purificación de tiacumicinas en disolventes adecuados, en los que la tiacumicina B exhibió un punto de fusión de 143-145 ºC (véase, por ejemplo, J. E. Hochlowski, *et al.*, *J. Antibiotics*, vol. XL, n.º 5, páginas 575-588 (1987)).

El comportamiento polimórfico de un compuesto puede ser de importancia crucial en farmacia y farmacología. Los polimorfos son, por definición, cristales de la misma molécula que tienen diferentes propiedades físicas como resultado del ordenamiento de las moléculas en la red cristalina. Las diferencias en las propiedades físicas exhibidas por los polimorfos afectan a parámetros farmacéuticos tales como estabilidad de almacenamiento, compresibilidad y densidad (importante en la formulación y la fabricación de un producto), y velocidades de disolución (un factor importante en la determinación de la biodisponibilidad). Las diferencias en la estabilidad pueden ser resultado de cambios en la reactividad química (por ejemplo, oxidación diferencial, de un modo tal que una forma de dosificación se decolora con mayor rapidez cuando está comprendida por un polimorfo que cuando está comprendida por otro polimorfo) o cambios mecánicos (por ejemplo, desmenuzamiento de los comprimidos en almacenamiento puesto que un polimorfo favorecido cinéticamente se convierte en un polimorfo termodinámicamente más estable) o ambos (por ejemplo, comprimidos de un polimorfo que son más susceptibles a la descomposición a alta humedad). Como resultado de las diferencias de solubilidad/disolución, en un caso extremo, algunas transiciones polimórficas pueden dar como resultado carencia de potencia o, en el otro extremo, toxicidad. Además, las propiedades físicas de un cristal pueden ser importantes en el procesamiento: por ejemplo, podría ser más probable que un polimorfo forme solvatos o podría dificultar la filtración y el lavado libre de las impurezas (es decir, la forma y la distribución de tamaño de las partículas podría ser diferente de un polimorfo con respecto a otro).

Cada compuesto farmacéutico tiene una concentración en sangre terapéutica óptima y una concentración letal. La biodisponibilidad del compuesto determina la concentración de la dosificación en la formulación de fármaco necesaria para obtener el nivel ideal en sangre. Si el fármaco puede cristalizar en forma de dos o más polimorfos que difieren en la biodisponibilidad, la dosis óptima dependerá del polimorfo presente en la formulación. Algunos fármacos muestran un margen estrecho entre las concentraciones terapéutica y letal. De ese modo, por razones tanto médicas como comerciales, se vuelve importante producir y comercializar el fármaco en su polimorfo termodinámicamente más estable, básicamente exento de otros polimorfos favorecidos cinéticamente o desfavorecidos.

De ese modo, existe la clara necesidad de desarrollar polimorfos seguros y eficaces de fármacos que son eficaces en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas a patógenos bacterianos. Los presentes inventores han identificado nuevas formas cristalinas y amorfas de compuestos macrólidos de 18 miembros que exhiben

actividad antibiótica de amplio espectro.

El documento de Patente WO 2006/085838 A describe agentes antimicrobianos macrocíclicos de 18 miembros (Tiacumicinas), composiciones farmacéuticas, y métodos para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente infecciones por *C. difficile*.

El documento de Patente US 3 978 211 A describe lipiarmicina y su preparación.

Arnone *et al.*, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1987, pág. 353-1359 describen la elucidación estructural del antibiótico macrocíclico lipiarmicina.

El documento de Patente US 5 583 115 A describe compuestos de dialquiltiacumicina y métodos de tratamiento de infección bacteriana y colitis mediante la administración de los mismos.

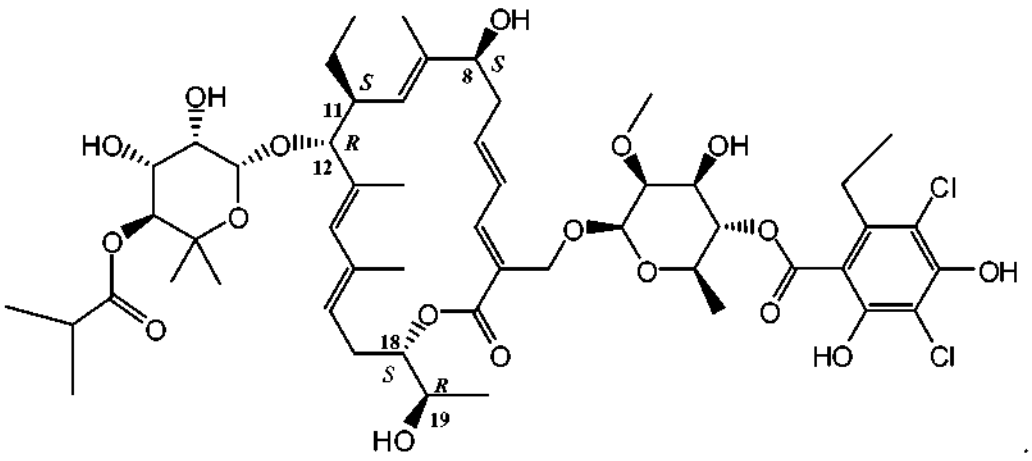
Caira *et al.*, Topics in Current Chemistry, vol. 198, 1998, pág. 163-208 describen el polimorfismo cristalino de compuestos orgánicos.

El documento de Patente WO 2004/014295 A2 describe métodos, procesos y materiales para la producción y la recuperación de tiacumicinas producidas por cultivo de un microorganismo que pertenece a la especie *Dactylosporangium*, subespecie *aurantiacum*.

4. Sumario de la invención

La invención incluye una nueva forma cristalina que es útil en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas e infecciones protozoarias, que exhibe actividad antibiótica de amplio espectro. De ese modo, sorprendentemente, la nueva forma cristalina de la invención actúa como un antibiótico que posee un amplio espectro de actividad en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas e infecciones protozoarias, en especial las asociadas a bacterias grampositivas y gramnegativas y en particular, bacterias grampositivas.

La invención se refiere a la materia objeto de las reivindicaciones. En particular, la invención proporciona un polimorfo cristalino que comprende un compuesto de Fórmula I:



Fórmula I,

caracterizado por un patrón de difracción de rayos X de polvo con al menos picos con ángulos de difracción 2θ de 7,7°, 15,0°, y 18,8° ± 0,2.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el polimorfo cristalino de la invención.

La invención también proporciona la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas en un mamífero.

En otra realización, la invención incluye un polimorfo obtenido a partir de una mezcla de tiacumicinas y un Compuesto de Fórmula I.

En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una mezcla de tiacumicinas y

un Compuesto de Fórmula I.

En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una mezcla de tiacumicinas y Compuesto de Fórmula I.

En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una mezcla de tiacumicinas y al menos aproximadamente un 75 % o más en peso de Compuesto de Fórmula I. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una mezcla de tiacumicinas y al menos aproximadamente un 80 % o más en peso de Compuesto de Fórmula I. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una mezcla de tiacumicinas y al menos aproximadamente un 85 % o más en peso de Compuesto de Fórmula I. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una mezcla de tiacumicinas y al menos aproximadamente un 90 % o más en peso de Compuesto de Fórmula I. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una mezcla de tiacumicinas y al menos aproximadamente un 95 % o más en peso de Compuesto de Fórmula I. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende una mezcla de tiacumicinas y al menos aproximadamente un 99 % o más en peso de Compuesto de Fórmula I.

La invención también incluye el polimorfo de la invención para su uso en métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que incluye, pero no se limita a, infecciones bacterianas e infecciones protozoarias, que comprenden administrar a un sujeto, preferentemente un mamífero, con necesidad de los mismos, una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una composición o formulación de la invención.

En una realización ilustrativa, la composición o formulación comprende una mezcla de compuestos con cantidades variables del Compuesto de Fórmula I. En otra realización, la composición o formulación comprende una mezcla de tiacumicinas y un Compuesto de Fórmula I. En otra realización más, la composición o formulación comprende las nuevas formas cristalinas y amorfas del Compuesto de Fórmula I. En otra realización más, la composición o formulación comprende las nuevas formas cristalinas y amorfas del Compuesto de Fórmula I y una mezcla de tiacumicinas.

En otra realización particular, la enfermedad o trastorno que se trata o previene está causada por cepas productoras de toxinas de *C. difficile*, *Staphylococcus aureus* ("*S. aureus*") incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("MRSA") y C. *perfringens*. En otra realización particular, la enfermedad o trastorno que se trata o previene es diarrea asociada a antibióticos.

5. Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra los patrones de difracción de rayos X de un primer polimorfo del Compuesto de Fórmula I producido a partir de metanol y agua.
La **Figura 2** muestra los patrones de difracción de rayos X de un segundo polimorfo del Compuesto de Fórmula I producido a partir de acetato de etilo.
La **Figura 3** muestra el efecto de la temperatura en una mezcla de tiacumicinas producida a partir de metanol y agua. DSC indica una curva endotérmica que comienza a 169 ºC, y la pérdida de peso comienza a 223 ºC. La curva endotérmica a aproximadamente 177 ºC corresponde a la fusión de un primer polimorfo de un Compuesto de Fórmula I.

6. Descripción detallada de las figuras

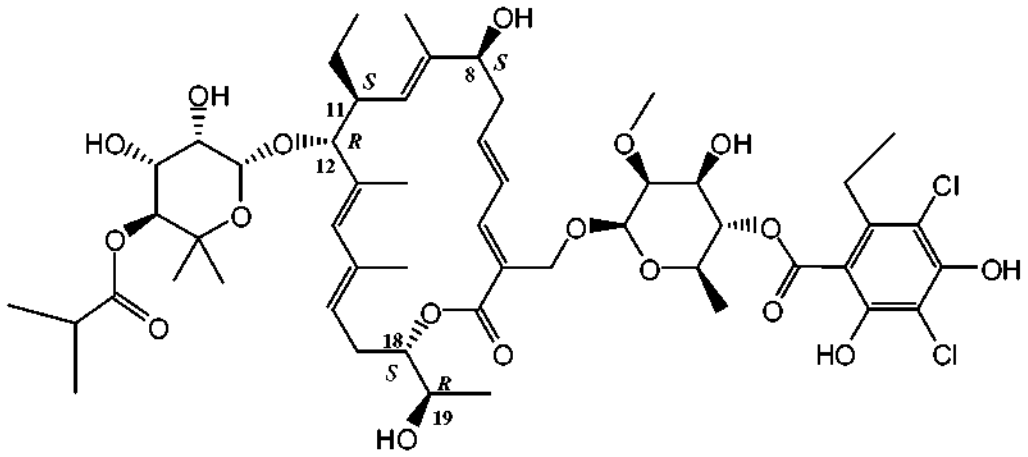
6.1. <u>Descripción general</u>

La divulgación incluye en líneas generales mezclas de compuestos con cantidades variables del Compuesto de Fórmula I. Los presentes inventores han determinado sorprendentemente que la formación de formas polimórficas cristalinas y formas amorfas de un Compuesto de Fórmula I y opcionalmente mezclas de tiacumicina depende de la selección del disolvente de cristalización y del método y las condiciones de cristalización y precipitación.

La invención se refiere a la invención como se define en las reivindicaciones. En otra realización particular, el polimorfo cristalino de la invención se obtiene a partir de una mezcla de tiacumicinas.

En otra realización, un polimorfo cristalino de un Compuesto de Fórmula I exhibe un patrón de difracción de polvo representativo que comprende al menos picos con los siguientes ángulos de difracción 2θ de 7,7°, 15,0°, y 18,8° ± 0,04, preferentemente ± 0,1, más preferentemente ± 0,15, incluso más preferentemente ± 0,2.

El polimorfo de la invención comprende el Compuesto de Fórmula I que tiene la siguiente estructura:



Fórmula I.

En otra realización, el polimorfo de Fórmula I está presente en una cantidad de al menos aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 99,99 %.

En otra realización, el polimorfo de Fórmula I está presente en una cantidad de al menos aproximadamente un 75 %.

En otra realización, el polimorfo de Fórmula I está presente en una cantidad de al menos aproximadamente un 80 %.

En otra realización, el polimorfo de Fórmula I está presente en una cantidad de al menos aproximadamente un 85 %.

En otra realización, el polimorfo de Fórmula I está presente en una cantidad de al menos aproximadamente un 90 %.

En otra realización, el polimorfo de Fórmula I está presente en una cantidad de al menos aproximadamente un 93 %.

En otra realización, el polimorfo de Fórmula I está presente en una cantidad de al menos aproximadamente un 95 %.

En otra realización, el polimorfo de Fórmula está presente en una cantidad de al menos aproximadamente un 99 %.

En otra realización, el polimorfo cristalino se obtiene a partir de una mezcla de tiacumicinas que exhibe un punto de fusión de aproximadamente 163 ºC a aproximadamente 169 ºC. En otra realización, el polimorfo cristalino se obtiene a partir de una mezcla de tiacumicinas que exhibe un punto de fusión de aproximadamente 160 ºC a aproximadamente 170 ºC. En otra realización, el polimorfo cristalino se obtiene a partir de una mezcla de tiacumicinas que exhibe un punto de fusión de aproximadamente 155 ºC a aproximadamente 175 ºC.

En otra realización, el polimorfo cristalino se obtiene a partir de una mezcla de tiacumicinas y exhibe una endoterma de DSC en el intervalo de aproximadamente 174 ºC a aproximadamente 186 ºC; preferentemente 175-185 ºC.

En otra realización, el polimorfo cristalino se obtiene a partir de una mezcla de tiacumicinas que exhibe un patrón de difracción de polvo que comprende al menos picos con los siguientes ángulos de difracción 2θ de 7,7°, 15,0°, y 18,8° ± 0,04, preferentemente ±0,1, más preferentemente ± 0,15, incluso más preferentemente ± 0,2 y exhibe un punto de fusión de aproximadamente 163 ºC a aproximadamente 169 ºC.

En otra realización, el polimorfo cristalino se obtiene a partir de una mezcla de tiacumicinas que exhibe un patrón de difracción de polvo que comprende al menos picos con los siguientes ángulos de difracción 2θ de 7,7°, 15,0°, y 18,8° ± 0,04, preferentemente ±0,1, más preferentemente ± 0,15, incluso más preferentemente ± 0,2 y exhibe un punto de fusión de aproximadamente 160 ºC a aproximadamente 170 ºC.

Otra realización incluye un polimorfo cristalino obtenido a partir de una mezcla de tiacumicinas que exhibe un patrón de difracción de polvo que comprende al menos picos con los siguientes ángulos de difracción 2θ de 7,7°, 15,0°, y 18,8° ± 0,04, preferentemente ± 0,1, más preferentemente ± 0,15, incluso más preferentemente ± 0,2. El polimorfo tiene la estructura química de un Compuesto de Fórmula I. En otra realización, el polimorfo cristalino comprende además al menos un compuesto seleccionado entre una mezcla de tiacumicinas.

En otra realización, un polimorfo cristalino se obtiene a partir de una mezcla de tiacumicinas que exhibe un punto de fusión de aproximadamente 150 ºC a aproximadamente 156 ºC.

Otra realización de la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad

terapéuticamente o profilácticamente eficaz del polimorfo cristalino de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, el polimorfo cristalino de la composición farmacéutica tiene picos con los siguientes ángulos de difracción 2θ de 7,7°, 15,0°, y 18,8° ± 0,04, preferentemente ± 0,1, más preferentemente ± 0,15, incluso más preferentemente ± 0,2.

En otra realización, el polimorfo cristalino de la composición farmacéutica comprende además al menos un compuesto seleccionado entre una mezcla de tiacumicinas.

En otra realización, el Compuesto de Fórmula I está presente de al menos aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 99,99 %, preferentemente aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 95 %, o aproximadamente un 99 %.

En otra realización, el polimorfo cristalino de la composición farmacéutica exhibe un punto de fusión de aproximadamente 163 ºC a aproximadamente 169 ºC.

En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 15 % de una mezcla de tiacumicinas. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 10 % de una mezcla de tiacumicinas. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 7 % de una mezcla de tiacumicinas. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 5 % de una mezcla de tiacumicinas. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 1 % de una mezcla de tiacumicinas. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 15 % de una mezcla de S-Tiacumicina. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 10 % de una mezcla de S-Tiacumicina. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 7 % de una mezcla de S-Tiacumicina. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 5 % de una mezcla de S-Tiacumicina. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 1 % de una mezcla de S-Tiacumicina. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 15 % de una mezcla de Lipiarmicina A4. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 10 % de una mezcla de Lipiarmicina A4. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 7 % de una mezcla de Lipiarmicina A4. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 5 % de una mezcla de Lipiarmicina A4. En otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene R-Tiacumicina estereoquímicamente pura y menos de un 1 % de una mezcla de Lipiarmicina A4.

En otra realización, el polimorfo cristalino de la composición farmacéutica exhibe un punto de fusión de aproximadamente 153 ºC a aproximadamente 156 ºC.

En otra realización, la cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg, preferentemente 0,01, 0,1, 1, 2,5, 5, 10, 20, 50, 100, 250, o 500 mg/kg.

En otra realización, el polimorfo cristalino de la composición farmacéutica es adecuado para administración parenteral, preferentemente administración intravenosa, intramuscular o intraarterial.

En otra realización, el polimorfo cristalino de la composición farmacéutica es adecuado para administración peroral.

Otra realización de la invención incluye el polimorfo de la invención para su uso en un método para tratar una infección bacteriana.

En una realización particular, la infección bacteriana es en el tracto gastrointestinal, en particular AAC o AAD.

6.2. <u>Definiciones</u>

La expresión "afección asociada a antibióticos" se refiere a una afección que resulta cuando una terapia con antibióticos altera el equilibrio de la flora microbiana del intestino, permitiendo que florezcan organismos patógenos tales como cepas productoras de enterotoxinas de *C. difficile*, *S. aureus* y *C. perfringens*. Estos organismos pueden causar diarrea, colitis pseudomembranosa, y colitis y se manifiestan mediante diarrea, incontinencia, calambres abdominales, tenesmo, y fiebre, entre otros síntomas. La diarrea, cuando es grave, causa deshidratación y las complicaciones médicas asociadas a la deshidratación.

La expresión "sustituido asimétricamente" se refiere a una estructura molecular en la que un átomo que tiene cuatro valencias tetraédricas está unido a cuatro átomos o grupos diferentes. Los casos más comunes implican el átomo de carbono. En tales casos, resultan dos isómeros ópticos (enantiómeros D y L o enantiómeros R y S) por átomo de carbono que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Numerosos compuestos tienen más de un átomo de carbono asimétrico. Esto da como resultado la posibilidad de numerosos isómeros ópticos, determinándose el número mediante la fórmula 2^n, donde n es el número de carbonos asimétricos.

El término "caldo", como se usa en el presente documento, se refiere al medio de cultivo fluido que se obtiene durante o después de una fermentación. El caldo comprende una mezcla de agua, el antibiótico o antibióticos deseados, nutrientes sin utilizar, organismos vivos o muertos, productos metabólicos, y el adsorbente con o sin producto adsorbido.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique otra cosa, las expresiones "infección o infecciones bacterianas" e "infección o infecciones protozoarias" se usan de forma intercambiable e incluyen infecciones bacterianas e infecciones protozoarias que se producen en mamíferos, peces y pájaros así como los trastornos relacionados con las infecciones bacterianas y las infecciones protozoarias que se pueden tratar o prevenir mediante antibióticos tales como los Compuestos de la Invención. Tales infecciones bacterianas e infecciones protozoarias, y los trastornos relacionados con tales infecciones, incluyen los siguientes: trastornos asociados al uso de antibióticos, quimioterapias, o terapias antivirales, que incluyen, pero no se limitan a, colitis, por ejemplo, colitis pseudomembranosa, diarrea asociada a antibióticos, e infecciones debidas a *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, especies de *Staphylococcus*, *Staphylococcus* resistente a meticilina, o *Enterococcus* incluyendo enterococos resistentes a vancomicina; diarrea asociada a antibióticos incluyendo las causadas por cepas productoras de toxinas de *C. difficile*, *S. aureus* incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, y *C perfringens;* y colitis asociada a antibióticos; neumonía, otitis media, sinusitis, bronquitis, amigdalitis y mastoiditis relacionadas con infección por *Staphylococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphlococcus aureus*, o *Peptostreptococcus spp.;* faringitis, fiebre reumática y glomerulonefritis relacionadas con infección por *Streptococcus pyogenes*, los estreptococos de los Grupos C y G, *Clostridium diptheriae*, o *Actinobacillus haemolyticum;* infecciones del tracto respiratorio relacionadas con infección por *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, o *Chlamydia pneumoniae;* infecciones de la piel y los tejidos blandos sin complicar, abscesos y osteomielitis, y fiebre puerperal relacionadas con infección por *Staphlococcus aureus*, estafilococos coagulasa positiva (por ejemplo, *S. epidermis* y *S. hemolyticus*), *Staphylococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, grupos C-F de estreptococos (estreptococos de colonias diminutas), *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium minutissimum*, *Clostridium spp.*, o *Bartonella henselae;* infecciones agudas del tracto urinario sin complicar relacionadas con infección por *Staphylococcus saprophyticus* o *Enterococcus spp.;* uretritis y cervicitis; y enfermedades de transmisión sexual relacionadas con infección por *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, o *Neiserria gonorrhea;* enfermedades por toxinas relacionadas con infección por *S. aureus* (envenenamiento alimentario y síndrome del choque tóxico), o los estreptococos de los Grupos A, B y C; úlceras relacionadas con infección por *Helicobacter pylori*, síndromes febriles sistémicos relacionados con infección por *Borrelia recurrentis;* enfermedad de Lyme relacionada con infección por *Borrelia burgdorferi*, conjuntivitis, queratitis, y dacriocistitis relacionadas con infección por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *o Listeria spp.;* enfermedad diseminada del complejo de *Mycobacterium avium* (MAC) relacionada con infección por *Mycobacterium avium*, o *Mycobacterium intracellulare;* gastroenteritis relacionada con infección por *Campylobacter jejuni*, protozoos intestinales relacionados con infección por *Cryptosporidium spp.;* infección odontogénica relacionada con infección por *Streptococcus viridans*; tos persistente relacionada con infección por *Bordetella pertussis;* gangrena gaseosa relacionada con infección por *Clostridium perfringens* o *Bacteroides* spp.*;* y aterosclerosis relacionada con infección por *Helicobacter pylori* o *Chlamydia pneumoniae*. Las infecciones bacterianas e infecciones protozoarias y los trastornos relacionados con tales infecciones que se pueden tratar o prevenir en animales incluyen los siguientes: enfermedad respiratoria bovina relacionada con infección por *P. haem.*, *P. multocida*, *Mycoplasma bovis*, *o Bordetella spp.;* enfermedad entérica de vacas relacionadas con infección por *E. coli* o protozoos (por ejemplo, *Coccidia*, *Cryptosporidia*, etc.); mastitis en vacas lecheras relacionada con infección por *Staph. aureus*, *Strep. uberis*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Klebsiella* spp., *Corynebacterium*, o *Enterococcus* spp.*;* enfermedad respiratoria porcina relacionada con infección por *A. pleuro.*, *P. multocida* o *Mycoplasma spp.;* enfermedad entérica porcina relacionada con infección por *E. coli, Lawsonia intracellularis*, *Salmonella*, o *Serpulina hyodyisinteriae;* gomosis de pie de vacas relacionada con infección por *Fusobacterium* spp.*;* metritis de vacas relacionada con infección por *E. coli;* verrugas peludas de vacas relacionadas con infección por *Fusobacterium necrophorum* o *Bacteroides nodosus;* queratitis de vacas relacionada con infección por *Moraxella bovis;* aborto prematuro en vacas relacionado con infección por protozoos (por ejemplo, *Neosporium*) infección del tracto urinario en perros y gatos relacionada con infección por *E. coli*; infecciones de la piel y los tejidos blandos en perros y gatos relacionadas con infección por *Staph. epidermidis*, *Staph. intermedius*, *Staph.* coagulasa neg., *o P. multocida;* e infecciones dentales o de la boca en perros y gatos relacionadas con infección por *Alcaligenes* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Enterobacter* spp., *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, o *Prevotella*. Se hace referencia a otras infecciones bacterianas e infecciones protozoarias y trastornos relacionados con tales infecciones que se pueden tratar o prevenir de acuerdo con los métodos de la invención en Sanford, J. P., *et al.*, "The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy," 27ª edición (Antimicrobial Therapy, Inc., 1996).

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, el término "aglutinantes" se refiere a agentes que se usan para impartir cualidades cohesivas al material en polvo. Los aglutinantes, o "granuladores", como se conocen en ocasiones, imparten cohesión a la formulación de comprimido, lo que asegura que el comprimido permanezca intacto después de la compresión, así como mejoran las cualidades de flujo libre mediante la formación de gránulos de dureza y tamaño deseados. Los materiales que se usan habitualmente como aglutinantes incluyen almidón; gelatina; azúcares, tales como sacarosa, glucosa, dextrosa, melazas, y lactosa; gomas naturales y sintéticas, tales como goma arábiga, alginato sódico, extracto de musgo de Irlanda, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscaras de ispágula, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, Veegum, celulosa microcristalina, dextrosa microcristalina, amilosa, y arabogalactano de alerce, y similares.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, las expresiones "amida biohidrolizable", "éster biohidrolizable", "carbamato biohidrolizable", "carbonato biohidrolizable", "ureido biohidrolizable", "fosfato biohidrolizable" significan una amida, éster, carbamato, carbonato, ureido, o fosfato, respectivamente, de un compuesto que: 1) no interfiere con la actividad biológica del compuesto pero puede conferir a ese compuesto propiedades ventajosas *in vivo*, tales como captación, duración de acción, o inicio de acción; o 2) es biológicamente inactivo pero se convierte *in vivo* en el compuesto biológicamente activo. Algunos ejemplos de ésteres biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a, ésteres de alquilo inferior, ésteres de aciloxialquilo inferior (tales como ésteres de acetoximetilo, acetoxietilo, aminocarboniloximetilo, pivaloiloximetilo, y pivaloiloxietilo), ésteres de lactonilo (tales como ésteres de ftalidilo y tioftalidilo), ésteres de alcoxiaciloxialquilo inferior (tales como ésteres de metoxicarboniloximetilo, etoxicarboniloxietilo e isopropoxicarboniloxietilo), ésteres de alcoxialquilo, ésteres de colina, y ésteres de acilaminoalquilo (tales como ésteres de acetamidometilo). Algunos ejemplos de amidas biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a, alquil amidas inferiores, amidas de aminoácidos, alcoxiacil amidas, y alquilaminoalquilcarbonil amidas. Algunos ejemplos de carbamatos biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a, alquilaminas inferiores, etilendiaminas sustituidas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas y heteroaromáticas, y poliéter aminas.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, el término "vehículo" significa un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra una composición. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de haba de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, los "diluyentes" son sustancias inertes añadidas para aumentar el volumen de la formulación para hacer que el comprimido tenga un tamaño práctico para la compresión. Algunos diluyentes usados habitualmente incluyen fosfato de calcio, sulfato de calcio, lactosa, caolín, manitol, cloruro sódico, almidón seco, azúcar en polvo, sílice y similares.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, los "desintegradores" o "disgregantes" son sustancias que facilitan la descomposición o disgregación de los comprimidos después de la administración. Los materiales que sirven como disgregantes se han clasificado químicamente como almidones, arcillas, celulosas, alginatos, o gomas. Otros disgregantes incluyen Veegum HV, metilcelulosa, agar, bentonita, celulosa y productos de la madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, ácido algínico, goma de guar, pulpa de cítricos, polivinilpirrolidona reticulada, carboximetilcelulosa, y similares.

Cuando se administran a un sujeto (por ejemplo, a un animal para uso veterinario o a un ser humano para uso clínico), los compuestos de la invención se administran de forma aislada. Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, "aislado" significa que los compuestos de la invención se separan de otros componentes de (a) una fuente natural, tal como una planta o célula, preferentemente cultivo bacteriano, o (b) una mezcla de reacción química orgánica sintética, preferentemente, mediante técnicas convencionales, los compuestos de la invención se purifican. Como se usa en el presente documento, "purificado" significa que, cuando se aísla, el aislado contiene al menos aproximadamente un 70 % preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %, y lo más preferentemente al menos aproximadamente un 99 % de un compuesto de la invención en peso del aislado.

El término "macrólido" o "macrociclo" se refiere a moléculas orgánicas con grandes estructuras anulares que contienen habitualmente más de 10 átomos.

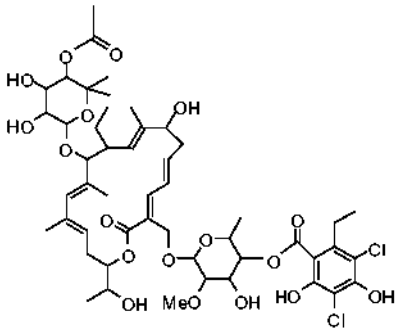
La expresión "macrociclos de 18 miembros" se refiere a moléculas orgánicas con estructuras anulares que contienen 18 átomos.

El término "MIC" o la expresión "concentración inhibidora mínima" se refiere a la concentración más baja de un antibiótico que es necesaria para inhibir el crecimiento de un aislado bacteriano *in vitro*. Un método habitual para determinar la MIC de un antibiótico es preparar varios tubos que contienen diluciones seriadas del antibiótico, que a continuación se inocularon en el aislado bacteriano de interés. La MIC de un antibiótico se puede determinar a partir del tubo con la menor concentración que no muestra ninguna turbidez (ningún crecimiento).

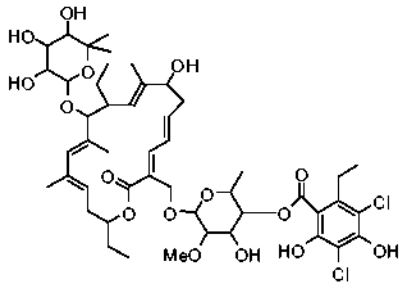
El término "MIC50" se refiere a la concentración más baja de un antibiótico requerida para inhibir el crecimiento de un 50 % de las cepas bacterianas que se someten a ensayo dentro de una especie bacteriana dada.

El término "MIC90" se refiere a la concentración más baja de un antibiótico requerida para inhibir el crecimiento de un 90 % de las cepas bacterianas que se someten a ensayo dentro de una especie bacteriana dada.

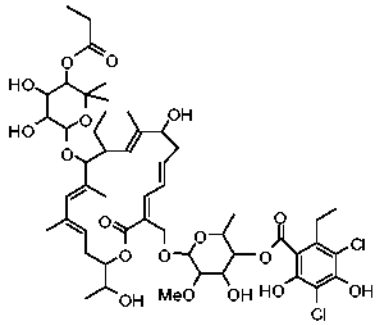
Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, la expresión "mezcla de tiacumicinas" se refiere a una composición que contiene al menos un compuesto macrólido de la familia de los compuestos conocidos como tiacumicinas. En otra realización, la expresión "mezcla de tiacumicinas" incluye una mezcla que contiene al menos un miembro de los compuestos conocidos como tiacumicinas y un Compuesto de Fórmula I, en la que el Compuesto de Fórmula I está presente en una cantidad de aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, o un 99,99 % en peso. En particular, la expresión "mezcla de tiacumicinas" se refiere a composiciones que comprenden un Compuesto de Fórmula I, en las que el Compuesto de Fórmula I tiene una proporción de tiempo de retención relativo ("RTT") de 1,0, y que comprende además al menos uno de los siguientes compuestos:



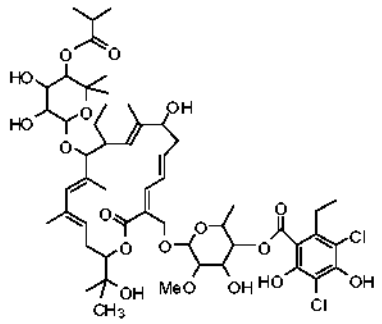
Compuesto 101, proporción RRT 0,71



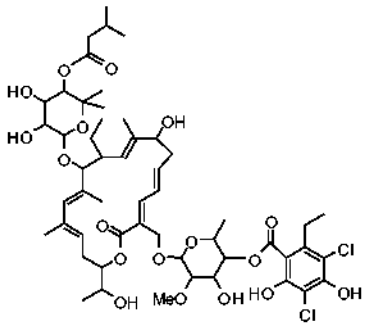
Compuesto 102, proporción RRT 0,81



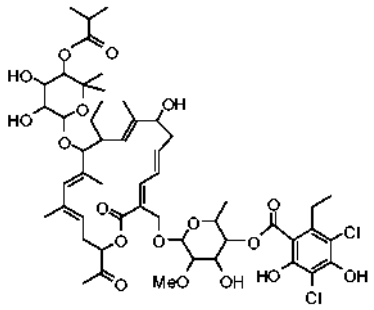
Compuesto 103, proporción RRT 0,84



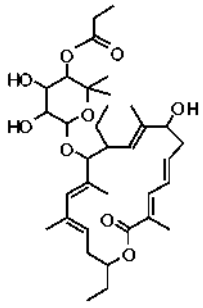
Compuesto 104, proporción RRT 1,13



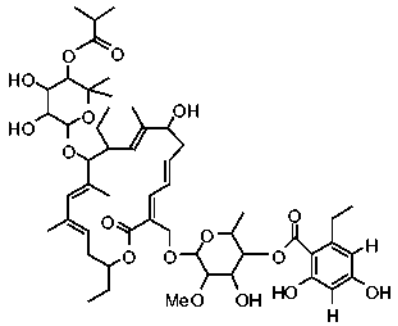
Compuesto 105, proporción RRT 1,19



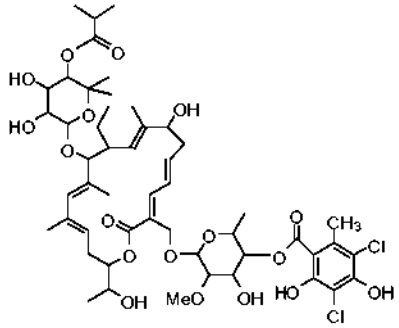
Compuesto 106, proporción RRT 1,24



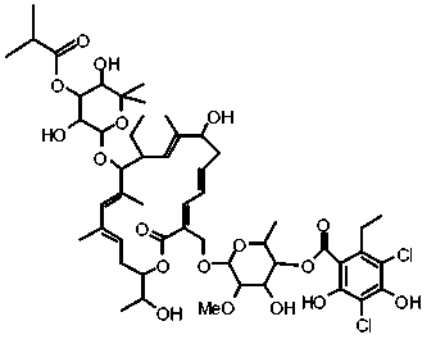
Compuesto 107, proporción RRT 1,39



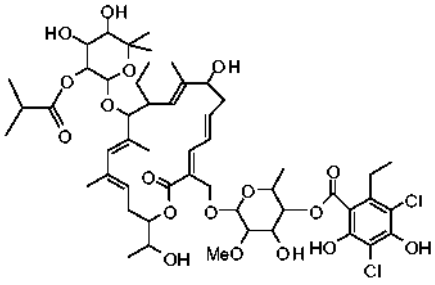
Compuesto 108, proporción RRT 1,48



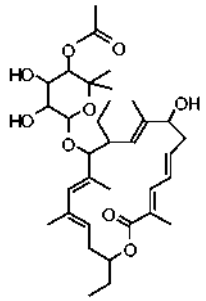
Compuesto 109, proporción RTT 0,89



Compuesto 110, proporción RTT 0,92



Compuesto 111, proporción RTT 0,95



Compuesto 112, proporción RTT 1,10

En ciertas realizaciones ilustrativas, cuando está presente el compuesto 109 en la mezcla, opcionalmente uno de los compuestos 110, 111, y/o 112 también está presente en la mezcla. El compuesto 109 también se denomina en ocasiones Lipiarmicina A4. El compuesto 110 también se denomina en ocasiones Tiacumicina F. El compuesto 111 también se denomina en ocasiones Tiacumicina C. El compuesto 112 también se denominan ocasiones Tiacumicina A.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, las expresiones "ópticamente puro", "estereoméricamente puro", y "básicamente estereoméricamente puro" se usan de forma intercambiable y significan un estereoisómero de un compuesto o una composición que comprende un estereoisómero de un compuesto y está básicamente exento de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por ejemplo, un compuesto o composición estereoméricamente puro de un compuesto que tiene un centro quiral estará básicamente exento del enantiómero opuesto del compuesto. Un compuesto o composición estereoméricamente puro de un compuesto que tiene dos centros quirales estará básicamente exento de otros diastereómeros del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro comprende más de aproximadamente un 80 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente un 20 % en peso de otros estereoisómeros del compuesto, más preferentemente más de aproximadamente un 90 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente un 10 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, incluso más preferentemente más de aproximadamente un 95 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente un 5 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, y lo más preferentemente más de aproximadamente un 97 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente un 3 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a materiales y composiciones que son fisiológicamente tolerables y por lo general no producen ninguna reacción alérgica o adversa similar, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Por lo general, como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, la expresión "hidrato farmacéuticamente aceptable" significa un Compuesto de la Invención que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida mediante fuerzas intermoleculares no covalentes.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, la expresión "profármaco farmacéuticamente aceptable" significa un derivado de un polimorfo modificado de un compuesto de Fórmula I que se puede hidrolizar, oxidar, o puede reaccionar de otro modo en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar el compuesto. Algunos ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, compuestos que comprenden restos biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, y análogos de fosfato biohidrolizables. Otros ejemplos de profármacos incluyen compuestos que comprenden oligonucleótidos, péptidos, lípidos, grupos alifáticos y aromáticos o restos NO, NO_2, ONO, y ONO_2. Por lo general, los profármacos se pueden preparar usando métodos bien conocidos, tales como los que se describen en Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 172 178, 949 982 (Manfred E. Wolff ed., 5ª ed. 1995), y Design of Prodrugs (H. Bundgaard ed., Elselvier, Nueva York 1985).

La expresión "sal o sales farmacéuticamente aceptables", como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en los compuestos que se usan en las presentes composiciones. Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza básica son capaces de formar una amplia diversidad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que se pueden usar para preparar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de tales compuestos básicos son los que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables que incluyen, pero no se limitan a, sulfúrico, cítrico, maleico, acético, oxálico, sales de clorhidrato,

bromhidrato, yodhidrato, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenesulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que incluyen un resto amino pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con diversos aminoácidos, además de los ácidos mencionados anteriormente. Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza ácida son capaces de formar sales de bases con diversos cationes farmacológicamente aceptables. Algunos ejemplos de tales sales incluyen sales de metal alcalino o metal alcalinotérreo y, en particular, sales de calcio, magnesio, sodio, litio, cinc, potasio, e hierro.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, la expresión "profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un Compuesto o una Composición de la Invención o a una sal, solvato, polimorfo, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo que causa una reducción del riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno dado. Por lo tanto, los Compuestos de la Invención se pueden usar para la prevención de una enfermedad o trastorno y tratar simultáneamente otra (por ejemplo, prevención de AAC, mientras que se trata AAD urinaria). En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se administran a un paciente, preferentemente un ser humano, como medida preventiva frente a tales enfermedades. Como se usa en el presente documento, "prevención" o "prevenir" se refiere a una reducción del riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno dado.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano o un animal. El sujeto que se trata es un paciente con necesidad de tratamiento.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de un Compuesto o Composición de la Invención o una sal, solvato, polimorfo, o profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo se mide mediante la eficacia terapéutica de un compuesto de la invención, en la que se mejora o alivia al menos un efecto adverso de un trastorno. En una realización, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un fármaco o un Compuesto de la Invención que es suficiente para proporcionar el efecto y el rendimiento local o sistémico deseados con una relación beneficio/riesgo razonable que acompaña a cualquier tratamiento médico. En una realización, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición de la invención se mide mediante la eficacia terapéutica de un compuesto de la invención para aliviar al menos un síntoma asociado a infecciones bacterianas o protozoarias. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que las cantidades terapéuticamente eficaces de los compuestos de la invención son útiles en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas y protozoarias.

Como se usa en el presente documento y a menos que se indique de otro modo, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a una mejora de una enfermedad o trastorno, o al menos un síntoma discernible de los mismos, preferentemente asociado a una infección bacteriana o protozoaria. En otra realización, "tratamiento" o "tratar" se refiere a una mejora de al menos un parámetro físico medible, no necesariamente discernible por parte del paciente. En otra realización más, "tratamiento" o "tratar" se refiere a inhibir el progreso de una enfermedad o trastorno, ya sea físicamente, por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible, fisiológicamente, por ejemplo, estabilización de un parámetro físico, o ambos. En otra realización más, "tratamiento" o "tratar" se refiere a retrasar el inicio de una enfermedad o trastorno.

6.3. <u>Composiciones de la invención para administración terapéutica/profiláctica</u>

La invención incluye una composición antibiótica que es una mezcla de tiacumicinas para su uso en el tratamiento de CD AD, así como AAD y AAC. La mezcla de tiacumicinas contiene de aproximadamente un 76 a aproximadamente un 100 % de un Compuesto de Fórmula I, que pertenece a la familia de las tiacumicinas de macrólidos de 18 miembros.

Debido a la actividad de los Compuestos de la Invención, los compuestos son útiles de forma ventajosa en medicina veterinaria y humana. Los Compuestos de la Invención son útiles para el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas y protozoarias. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una infección pero no exhibe ni manifiesta ningún síntoma fisiológico asociado a una infección.

El polimorfo y las composiciones de la invención se pueden usar en métodos de tratamiento y profilaxis por administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención. El paciente es un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un animal tal como una vaca, caballo, oveja, cerdo, gallina, pavo, codorniz, gato, perro, ratón, rata, conejo, cobaya, etc., y es más preferentemente un ser humano.

La administración puede ser mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, administración peroral, administración parenteral, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otro agente biológicamente activo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de suministro, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y se pueden

usar para administrar un compuesto de la invención. En ciertas realizaciones, se administra más de un Compuesto de la Invención y una mezcla de tiacumicinas a un paciente. Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a, administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación, o tópica, en particular a los oídos, nariz, ojos, o la piel. El modo preferente de administración se deja a discreción del médico practicante, y dependerá en parte del sitio de la afección médica. En la mayoría de los casos, la administración dará como resultado la liberación del polimorfo cristalino de la Invención en la corriente sanguínea.

Puede ser deseable la administración local al área con necesidad de tratamiento. Esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje de heridas después de cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas, o fibras, sialásticas. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o el sitio anterior) de un tejido de placa aterosclerótica.

También se puede emplear administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de formación de aerosol, o a través de perfusión en un tensioactivo pulmonar de fluorocarbono o sintético. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención se pueden formular en forma de un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos.

En otra realización, el polimorfo cristalino de la Invención se puede suministrar en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat *et al.*, en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pág. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, en el mismo lugar, pág. 317-327; véase generalmente en el mismo lugar).

En otra realización más, los compuestos de la invención se pueden suministrar en un sistema de liberación controlado. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, citado anteriormente*;* Sefton, 1987, *CRC Crit*. *Ref*. *Biomed*. *Eng*. 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507 Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability*, *Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J. *Macromol. Sci. Rev*. *Macromol*. *Chem*. 23:61; véase también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann*. *Neurol*. 25:351; Howard *et al.*, 1989, J. *Neurosurg*. 71:105). En otra realización más, se puede situar un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana de los compuestos de la invención, por ejemplo, el hígado, requiriendo de ese modo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, pág. 115-138 (1984)). Se pueden usar otros sistemas de liberación controlada que se discuten en la revisión de Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Las presentes composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del polimorfo cristalino de la invención, opcionalmente más de una forma polimorfa cristalina o amorfa de un Compuesto de la Invención, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de un vehículo farmacéuticamente aceptable de un modo tal que se proporcione la forma para administración apropiada al paciente.

En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra un compuesto de la invención. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de haba de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Cuando se administran a un paciente, las composiciones de la invención y los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferentemente estériles. El agua es un vehículo preferente cuando el compuesto de la invención se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Si se desea, las presentes composiciones también pueden contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulgentes, o agentes para el tamponamiento de pH.

Las presentes composiciones también pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, microgránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada de uso. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable está en una cápsula (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.698.155). Otros ejemplos de vehículos

farmacéuticamente adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de A.R. Gennaro.

En una realización preferente, el polimorfo cristalino de la invención se formula de acuerdo con procedimientos de rutina en forma de una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Por lo general, un polimorfo cristalino de la Invención para administración intravenosa está en una solución en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden incluir opcionalmente un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan conjuntamente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o un sobrecito que indica la cantidad del agente activo. Cuando el polimorfo cristalino de la Invención es para administración mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el compuesto de la invención se administra mediante inyección. Se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de un modo tal que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Es preferente que las composiciones de la invención se administren por vía oral. Las composiciones para el suministro oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes, o elixires, por ejemplo. Los compuestos que se administran por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes aromatizantes tales como menta, aceite de gaultería, o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente sabrosa. Además, cuando se encuentran en forma de comprimido o píldora, las composiciones se pueden revestir para disgregación retrasada y absorción en el tracto gastrointestinal proporcionando de ese modo una acción sostenida durante un periodo prolongado de tiempo. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto impulsor osmóticamente activo también son adecuadas para que se administre por vía oral el polimorfo cristalino de la Invención. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea la cápsula se embebe por parte del compuesto impulsor, que se hincha para desplazar el agente o la composición de agente a través de una abertura. Estas plataformas de suministro pueden proporcionar un perfil de suministro de orden básicamente cero a diferencia de los perfiles de pico de las formulaciones de liberación inmediata. También se puede usar un material de retraso temporal tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol. Las composiciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Tales vehículos son preferentemente de calidad farmacéutica.

La cantidad del polimorfo cristalino de la Invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular que se desvela en el presente documento dependerá de la naturaleza del trastorno o la afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa que se emplea en las composiciones también dependerá de la ruta de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debería decidir de acuerdo con el juicio del médico practicante y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para administración oral son generalmente aproximadamente de 0,001 miligramos a 1000 miligramos de un compuesto de la invención por kilogramo de peso corporal. En realizaciones preferentes específicas de la invención, la dosis oral es de 0,01 miligramos a 500 miligramos por kilogramo de peso corporal, más preferentemente de 0,1 miligramos a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal, más preferentemente de 0,5 miligramos a 50 miligramos por kilogramo de peso corporal, y aún más preferentemente de 1 miligramo a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal. En la realización más preferente, la dosis oral es 1 miligramo de la forma cristalina de la Invención por kilogramo de peso corporal. Las cantidades de dosificación que se describen en el presente documento se refieren a cantidades totales administradas; es decir, si se administra más de un compuesto de la invención, las dosificaciones preferentes corresponden a la cantidad total de los compuestos de la invención administrados. Las composiciones orales contienen preferentemente de un 10 % a un 95 % de principio activo en peso.

Los intervalos de dosificación adecuados para administración intravenosa (i.v.) son de 0,001 miligramos a 1000 miligramos por kilogramo de peso corporal, de 0,1 miligramos a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal, y de 1 miligramo a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación adecuados para administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Los supositorios contienen generalmente de 0,01 miligramos a 50 miligramos de un compuesto de la invención por kilogramo de peso corporal y comprenden el principio activo en un intervalo de un 0,5 % a un 10 % en peso. Las dosificaciones recomendadas para administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, epidural, sublingual, intracerebral, intravaginal, transdérmica o administración por inhalación están en el intervalo de 0,001 miligramos a 1000 miligramos por kilogramo de peso corporal. Las dosificaciones adecuadas de los compuestos de la invención para administración tópica están en el intervalo de 0,001 miligramos a 1 miligramo, dependiendo del área a la que se administra el compuesto. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de curvas de dosis-respuesta obtenidas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales. Tales modelos animales y sistemas se conocen bien en la técnica.

La invención también proporciona envases o kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenos con una o más polimorfos cristalinos o formas amorfas de un Compuesto de la Invención. Opcionalmente asociado a tal recipiente o recipientes puede haber una advertencia en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, advertencia que refleja la aprobación por parte de la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. En cierta realización, el kit contiene más de un polimorfo cristalino o forma amorfa de un Compuesto de la Invención.

El polimorfo cristalino de la invención se somete a ensayo preferentemente *in vitro* e *in vivo*, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* se pueden usar para determinar si la administración de un compuesto específico de la invención o una combinación de compuestos de la invención es preferente para disminuir la síntesis de ácidos grasos. También se puede demostrar que los compuestos de la invención son eficaces y seguros usando sistemas de modelos animales.

Los expertos en la materia conocerán otros métodos y están dentro del ámbito de la invención.

6.4. Síntesis general de los compuestos de la invención

Los macrociclos de 18 miembros y los análogos de los mismos se producen por fermentación. El cultivo de *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie *hamdenensis* AB 718C-41 NRRL 18085 se lleva a cabo en un medio que contiene fuentes de carbono, sales inorgánicas y otros ingredientes orgánicos con uno o más absorbentes en condiciones de aireación apropiadas y mezcla en un entorno estéril.

Se identificó que el microorganismo que produce los agentes antibacterianos activos pertenece a la familia *Actinoplanaceae*, género *Dactylosporangium* (*J. Antibiotics*, 1987, 40: 567-574 y documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.918.174). Se ha denominado *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie *hamdenensis* 718C-41. El subcultivo se obtuvo de la Colección de Cultivos de Patente ARS del Centro de Investigación Regional Septentrional, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, 1815 North University Street, Peoria, IL. 61604, EE. UU., donde se asignó el número de acceso NRRL 18085. Las características de la cepa AB 718C-41 se dan en *The Journal of Antibiotics*, 1987, 40: 567-574 y el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.918.174.

La presente divulgación incluye la composición de los nuevos agentes antibióticos, Tiacumicinas, por fermentación aerobia sumergida del microorganismo *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie *hamdenensis*. El método de producción se desvela en el documento de Patente WO 2004/014295 A2.

7. Ejemplos

La invención se refiere al polimorfo cristalino de la reivindicación 1, a composiciones farmacéuticas que comprenden ese polimorfo cristalino, y al uso de estas composiciones farmacéuticas en tratamiento. Se proporcionan ejemplos que van más allá del ámbito de las reivindicaciones únicamente a modo de referencia.

7.1. Preparación de las mezclas de tiacumicinas en bruto y posterior cristalización de ciertos polimorfos de las mezclas

En una realización ilustrativa, se prepara una mezcla de tiacumicinas que contiene el Compuesto de Fórmula I mediante un proceso que comprende:

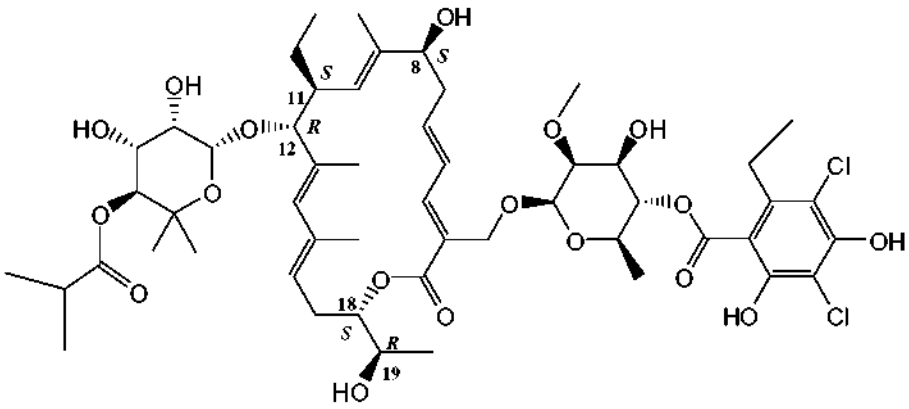
(i) cultivar un microorganismo en un medio de nutrientes para acumular la mezcla en el medio de nutrientes; y
(ii) aislar la mezcla del medio de nutrientes; en el que el medio de nutrientes comprende un adsorbente para adsorber la mezcla.

El medio de nutrientes comprende preferentemente de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 15 % del adsorbente en peso. El absorbente es preferentemente una resina adsorbente. Más preferentemente, la resina adsorbente es Amberlite®, XAD16, XAD16HP, XAD2, XAD7HP, XAD1180, XAD1600, IRC50, o Duolite® XAD761. El microorganismo es preferentemente *Dactylosporangium aurantiacum* subespecie *hamdenensis*. El medio de nutrientes comprende la siguiente combinación basada en peso: de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 10 % de glucosa, de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,5 % de K_2HPO_4, de aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,5 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,3 % de KCl, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 % de $CaCO_3$, de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 2 % de casaminoácidos, de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 2 % de extracto de levadura, y de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 15 % de resina XAD-16. La etapa de cultivo se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de aproximadamente 25 ºC a aproximadamente 35 ºC y a un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0.

Después de la finalización de la fermentación, la masa sólida (incluyendo la resina adsorbente) se separa del caldo por tamizado. La masa sólida se eluye con disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, acetato de etilo y a continuación se concentra a presión reducida.

7.2. Estructura de R-Tiacumicina B

La estructura de la R-Tiacumicina B (el componente más activo principal) se muestra a continuación en la Fórmula I. La estructura cristalina por rayos X de la R-Tiacumicina B se obtuvo como un cristal incoloro con forma de paralelepípedo (0,08 x 0,14 x 0,22 mm) que creció en metanol acuoso. Esta estructura rayos X confirma la estructura que se muestra a continuación. El nombre químico oficial es 3-[[[6-desoxi-4-*O*-(3,5-dicloro-2-etil-4,6-dihidroxibenzoil)-2-*O*-metil-P-D-manopiranosil]oxi]-metil]-12(*R*)-[[6-desoxi-5-C-metil-4-*O*-(2-metil-1-oxopropil)-β-D-lixo-hexopiranosil]oxi]-11(*S*)-etil-8(*S*)-hidroxi-18(*S*)-(1(*R*)-hidroxietil)-9,13,15-trimetiloxaciclooctadeca-3,5,9,13,15-pentaeno-2-ona.



7.2.1 Datos analíticos de R-Tiacumicina B

Datos analíticos de R-Tiacumicina B (que es casi por completo (es decir, > 90 %) R-Tiacumicina B).
Pf 166 - 169 ºC (aguja de color blanco a partir de isopropanol);
$[\alpha]_D^{20}$ -6,9 (c 2,0, MeOH);
MS *m/z* (ESI) 1079,7 $(M + Na)^+$;
RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 7,21 (d, 1H), 6,59 (dd, 1H), 5,95 (ddd, 1H), 5,83 (s a, 1H), 5,57 (t, 1H), 5,13 (d a, 1H), 5,09 (t, 1H), 5,02 (d, 1H), 4,71 (m, 1H), 4,71 (s a, 1H), 4,64 (s a, 1H), 4,61 (d, 1H), 4,42 (d, 1H), 4,23 (m, 1H), 4,02 (quintuplete, 1H), 3,92 (dd, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,70 (d, 1H), 3,56 (s, 3H), 3,52-3,56 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,64-2,76 (m, 3H), 2,59 (septuplete, 1H), 2,49 (ddd, 1H), 2,42 (ddd, 1H), 2,01 (dc, 1H), 1,81 (s, 3H), 1,76 (s, 3H), 1,65 (s, 3H), 1,35 (d, 3H), 1,29 (m, 1H), 1,20 (t, 3H), 1,19 (d, 3 H), 1,17 (d, 3H), 1,16 (d, 3 H), 1,14 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 0,87 (t, 3H);

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) 8 178,4, 169,7, 169,1, 154,6, 153,9, 146,2, 143,7, 141,9, 137,1, 137,0, 136,4, 134,6, 128,5, 126,9, 125,6, 124,6, 114,8, 112,8, 108,8, 102,3, 97,2, 94,3, 82,5, 78,6, 76,9, 75,9, 74,5, 73,5, 73,2, 72,8, 71,6, 70,5, 68,3, 63,9, 62,2, 42,5, 37,2, 35,4, 28,7, 28,3, 26,9, 26,4, 20,3, 19,6, 19,2, 18,7, 18,2, 17,6, 15,5, 14,6, 14,0, 11,4.

7.3. Preparación de un primer polimorfo de R-Tiacumicina B

Otra realización ilustrativa de la invención comprende un proceso para producir un polimorfo de un Compuesto de Fórmula I a partir de una mezcla de tiacumicinas que comprende las etapas de:

a) disolver una mezcla en bruto de tiacumicinas que contiene de aproximadamente un 76 % a aproximadamente un 100 % de un Compuesto de Fórmula I en una cantidad mínima de una solución que comprende metanol, agua, acetonitrilo, ácido acético, o alcohol isopropílico o las mezclas de los mismos;
b) permitir que la solución de a) se evapore mientras se mantiene a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 22 ºC) durante 3 a 7 días para precipitar un primer polimorfo de un Compuesto de Fórmula I; y
c) separar el polimorfo de la solución mediante técnicas conocidas en la técnica.

7.3.1. Ejemplo ilustrativo 1 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina B

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, el material en bruto se purificó por cromatografía en fase inversa utilizando un sistema Biotage Flash 75L que contenía una columna de sílice de 1,2 kg Biotage KP-C18-HS, eluyendo con MeOH/H_2O/AcOH 70:30:1. Las fracciones recogidas que contenían un 75-80 % de Compuesto de Fórmula I se combinaron y se concentraron hasta una tercera parte del volumen original para producir un precipitado. El precipitado se filtra y se lava con agua. El sólido se secó a alto

vacío para proporcionar un polvo de color blanquecino. El análisis por HPLC mostró que el polvo contiene aproximadamente un 78 % de Compuesto de Fórmula I como producto principal y una mezcla de tiacumicinas como el componente minoritario.

La mezcla de tiacumicinas que contenía aproximadamente un 78 % de Compuesto de Fórmula I (es decir, 50 mg) se disolvió en 2 ml de metanol seguido de la adición de 1 ml de agua. Se permitió que la solución se evaporara, mientras se mantenía a temperatura ambiente durante 7 días para producir un precipitado cristalino. El cristal se separa de la solución por filtración. Después de recristalización en metanol/agua, los cristales contienen aproximadamente un 90 % de Compuesto de Fórmula I basado en HPLC.

7.3.2. Ejemplo ilustrativo 2 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, el material en bruto se purificó por cromatografía en fase inversa utilizando un sistema Biotage Flash 150 que contenía una columna de 3,75 kg de sílice Biotage KP-C18-HS, eluyendo con MeOH/H_2O/AcOH 52:48:1. Las fracciones recogidas que contenían aproximadamente un 80-88 % de Compuesto de Fórmula I se combinaron y se concentraron hasta una tercera parte del volumen original para producir un precipitado. El precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido se secó a alto vacío. El análisis por HPLC mostró que el polvo contiene un 85,4 % de Compuesto de Fórmula I como producto mayoritario y una mezcla de tiacumicinas como producto minoritario.

La mezcla que contiene aproximadamente un 85 % de Compuesto de Fórmula I (es decir, 1000 mg) se disolvió en 20 ml de una mezcla de metanol y agua con proporciones 1:1 de metanol con respecto a agua. Se permitió que la mezcla se evaporara/reposara a temperatura ambiente durante 3 días para producir un precipitado cristalino de polimorfo. El cristal se separó de la solución por filtración.

La composición obtenida es una mezcla que contiene un primer polimorfo de un Compuesto de Fórmula I, y al menos uno de los compuestos de tiacumicina basado en análisis por HPLC. La composición tiene un punto de fusión de 165-169 ºC.

7.3.3. Ejemplo ilustrativo 3 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, el material en bruto se purificó por cromatografía en fase inversa utilizando un sistema Biotage Flash 75L que contenía una columna de 1,2 kg de sílice Biotage KP-C18-HS, eluyendo con MeOH/H_2O/AcOH de 67:33:4 a 70:30:1. Las fracciones recogidas que contenían > 90 % de Compuesto de Fórmula I se combinaron y se concentraron hasta una tercera parte del volumen. El precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido se secó a alto vacío. El análisis por HPLC mostró que el polvo contiene un 94,0 % de Compuesto de Fórmula I.

El sólido se sometió a ensayo por difracción de rayos X (XRD) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) (véanse las Figuras 2 y 4). La difracción de rayos X del sólido muestra picos a ángulos 2θ de 7,7°, 15,0°, y 18,8° ± 0,1 que indica que el sólido es la forma de un primer polimorfo de un Compuesto de Fórmula I. El diagrama de DSC muestra una curva endotérmica que comienza a aproximadamente 169 ºC y muestra un pico a 177 ºC.

7.3.4. Ejemplo ilustrativo 4 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, el material en bruto se purificó por cromatografía en fase inversa utilizando un sistema Biotage Flash 75L que contenía una columna de 1,2 kg de sílice Biotage KP-C18-HS, eluyendo con MeOH/H_2O/AcOH 52:48:1. Las fracciones recogidas que contenían > 90 % de Compuesto de Fórmula I se combinaron, se añadió un tercio del volumen de agua y se dejaron a temperatura ambiente durante una noche. El precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido se secó a alto vacío. El análisis por HPLC mostró que el polvo contiene un 94,7 % de Compuesto de Fórmula I.

El polvo que contiene un 94,7 % de Compuesto de Fórmula I (es decir, 98 mg) se disolvió en 3 ml de metanol y a continuación se añadió 1 ml de agua. Se permitió que la mezcla se evaporara y reposara a temperatura ambiente durante 7 días para producir un precipitado cristalino. Los cristales se separaron de la solución por filtración y se lavaron con metanol/agua 3:1. Los cristales se analizaron por difracción de rayos X.

La composición del precipitado es una mezcla que comprende un Compuesto de Fórmula I basado en análisis por HPLC con un punto de fusión de 166-169 ºC.

7.3.5. Ejemplo ilustrativo 5 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, la mezcla se purificó en una columna, y se disolvieron 0,06 g de una mezcla de tiacumicinas en 16 ml de metanol y 4 ml de agua en un vial de 20 ml. El vial se cubre con Parafilm, y se perforan pequeños orificios través del mismo. El vial cubierto se sitúa en un desecador y se almacena a temperatura ambiente durante diez días. A continuación, se retira la cubierta de

Parafilm, y el vial se devuelve al desecador. El material cristalino se produce de tres a cinco días después de que se retire el Parafilm. El material cristalino se lava con una solución de metanol y agua y el Compuesto de Fórmula I se aisló con un 75,6 %.

El patrón de difracción de rayos X de polvo del material cristalino se muestra en la Figura 3 e incluyó 2θ de 7,7°, 15,0°, y 18,0°.

7.3.6. Ejemplo ilustrativo 6 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Preparación de un polimorfo a partir de isopropanol

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, el material en bruto se purificó por cromatografía en fase inversa utilizando un sistema Biotage Flash 150 que contenía una columna de 3,75 kg de sílice Biotage KP-C18-HS, eluyendo con EtOH/H_2O/AcOH 52:48:1. Las fracciones recogidas que contenían un 80-88 % de Compuesto de Fórmula I se combinaron y se concentraron hasta una tercera parte del volumen original para producir un precipitado. El precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido se secó a alto vacío. El análisis por HPLC mostró que el polvo contiene un 85,4 % de Compuesto de Fórmula I.

El polvo que contenía un 85,4 % de Compuesto de Fórmula I (es decir, 2000 mg) se disolvió en 900 ml de isopropanol. La solución se calentó para aumentar la solubilidad y a continuación se filtró para retirar los materiales insolubles. Se permitió que la solución transparente se evaporara/reposara a temperatura ambiente durante 14 días para producir un precipitado cristalino. El cristal se separa de la solución por filtración.

La composición del precipitado es una mezcla que comprende el Compuesto de Fórmula I y al menos una de otras sustancias relacionadas basada en análisis por HPLC con un Pf de 163-165 ºC.

La difracción de rayos X del precipitado muestra picos con ángulos 2θ de 7,6° y 15,4°.

7.3.7. Ejemplo ilustrativo 7 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, y purificación en columna, se disolvió una mezcla de Compuesto de Fórmula I, > 90 %, 15 g) en una cantidad mínima de metanol (de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 30 ml), y la solución se trituró con isopropanol (~100 ml) para producir un polimorfo. El sólido se separa de la solución por filtración con un punto de fusión de 165-168 ºC.

El diagrama de XRD muestra un patrón de polimorfo distinto que comprende valores de 2 theta de 7,5°, 15,2°, 15,7°, 18,6° 18,7°.

7.3.8. Ejemplo ilustrativo 5 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Preparación de un polimorfo a partir de acetonitrilo

La mezcla de tiacumicinas obtenida como se ha descrito anteriormente y (85,44 % de Compuesto de Fórmula I, 1000 mg) se disolvió en 30 ml de acetonitrilo. Se permitió que la mezcla se evaporara y reposara a temperatura ambiente durante 12 días para producir un precipitado cristalino. El cristal se separa de la solución por filtración, y exhibe un punto de fusión de 165-169 ºC.

El diagrama de XRD de este cristal muestra el patrón de un polimorfo que comprende valores de 2 theta de 7,8°, 15,1°, 18,8°.

7.4. Preparación de otros polimorfos de R-Tiacumicina

También se desvela un proceso para producir un polimorfo de un Compuesto de Fórmula I que comprende las etapas de:

a) disolver una mezcla en bruto de tiacumicinas que contiene de aproximadamente un 78 a aproximadamente un 100 % de un Compuesto de Fórmula I en una cantidad mínima de acetato de etilo;
b) permitir que la solución se evapore y repose a temperatura ambiente de 3 a 7 días para precipitar un polimorfo; y
c) separar el polimorfo de la solución.

7.4.1. Ejemplo ilustrativo 1 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Preparación de un polimorfo a partir de acetato de etilo

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, el material en bruto se purificó por cromatografía en fase inversa utilizando un sistema Biotage Flash 150 que contenía una columna de

3,75 kg de sílice Biotage KP-C18-HS, eluyendo con EtOH/H_2O/AcOH 52:48:1. Las fracciones recogidas que contenían un 70-88 % de Compuesto de Fórmula I se combinaron y se concentraron hasta una tercera parte del volumen para producir un precipitado. El precipitado se filtra y se lava con agua. El sólido se secó a alto vacío. El análisis por HPLC mostró que el polvo contiene un 85,4 % de Compuesto de Fórmula I.

Esta mezcla en bruto de tiacumicinas (1000 mg) se disolvió a continuación en 30 ml de acetato de etilo. Se permitió que la mezcla se evaporara y reposara a temperatura ambiente durante 12 días para producir un precipitado cristalino del Polimorfo B del Compuesto de Fórmula I. Los cristales se separaron de la solución por filtración. Los cristales tienen un punto de fusión de aproximadamente 153-156 ºC, lo que confirma una forma polimórfica diferente del primer polimorfo.

7.4.2. Ejemplo ilustrativo 2 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Preparación de un polimorfo a partir de metanol e isopropanol

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, se combinaron seis lotes diferentes de material en bruto de cantidades diversas de Compuesto de Fórmula I de un modo tal que la combinación tuviera un promedio de un 91 % de Compuesto de Fórmula I. La combinación se disolvió en metanol y se concentró mediante evaporación rotatoria. La solución concentrada se mezcla a continuación con isopropanol, se filtra, y se seca al vacío para producir un polvo de color blanco con un punto de fusión de 156-160 ºC.

La difracción de rayos X de polvo del polvo de color blanco comprende valores 2 theta de 7,5°, 15,4°, y 18,7°.

7.4.3. Ejemplo ilustrativo 3 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Preparación del Polimorfo B a partir de cloroformo

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, se disolvió un material en bruto de tiacumicinas que contenía Compuesto de Fórmula I en cloroformo y se concentró por evaporación a temperatura ambiente para producir un sólido con un punto de fusión de 156-160 ºC.

7.4.4. Ejemplo ilustrativo 4 de la preparación de un polimorfo de R-Tiacumicina

Preparación de una forma polimórfica a partir de acetona

Después del proceso de fermentación que se ha descrito, por ejemplo, en la Sección 7.1, se disolvió un material en bruto de tiacumicinas que contenía Compuesto de Fórmula I en acetona y se concentró por evaporación a temperatura ambiente para producir un sólido con un punto de fusión de 156-160 ºC.

7.5. Preparación de formas amorfas del Compuesto de Fórmula I

Preparación de mezcla amorfa de tiacumicinas

La mezcla amorfa de tiacumicinas se obtuvo después de purificación en columna sin ninguna etapa de procesamiento adicional. Alternativamente, se puede añadir cloroformo o acetona a la mezcla de tiacumicinas y se evapora el disolvente para formar el producto amorfo.

La difracción de rayos X de polvo del producto no exhibe ningún pico de difracción definido.

8. Datos experimentales

8.1. Datos experimentales del polimorfo

Se caracteriza un primer polimorfo de un Compuesto de Fórmula I mediante calorimetría diferencial de barrido ("DSC") y difracción de rayos X ("XRD") de polvo.

El diagrama de DSC del polimorfo muestra una curva endotérmica a 177 ºC.

El diagrama de XRD (informado en la Figura 1) muestra picos que comprenden ángulos de difracción 2θ de 7,7°, 15,0°, 18,8°. La XRD se analizó con un Difractómetro de polvo Phillips por barrido de 20 a 70 grados dos-theta a 1,0 grados por minuto usando radiación Cu K-alfa, a 35 kV y 20 ma. El error instrumental (variable) es 0,04 (valor 2 theta).

El punto de fusión de las mezclas que contienen diversas cantidades de Compuesto de Fórmula I se resume en la Tabla 1. La totalidad de los productos con al menos un 85 % de un Compuesto de Fórmula I en forma de un polimorfo parece tener un punto de fusión en el intervalo de 163-169 ºC medido mediante el aparato de punto de

fusión, MEL-TEMP 1001.

Tabla 1: Punto de fusión de mezclas de polimorfos en diferentes condiciones de disolvente

N.º	Contenido de Compuesto de Fórmula I (%) del material cristalino	Pf (ºC)	Disolvente de cristalización
1	85	165-169	MeOH/Agua
2	85	163-165	Isopropanol
3	85	164-168	Acetonitrilo
4	90	165-168	MeOH/Isopropanol
5	94	166-169	MeOH/Agua
6	95	166-169	MeOH/Agua
7	98	163-164	MeOH/Isopropanol

Composición del cristal polimórfico de una mezcla que comprende Compuesto de Fórmula I y opcionalmente al menos un compuesto que es una mezcla de tiacumicinas basada en análisis por HPLC con un punto de fusión de 166-169 ºC.

La difracción de rayos X de un cristal polimórfico muestra picos característicos a ángulos 2θ de 7,8°, 15,0°, 18,8°, y 23,9°. La Tabla 2 es un listado de los picos de difracción de rayos X obtenidos para el primer polimorfo de R-Tiacumicina del Experimento 7.2.2.

Tabla 2: Picos de difracción de rayos X para un primer polimorfo del Experimento 7.3.2.

Dos-Theta	Intensidad relativa
3,3568	44,0000
3,4400	47,0000
7,7815	112,0000
10,1575	32,0000
13,6023	21,0000
15,0951	139,0000
17,0178	18,0000
18,8458	36,0000
19,3771	9,0000
20,0300	16,0000
20,4842	10,0000
23,9280	136,0000
24,8338	10,0000
25,0889	19,0000
25,7256	10,0000
30,9126	75,0000
31,9970	10,0000
34,4507	30,0000

La Tabla 3 es un listado de los picos de difracción de rayos X obtenidos para el polimorfo del Experimento 7.3.6.

Tabla 3: Picos de difracción de rayos X para un polimorfo del Experimento 7.3.6.

Dos-Theta	Intensidad relativa

3,2978	41,0000
7,5615	400,0000
9,9482	21,0000
15,4289	31,0000
22,0360	20,0000
22,5361	20,0000
24,9507	12,0000
29,5886	10,0000
34,8526	19,0000
37,7092	17,0000
40,4361	13,0000
42,2446	18,0000

8.2. <u>Datos experimentales del segundo polimorfo de R-Tiacumicina</u>

También se caracteriza un segundo polimorfo del Compuesto de Fórmula I mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X de polvo (XRD).

El diagrama de DSC del polimorfo B muestra una curva endotérmica a 158 ºC. El diagrama de XRD (informado en la Figura 5) muestra picos que comprenden los valores de ángulos de difracción 2-theta de 7,6°, 15,4° y 18,8°. El polimorfo B tiene un punto de fusión en el intervalo de 153-156 ºC medido mediante el aparato de punto de fusión, MEL-TEMP 1001.

Se cree que existen formas polimórficas cristalinas de los Compuestos de Fórmula I distintas de las A y B discutidas anteriormente y se desvelan en el presente documento. Estas formas polimórficas cristalinas, incluyendo A y B, y la forma o mezclas amorfas de las mismas contienen cantidades variables de Compuesto de Fórmula I y en ciertos casos se pueden usar de forma ventajosa mezclas de tiacumicinas en la producción de preparaciones medicinales que tienen actividad antibiótica.

La difracción de rayos X de polvo de los cristales se muestra la Figura 3 con picos a ángulos 2θ de 7,5°, 15,7°, y 18,9° ± 0,04 que indican la presencia de Polimorfo B.

En diagrama de DSC del Polimorfo B muestra una curva endotérmica que comienza a aproximadamente 150 ºC y tiene un pico a 158 ºC.

La Tabla 4 es un resumen de los diversos datos que se aislaron para lotes de cristalización ilustrativos.

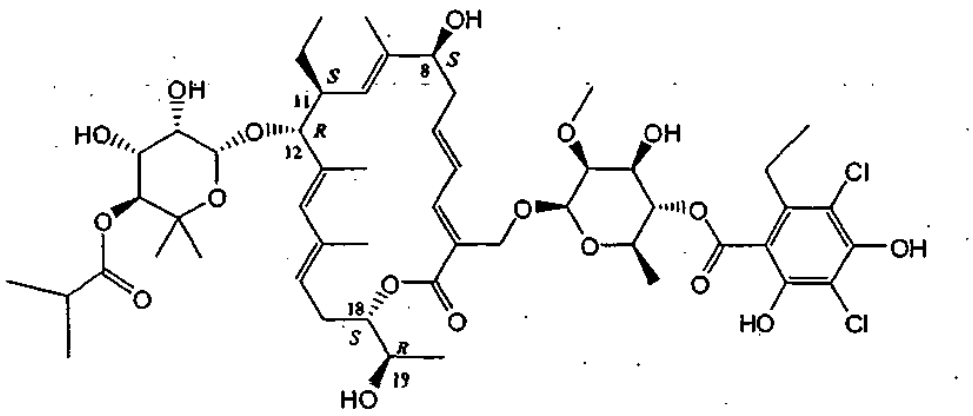
Tabla 4: Datos que resumen diversos lotes

N.º	**Contenido de Compuesto de Fórmula I (%)**	**Pf (ºC)**	**Pico de DSC (ºC)**	**XRD (2 theta)**	**Disolvente de cristalización**
1	76,3	155-158		7,7, 15,0, 18,8,	MeOH/Agua
2	85,3	159-164	180	7,8,14,9,18,8,	MeOH/Agua
3	85,4	163-165		7,6, 15,4	Isopropanol (IPA)
4	85,4	164-168		7,9, 15,0, 18,8	Acetonitrilo
5	85,4	153-156		7,5, 15,7, 18,9	EtOAc
6	90	165-168		7,5, 15,2, 15,7, 18,6	MeOH/Isopropanol
7	97,2	160-163	177	7,4, 15,4, 18,7	IPA
8	94,0	166-169	177	7,6,15,1,18,6	MeOH/Agua
9	97,2	167-173	187	7,8,14,8,18,8	MeOH/Agua

10	96,7		160	7,5, 15,4, 18,8	EtOAc
11	98,3	163-164	178	7,7, 15,0, 18,8	MeOH/IPA

REIVINDICACIONES

1. Polimorfo cristalino que comprende un compuesto de Fórmula I:



Fórmula I

caracterizado por un patrón de difracción de rayos X de polvo con al menos picos a ángulos de difracción 2θ de 7,7°, 15,0° y 18,8° ± 0,2.

2. El polimorfo cristalino de la reivindicación 1 **caracterizado** además **por** una endoterma de DSC en el intervalo de 174 ºC a 186 ºC.

3. Composición farmacéutica que comprende el polimorfo cristalino de la reivindicación 1 o la reivindicación 2

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que el polimorfo de Fórmula I está presente de un 75 % a un 99,99 % del peso total, y en donde la composición farmacéutica está en una forma de dosificación sólida.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que el polimorfo de Fórmula I está presente en al menos un 85 % del peso total, y en donde la composición farmacéutica está en una forma de dosificación sólida.

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que el polimorfo de Fórmula I está presente en al menos un 90 % del peso total.

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que el polimorfo de Fórmula I está presente en al menos un 95 % del peso total, y en donde la composición farmacéutica está en una forma de dosificación sólida.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que el polimorfo de Fórmula I está presente en al menos aproximadamente un 99 % del peso total, y en donde la composición farmacéutica está en una forma de dosificación sólida.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde la composición farmacéutica está en una forma de dosificación sólida.

10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Una composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10 para su uso en el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas en un mamífero.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde el mamífero es un ser humano.

13. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 11 o 12, en donde la infección bacteriana es infección por *Clostridium difficile*.

14. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la infección bacteriana es una infección gastrointestinal.

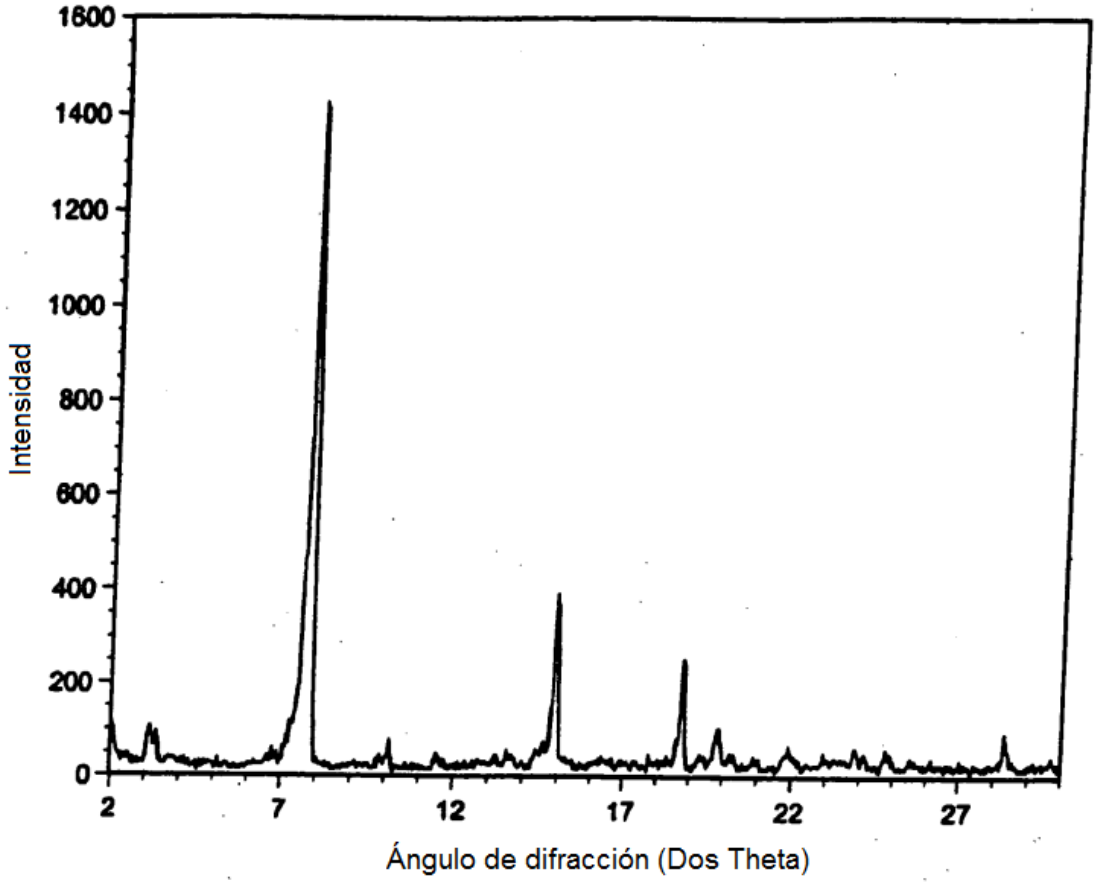

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Intensidad
2
7
12
17
22
27
Ángulo de difracción (Dos Theta)

Figura 1

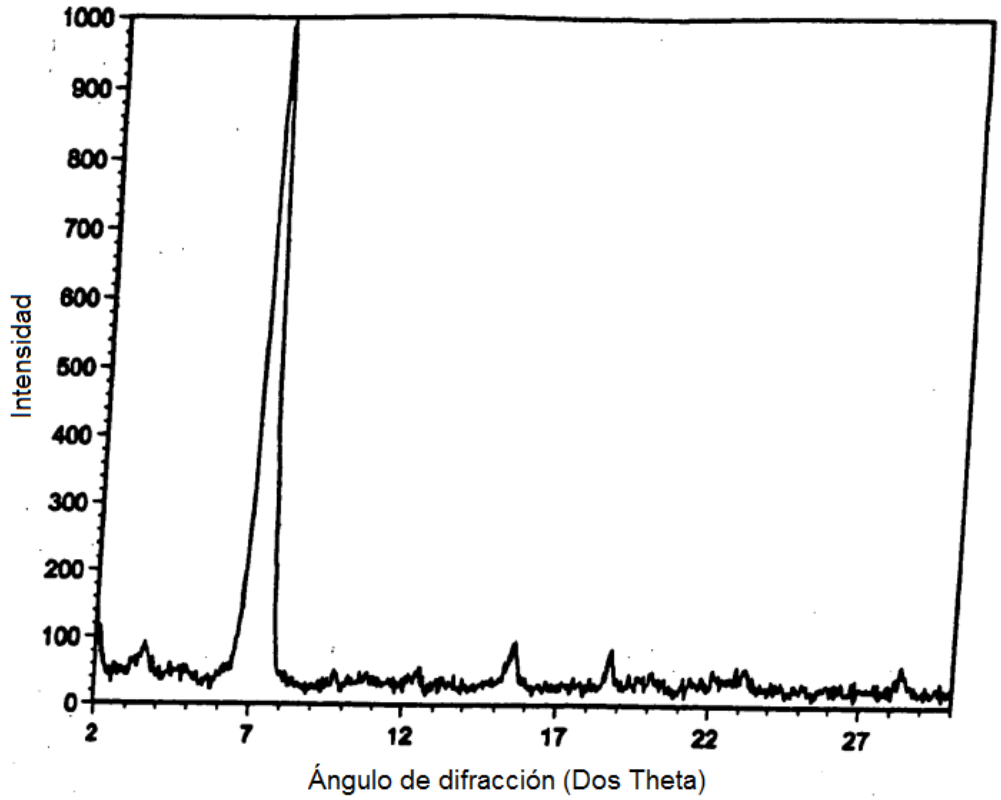

1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Intensidad
2
7
12
17
22
27
Ángulo de difracción (Dos Theta)

Figura 2

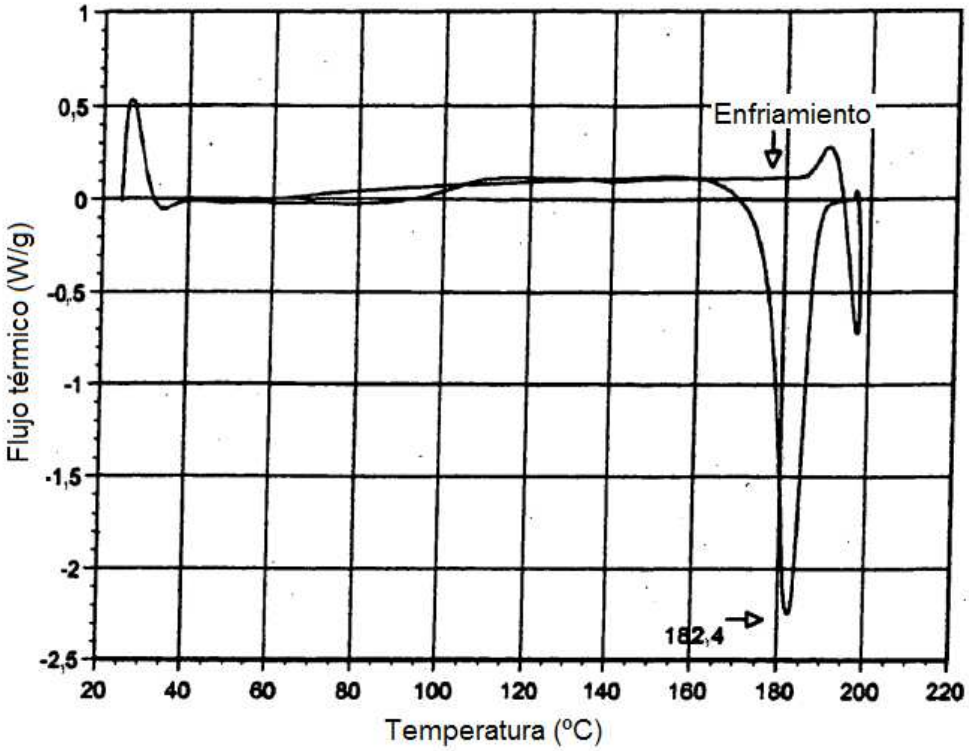

Enfriamiento
182,4
Flujo térmico (W/g)
Temperatura (ºC)
1
0,5
0
-0,5
-1
-1,5
-2
-2,5
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220

Figura 3